CSA847836
Organización y Digitalización de...

PCT

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

10-110046

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN

TITULO: ANTICUERPOS ALFA 5-BETA1 Y SUS USOS

SOLICITANTE: BRSITOL-MYERS SQUIBB COMPANY y PFIZER INC.

DIRECCIÓN: 1) Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 E.U.A. y 2) 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 06 de Septiembre de 2010

P2010/000112

Titulo. Cum
05-09-2010
Nº Exam

OLARTERAISBECK

OLARTE RAISBECK MO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 10-110046- -00000-0000
Fecha: 2010-09-06 17:17:27 Dep: 2020 DIR.NUEVASCR
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION Folios: 254

PETITORIO - FORMUL

PATENTE PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL **P2010/000112**

SOLICITUD DE:

(1)

[X] Patente de Invención. [ ] Patente de Modelo de Utilidad.

[X] Capítulo I. [ ] Capítulo II.

(2) **SOLICITANTE (71)**

Nombre: **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY y PFIZER INC.**
Dirección: Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 y 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 E.U.A
Nacionalidad o Domicilio: Estadounidenses
Lugar de Constitución: Estados Unidos de América.
Teléfono: **Fax:**
E-mail:

IDENTIFICACIÓN
C.C. [ ] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE
Dirección: Diagonal 34 No. 5-28 Bogotá D.C.
Teléfono: 601-7700 **Fax:** 601-7799
E-mail: office@olarteraisbeck.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. [X] **NIT** [ ]
C.E. [ ] **Otro** [ ]
Cual
Número 79782747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES) (72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA
Dirección: VER PAGINA ADJUNTA
Nacionalidad O Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

(5) **PCT (86)**

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/033042 Fecha Febrero 4, 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/100110 Fecha Agosto 13, 2009

(6) **Título (54)** **ANTICUERPOS ALFA 5-BETA1 Y SUS USOS**

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395, A61P 35/00 C07K 16/28

Prioridad
SI [X] **NO** [ ]

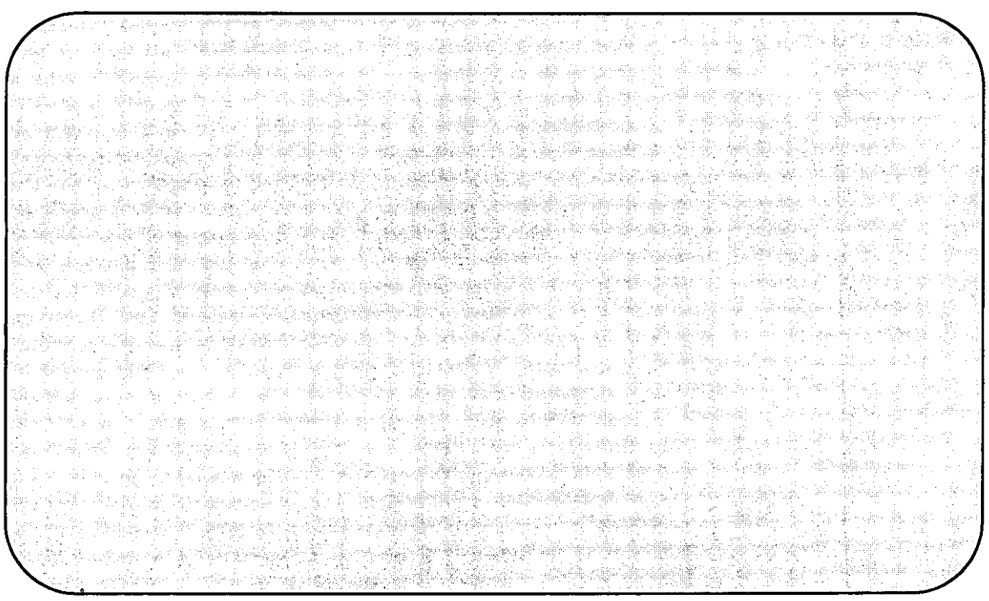
(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	Febrero 5, 2008	61/026,207
US	Septiembre 9, 2008	61/095,429

(9) **Comprobante de pago No.** 10- **Fecha** Septiembre de 2010

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [x] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [x] Poderes, si fuere el caso. Adjunto copia simple ver expediente No. Copia auténtica. y 09-147.462
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [x] Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- [ ] Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- [ ] Arte final 12 x 12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [x] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional. PCT/IB/306.
- [x] Otros. Búsqueda Internacional

(11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2009/033042

1. Steven Lee BENDER,
915 Reese Street, Oceanside,
CA 92054
Estados unidos
Nacionalidad: Estadounidense

2. Gerald Fries CASPERSON,
314 Claymont Drive,
Ballwin, MP 63011
Estados unidos
Nacionalidad: Estadounidense

3. Dana Dan HU-LOWE,
942 Arden Drive, Encinitas,
CA 92024
Estados unidos
Nacionalidad: Estadounidense

4. Xin JIANG,
12637 El Camino Real, Unit 5103,
San Diego, CA 92130
Estados Unidos
Nacionalidad: China

5. Gang LI,
11360 Saddle Cove Lane,
San Diego, CA 92130
Estados Unidos
Nacionalidad: China

6. Michael Aidan NORTH,
15047 El Camino real, Rancho Santa Fe,
CA 92014
Estados unidos
Nacionalidad: Británica

7. Jianying WANG,
7478 Park Village Road,
San Diego, CA 92129
Estados unidos
Nacionalidad: Estadounidense

8. Grant WICKMAN,
1720 Great Western Road Flat ½,
Glasgow G13 2TQ
Gran Bretaña
Nacionalidad: Británica

9. Peter BRAMS,
2740 11th Avenue,
Sacramento, CA 95815
Estados Unidos
Nacionalidad Alemana

10. Haichun HUANG,
4329 Crestwood Street,
Fremont, CA 94538
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

11. Brigitte DEVAUX,
320 Duluth Circle,
Palo Alto, ca 94306
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

12. Haibin CHEN,
125 Connemara # 28,
Sunnyvale, CA 94087
Estado Unidos
Nacionalidad: China

13. Dawn M. TANAMACHI,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

14. Kristopher TOY,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

15. Lan YANG,
18668 Purissim Way,
Morgan Hill, CA 95037
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

16. Tim W. SPROUL,
683 Alden Lane,
Livermore, CA 94550
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

17. Mark YAMANAKA,
2953 Amoroso Court,
Pleasanton, CA 94566
Estado Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-110046- -00000-0000

Fecha: 2010-09-06 17:17:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 254

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 10 - 74,029
FECHA : SEPTIEMBRE 6 DE 2010

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
OLARTE RAISBEK	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	379391311	06/09/2010	3,879,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	554,000.00
		TOTAL : $	554,000.00

SON: QUINIENTOS CINCUENTA Y CUATRO MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés.

La certificación notarial adjunta lleva la firma y el sello de:

"Julie M. Staszewski, Notario Público de New Jersey. Mi nombramiento vence el 13 de abril de 2014"

CERTIFICACIÓN

La suscrita, Vicepresidente Principal y Representante Legal de de Bristol-Myers Squibb Company, por medio del presente documento nombra a:

Briana C. Bergen
Nadine Flynn
Paul Golian
Warren Volles
Louis Wille
Anastasia Winslow

(a) para presentar a las oficinas gubernamentales de patentes, marcas registradas, derechos de autor y similares de todos los países o a cualquier autoridad competente, todas las solicitudes originales, divisionales, de continuación y reexpedición, peticiones y solicitudes en nombre de Bristol-Myers Squibb Company y sus compañías subsidiarias, de cartas de patente de inventos, modelos utilitarios, modelos industriales y diseños y mejoras de adiciones de los mismos, marcas registradas y derechos de autor (b) iniciar y proseguir oposiciones y apelaciones; (c) presentarse ante cualquier funcionario debidamente autorizado, ministro, oficina, secretaría, comisiones o comisionados que pueda ser necesario;

AUTENTICACIÓN DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) CERTIFICA QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
22 JUL 2010
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 276 - 1993 Mindusticia

(d) firmar y aprobar en nombre de esta compañía todos los documentos y poderes que puedan ser necesarios o deseables por parte de los individuos interesados para llevar a cabo los poderes aquí conferidos; (e) solicitar todos los procesos; (f) pagar o retirar todos los impuestos, obtener recibos para los mismos y obtener exoneraciones; (g) retirar solicitudes y todos los documentos relacionados con ellos; (h) iniciar procesos contra infractores y asegurar la defensa en juicios de infracción; y (i) en general hacer todo lo que en juicio de los individuos autorizados pueda necesitarse para asegurar el otorgamiento de los privilegios antes mencionados.

En constancia de lo anterior, he puesto mi firma y el sello de la compañía este día 2 de diciembre de 2008.

(Firmado) Sandra Leung, Vicepresidente Principal y Representante Legal

Apostilla adjunta:



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

9

APOSTILLA:
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País:	Estados Unidos de América
El presente documento público	
2. Ha sido firmado por:	Julie M Staszewski
3. Actuando en calidad de:	Notario Público de New Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de:	Julie M. Staszewski , Notario
Certificado	
5. En:	Trenton, New Jersey
6. El:	21 de junio de 2010
7. Por:	Andrew P. Sidamon-Eristoff, Tesorero del Estado
8. Bajo el No.:	A397069
9. Sello / estampilla:	"El Gran Sello del Estado de New Jersey"
10. Firma:	(Firmado)

Certificado No. 1174525710
Verifique este certificado por internet en:
https://www1.state.nj.us/TYTR-StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2010 JUL 22 6:20
DIRECCIÓN DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

0119105
Jorge Sierra
FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESCARGADA EN LA(S) FUENTE(S) INDICADA(S)

RECUPERACIÓN DEL TEXTO

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Certificación:
Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.
Documento: "Bristol-Myers Squibb Company – Certificación"
Fecha: 13 de julio de 2010.
Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)
Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.
Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.
Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.
E-mail: lreseser1@yahoo.com
Traducción # 15-251

AUTENTICACIÓN DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO(38) CERTIFICA QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 JUL 2010
NOTARÍA (38)
RODOLFO REY BERMÚDEZ
Notario 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTÁ D.C.

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

10

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
   JULIE M STASZEWSKI
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
   NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
   JULIE M STASZEWSKI, NOTARY

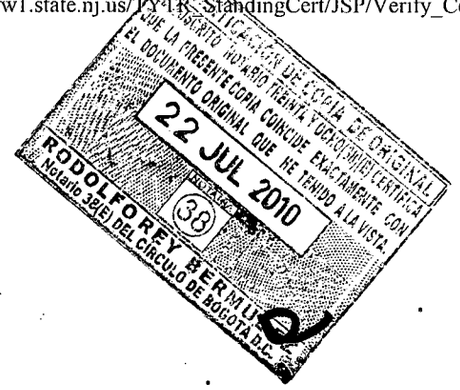
CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 21ST DAY OF JUNE 2010
7. BY: Andrew P Sidamon-Eristoff
   State Treasurer
8. NO: A397069
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE





Certificate Number: 1174525710
Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp



OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

Carlos R. Olarte
J. Ian Raisbeck
Juan Guillermo Moure
Natalia Castro

Alexander Agudelo
Ángela Correa
Erika Rico
Carlos A. Parra
Gina Arias
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mariana Franco
Monica Guevara
Alvaro Sabbagh

Of Counsel
Guillermo Chahín
Graciela Melo
Jacqueline Chaparro
Cruz E. de Moncaleano

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY

domiciled in

domiciliado en

Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 United State of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's Patents for Inventions, Utility Models, Layout-Designs (topographies) of Integrated Circuits, Industrial Designs, Trademarks, Advertising Slogans, Trade Names, Commercial Emblems, Geographical Indications, Protection of Trade Secrets, Obtainer's Certificates, Copyrights, Registration of Domain Names, Health Registrations, or any other intellectual property right, also to file Unfair competition actions and request injunctions in the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, poder amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de las Patentes de Invención, Modelos de Utilidad, Esquemas de Trazados de Circuitos Integrados, Diseños Industriales, Marcas, Lemas Comerciales, Nombres Comerciales, Enseñas Comerciales, Denominaciones de Origen, Protección de Secretos Empresariales, Certificados de Obtentor, Derechos de Autor, Registro de Nombres de Dominio, Registros Sanitarios, o cualquier otro bien de propiedad intelectual y también para presentar acciones de competencia desleal y pedir medidas cautelares a nombre de la compañía en la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconvenciones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses.

Signature/Firma:

Date/Fecha: June 14 2010

City,Country/Ciudad,País: Princeton, New Jersey USA

AUTENTICACIÓN DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
HACE CONSTAR QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
22 JUL 2010
NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO DE BOGOTÁ D.C.
RODOLFO REY BERNAL
Notario Público

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK MOURE & CASTRO LTDA.

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date,
June 14, 2010
The undersigned Notary Public certifies:

1. That
Paul D. Golian
of legal age and domiciled in
P.O. Box 4000, Princeton, New Jersey USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Counsel of **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**

3. That **BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY**
having its principal place of business located in **Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 United State of America**
is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

BMS Certification dated December 2, 2008

NOTARY PUBLIC (Signature):

JULIE M. STASZEWSKI
Notary Public of New Jersey
My Commission Expires April 13, 2014

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
mayor de edad y domiciliado
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

AUTENTICACIÓN DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) DEL CÍRCULO CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
22 JUL 2010
(38)
RODOLFO REY BERMUDEZ
NOTARIO 38(E) DEL CIRCULO DE BOGOTA D.C.

13

CERTIFICATION

The undersigned, being the Senior Vice President and General Counsel of **Bristol-Myers Squibb Company,** hereby designates:

Briana C. Bergen
Nadine Flynn
Paul Golian
Warren Volles
Louis Wille
Anastasia Winslow

(a) to present to the Patent, Trademark, Copyright and similar Government Offices of all countries or to any competent authority, all original, divisional, continuation and reissue applications, petitions and requests in the name of Bristol-Myers Squibb Company and its subsidiary companies, for letters patent for inventions, utility models, industrial models and designs and improvements or additions thereof, trademarks and copyrights; (b) to initiate and prosecute oppositions and appeals; (c) to appear before all officers duly authorized, all Ministers, Bureaus, Clerk's Offices and Commissions or Commissioners that may be necessary; (d) to sign and approve on behalf of this corporation all documents and powers of attorney which judgment of the authorized individuals may be necessary or desirable to carry out the powers hereby conferred; (e) to request all proceedings; (f) to pay over or withdraw all taxes, obtain receipts therefor and give discharge; (g) to withdraw applications and all documents relating thereto; (h) to commence proceedings against infringers and assure the defense in infringement actions; and (i) generally to do all that in the judgment of the authorized individual may be necessary to secure granting of the privileges above-mentioned.

IN WITNESS WHEREOF, I have placed my hand and caused the seal of the Company to be affixed hereto on this 2nd day of December 2008.

Sandra Leung
Senior Vice President
and General Counsel

AUTENTICACION DE COPIA DE ORIGINAL
EL SUSCRITO NOTARIO TREINTA Y OCHO (38) CERTIFICA
QUE LA PRESENTE COPIA COINCIDE EXACTAMENTE CON
EL DOCUMENTO ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA.
22 JUL 2010
NOTARIA
38
RODOLFO REY BERMUDEZ
Decreto 356(6) del CIRCULO DE BOGOTA D.C.

Traducción oficial del Inglés por Marlén Neira Castro, resolución 2117 del Ministerio de Justicia de Colombia

APOSTILLA EN PODER DE REPRESENTACIÓN DE

PFIZER INC.

Bilingüe inglés- español otorgado en Nueva York, Estados Unidos el 14 de julio de 2003 y firmado por J. Trevor Lumb, Vicepresidente de Pfizer Products Inc.

CERTIFICACION NOTARIAL

Bilingüe inglés- español, el 14 de julio de 2003 el suscrito notario Kenneth Greenwood certifica que J. Trevor Lumb, domiciliado en Nueva York ejercía funciones de Asistente General Consejero de Patentes la Compañía Pfizer Inc., con sede en Nueva York, Nueva York, Estados Unidos.

Firma del notario: Kenneth Greenwood

Sello notarial: certificado, verificado y autenticado en la Localidad de Egham en Surrey, 14 julio, 2003 por el Notario Kenneth Greenwood-Horne Engall & Freeman

Sello Notario Público en alto relieve rojo.

APOSTILLA

REINO UNIDO DE GRAN BRETAÑA E IRLANDA DEL NORTE

1. País :Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte
   Este documento Público
2. ha sido firmado por K. Greenwood
3. ejerce funciones de Notario Público
4. Lleva el sello de dicho Notario Público

CERTIFICADÓ

5. En Londres 6. El 17 de julio de 2003
7. Por el Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
8. No. G210434
9. Sello del Secretario de Estado Principal de su Majestad para Asuntos exteriores y de la mancomunidad
10. Firma de R. Bawden - Por Secretario de Estado

Si el documento se usa en un país que no es parte de la convención de la Haya del 5 de octubre 1961, debe presentarse en sección consular de la misión que representa el país.

Es traducción fiel del inglés, con copia archivo para confrontación. Bogotá 25 de julio-2003. Marlen Neira C.

MARLEN NEIRA CASTRO
Traductor e Intérprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Resolución No. 2117

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

Power of Attorney

The undersigned,

domiciled in

Pfizer Inc.

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck and Ana María Frieri** full and sufficient Power of Attorney to file, prosecute, obtain, defend and enforce any and all of the company's **Patents, Utility Models and Industrial Designs** in the Republic of Colombia, to which end it empowers them to take all steps necessary before any administrative or judicial authority of any class for the objects stated, to file petitions, appeals, replies and oppositions, pay taxes and annuities, request testimonies, receive documents and securities, abandon applications and collect refunds. Sufficient power is hereby granted to receive notifications on behalf of the Company, to confer powers on those who are to represent the company judicially and extrajudicially, to answer in court in the matter of all claims and demands that may be presented in connection with the objects stated, giving them likewise power to substitute these presents and revoke such substitutions.

Poder

El suscrito,

Pfizer Inc.

domiciliado en

235 East 42nd Street, New York, NY 10017 USA

por medio del presente otorga a **Carlos R. Olarte, J. Ian Raisbeck y Ana María Frieri** poder especial, amplio y suficiente para presentar, tramitar, obtener, defender y hacer respetar todas y cualquiera de **Patentes, Modelos de Utilidad y Diseños Industriales** de la compañía en la República de Colombia, a cuyo efecto los faculta para dar todos los pasos necesarios ante cualquier autoridad administrativa o judicial de cualquier jerarquía para cumplir con lo encomendado, elevar solicitudes, apelaciones, respuestas y oposiciones, pagar impuestos y anualidades, solicitar testimonios, recibir documentos y valores, desistir y percibir. Se concede poder bastante para recibir notificaciones a nombre de la compañía, otorgar poderes a quienes vayan a representar a la compañía judicial y extrajudicialmente, responder en juicio a todas las reclamaciones o demandas que por motivo de lo encomendado se presentaren, dándoles asimismo facultad para sustituir el presente y revocar dichas sustituciones.

Signature/Firma: _____

Date/Fecha: July 14, 2003

City,Country/Ciudad,País: New York, USA

[redacted]

OLARTERAISBECK
OLARTE RAISBECK & FRIERI, LTDA.
LEGAL & PROFESSIONAL SERVICES

WORLD TRADE CENTER – TORRE C
CALLE 100 NO. 8A-55 PISO 10
BOGOTA, COLOMBIA
TELEPHONE: +57-1 638-6200
FAX: +57-1 638-6201

www.olarteraisbeck.com

16

Notarial Certification

On this date,
July 14, 2003
The undersigned Notary Public certifies:

1. That J. Trevor Lumb
of legal age and domiciled in New York, USA
signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Assistant General Patent Counsel of Pfizer Inc.

3. That Pfizer Inc.,
having its principal place of business located in New York, New York, U.S.A.
is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the Power of Attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the Power of Attorney and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que
J. Trevor Lumb
mayor de edad y domiciliado
New York
suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de
de

4. Que
con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legitima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

NOTARY PUBLIC (Signature):

EXECUTION
Certified Verified and Authenticated
In The Town Of Epsom in Surrey
This 14th Day Of July 2003

KENNETH GREENWOOD
NOTARY PUBLIC
HORNE ENGALL AND FREEMAN

817

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
   Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

   This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by / a été signé par: **K Greenwood**

3. Acting in the capacity of / agissant en qualité de: **Notary Public**

4. Bears the seal/stamp of / est revêtu du sceau/timbre de: **The Said Notary Public**

5. at London/à Londres — Certified/Attesté

6. the/le **17 July 2003**

7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs / par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No **G210434**

9. Stamp: / timbre:

10. Signature: **R. Bawden**

FOREIGN AND COMMONWEALTH OFFICE LONDON

For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
13 August 2009 (13.08.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/100110 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2009/033042

(22) International Filing Date:
4 February 2009 (04.02.2009)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/026,207 5 February 2008 (05.02.2008) US
61/095,429 9 September 2008 (09.09.2008) US

(71) Applicants *(for all designated States except US)*: **MEDAREX, INC.** [US/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540 (US). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **BENDER, Steven, Lee** [US/US]; 915 Reese Street, Oceanside, CA 92054 (US). **CASPERSON, Gerald, Fries** [US/US]; 314 Claymont Drive, Ballwin, MO 63011 (US). **HU-LOWE, Dana, Dan** [US/US]; 942 Arden Drive, Encinitas, CA 92024 (US). **JIANG, Xin** [CN/US]; 12637 El Camino Real, Unit 5103, San Diego, CA 92130 (US). **LI, Gang** [CN/US]; 11360 Saddle Cove Lane, San Diego, CA 92130 (US). **NORTH, Michael, Aidan** [GB/US]; 15047 El Camino Real, Rancho Santa Fe, CA 92014 (US). **WANG, Jianying** [US/US]; 7478 Park Village Road, San Diego, CA 92129 (US). **WICKMAN, Grant** [GB/GB]; 1720 Great Western Road Flat 1/2, Glasgow G13 2TQ (GB). **BRAMS, Peter** [DE/US]; 2740 11th Avenue, Sacramento, CA 95815 (US). **HUANG, Haichun** [US/US]; 4329 Crestwood Street, Fremont, CA 94538 (US). **DEVAUX, Brigitte** [US/US]; 320 Duluth Circle, Palo Alto, CA 94306 (US). **CHEN, Haibin** [CN/US]; 125 Connemara # 28, Sunnyvale, CA 94087 (US). **TANAMACHI, Dawn, M.** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **TOY, Kristopher** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **YANG, Lan** [US/US]; 18668 Purissima Way, Morgan Hill, CA 95037 (US). **SPROUL, Tim, W.** [US/US]; 673 Alden Lane, Livermore, CA 94550 (US). **YAMANAKA, Mark** [US/US]; 2953 Amoroso Court, Pleasanton, CA 94566 (US).

(74) Agent: **BRADY, James, W.**; Dickstein Shapiro LLP, 1825 Eye Street, NW, Washington, DC 20006-5403 (US).

[Continued on next page]

(54) Title: ALPHA 5 - BETA 1 ANTIBODIES AND THEIR USES

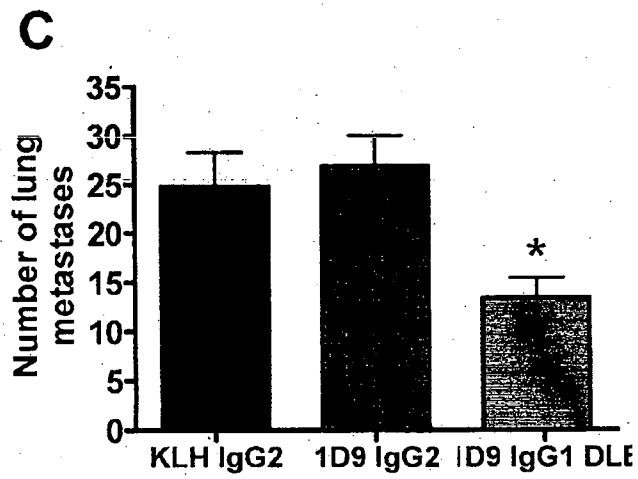


Figure 13 C

(57) Abstract: The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies, particularly human monoclonal antibodies, or antigen binding portions thereof, that specifically bind to integrin α5β1 with high affinity. Nucleic acid molecules encoding the antibodies of the disclosure, expression vectors, host cells and methods for expressing the antibodies of the disclosure are also provided. Immunoconjugates, bispecific molecules and pharmaceutical compositions comprising the antibodies or antigen binding portions thereof are also provided. The disclosure also provides methods for treating various cancers using the anti-α5β1 antibodies or antigen binding portions thereof described herein.

WO 2009/100110 A1

WO 2009/100110 A1

(81) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *with international search report (Art. 21(3))*

— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

ALPHA 5 – BETA 1 ANTIBODIES AND THEIR USES

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 61/026,027 filed on February 5, 2008, and to U.S. Provisional Application No. 61/095,429 filed on September 9, 2008, both of which are incorporated herein by reference in their entirety.

Field

[0002] The present disclosure relates to antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to α5β1. The disclosure also relates to nucleic acid molecules encoding such antibodies and antigen-binding portions, methods of making α5β1antibodies and antigen-binding portions, compositions comprising these antibodies and antigen-binding portions and methods of using the antibodies, antigen-binding portions, and compositions.

Background

[0003] Integrin α5β1 is a heterodimeric cell surface protein that binds fibronectin and is involved in cell attachment and angiogenesis. This heterodimer is made up of an α5 subunit and a β1 subunit. Integrin α5β1 is referred to as the "classic fibronectin receptor" that plays key roles in matrix adhesion, migration, proliferation, differentiation, and survival. Although several integrins bind to fibronectin (FN), α5β1 is selective for FN as it requires both peptide sequences on the ninth (PHSRN) and tenth (RGDS) type III repeats of FN for ligand recognition and optimal interaction. (Danen et al. *J. Biol. Chem.* 270(37):21612-21618 (1995); Redick et al. *J. Cell Biol.* 149(2):521-527 (2000); Takagi et al. *EMBO J.* 22:4607-4615 (2003)). Integrin-mediated cell adhesion to FN can trigger calcium fluxes, activate tyrosine and serine/threonine protein kinases and inositol lipid metabolism, and regulate the activity of the Rho family of small GTPases that controls the actin cytoskeleton and cell cycle progression.

[0004] Expression of α5β1 is observed in most embryonic tissues, but the level diminishes after birth in a manner consistent with terminal cell differentiation (Muschler & Horwitz *Development* 113(1):327-337 (1991)). In wild type adult mice, expression is mainly in the vasculature and connective tissue, although low levels of the receptor are widely distributed. Expression of both α5β1 and FN are significantly and coordinately enhanced on blood vessels of human tumors and in growth factor and cytokine stimulated tissues.

Angiogenic cytokines such as bFGF, VEGF, IL-8, TGF-beta, and TNF-α upregulate α5β1 expression on endothelial cells in-vitro and in-vivo, whereas these molecules are minimally expressed on normal human vessels and tissues (Kim et al. *Am. J. Path.* 156(4):1345-62 (2000); Enaida et al. *Fukushima J. Med. Sci.* 44(1):43-52 (1998); Klein et al. *Mol. Biol. Cell* 4(10):973-982 (1993)).

[0005] High levels of α5β1 expression are not limited to the vasculature, as tumor cells are also frequently observed to express α5β1 in many types of cancer. Tumor hypoxia has been associated with increased tumor α5β1 expression (Mousa et al. *J. Cell. Biochem.* 74:135-143 (1999)). Integrins are thought to be important for tumor intravasation into newly formed capillaries and extravasation to distant sites, leading to tumor spreading and metastatic disease. Altogether, the expression pattern of α5β1 is consistent with multiple roles in promoting cancer, by mediating both stromal and tumor cell activities. Various clinical studies have associated α5β1 upregulation on tumor cells with progression of human melanoma, oral squamous cell carcinoma, and B-cell leukemias (Jin & Varner, *Br. J. Cancer* 90:561-565 (2004); Danen et al. *Histopathology* 24(3):249-256 (1994); Shinohara et al., *Am. J. Clin. Pathol.* 111(1):75-88 (1999)).

Summary

[0006] The present disclosure provides isolated monoclonal antibodies, in particular human monoclonal antibodies, that exhibit high affinity binding to human integrin α5β1. The antibodies described in the present disclosure are typically human antibodies, although in alternative cases the antibodies can be murine antibodies, chimeric antibodies, or humanized antibodies.

[0007] In one aspect, the disclosure pertains to an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody: (a) binds to human integrin α5β1 with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less; and (b) is capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity. For example, in one case, the antibody belongs to a subclass that is capable of inducing ADCC, such as IgG1 or IgG3. In another case, the ADCC activity is the result of introducing carbohydrate modifications, such as altered glycosylation patterns, into the Fc region as compared to the native carboyhydrate pattern.

[0008] In certain cases, the antibody binds to human integrin α5β1 with a K_D of 5 x 10^{-8} M or less, 2 x 10^{-8} M or less, 1 x 10^{-8} M or less, 5x10^{-9} M or less, 4x10^{-9} M or less, 3x10^{-9} M or less, or 2.7 x 10^{-9} M or less.

[0009] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, wherein the antibody: (a) binds to human integrin α5β1 with a K_D of 1x10^{-7} M or less; and (b) demonstrates enhanced ADCC activity relative to a comparable antibody. For example, in one case, the antibody with enhanced ADCC activity comprises at least one mutation in the Fc region as compared to the wild type Fc region, and the enhanced ADCC activity is relative to the same antibody, but comprising the wild type Fc region. In certain examples, the antibody binds to human integrin α5β1 with a K_D of 5 x 10^{-8} M or less, 2 x 10^{-8} M or less, 1 x 10^{-8} M or less, 5x10^{-9} M or less, 4x10^{-9} M or less, 3x10^{-9} M or less, or 2.7 x 10^{-9} M or less. In further examples, the antibody demonstrates enhanced ADCC activity relative to a comparable antibody that is at least 1.1 fold, at least 1.2 fold, at least 1.3 fold, at least 1.5 fold, at least 2-fold, at least 3-fold, at least 5-fold, at least 10-fold, at least 20-fold, at least 30-fold, at least 40-fold, at least 50-fold, at least 100-fold, at least 200-fold, at least 500-fold, or at least 1000-fold as compared to a comparable antibody, wherein the comparable antibody is the same antibody, but with the wild type Fc region.

[0010] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, wherein the antibody: (a) binds to human integrin α5β1 with a K_D of 1x10^{-7} M or less; and (b) comprises at least one mutation in the Fc region as compared to the wild type Fc region. For example, in one case, the subclass of the antibody is IgG1 and at least one amino acid in the Fc region of the IgG1 subclass is mutated. In a further example, the at least one mutation occurs at position serine 247, alanine 338, or isoleucine 340 in the Fc region of the IgG1 subclass. In a further example, the at least one mutation is selected from the group consisting of S247D, A338L, and I340E. In yet a further example, the antibody comprises the mutations S247D, A338L, and I340E.

[0011] A further aspect of the present disclosure is an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, wherein the antibody cross-competes or competes for binding to human integrin α5β1 with an antibody that comprises: (a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, or conservative modifications

thereof; and (b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, or conservative modifications thereof.

[0012] A further aspect of the present disclosure is an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-39 gene, wherein the antibody specifically binds human integrin $\alpha5\beta1$.

[0013] A further aspect of the present disclosure is an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds human integrin $\alpha5\beta1$.

[0014] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 1, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 2, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 3, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 4, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 5, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 6, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 1, or conservative modifications thereof;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 2, or conservative modifications thereof;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 3, or conservative modifications thereof;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 4, or conservative modifications thereof;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 5, or conservative modifications thereof; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 6, or conservative modifications thereof.

[0015] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, or conservative modifications thereof. For example, the disclosure provides an antibody or antigen-binding portion thereof comprising a heavy chain variable region that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, or conservative modifications thereof. For example, the disclosure provides an antibody or antigen-binding portion thereof comprising a light chain variable region that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:8. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7, or conservative modifications thereof, and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8, or conservative modifications thereof. For example, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7, and a light chain variable region that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.

[0016] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 13, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 14, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 15, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 16, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 17, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 18, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 13, or conservative modifications thereof;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 14, or conservative modifications thereof;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 15, or conservative modifications thereof;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 16, or conservative modifications thereof;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 17, or conservative modifications thereof; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 18, or conservative modifications thereof.

[0017] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region

comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19, or conservative modifications thereof, and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20, or conservative modifications thereof.

[0018] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 25, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 27, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 28, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising:

(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 23, or conservative modifications thereof;

(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 24, or conservative modifications thereof;

(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 25, or conservative modifications thereof;

(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 26, or conservative modifications thereof;

(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 27, or conservative modifications thereof; and

(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 28, or conservative modifications thereof.

[0019] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 29, or conservative modifications thereof, and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30, or conservative modifications thereof.

[0020] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 33, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 35, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 36, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR2

comprising SEQ ID NO: 37, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38, or conservative modifications thereof. In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising: (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 33, or conservative modifications thereof; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 34, or conservative modifications thereof; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 35, or conservative modifications thereof; (d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 36, or conservative modifications thereof; (e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 37, or conservative modifications thereof; and (f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 38, or conservative modifications thereof.

[0021] In a further aspect, the present disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40, or conservative modifications thereof. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 39, or conservative modifications thereof, and a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 40, or conservative modifications thereof.

[0022] In a further aspect there is provided an isolated antibody or antigen binding portion thereof that binds to the same epitope on human integrin $\alpha 5\beta 1$ as any of the antibodies disclosed herein and/or competes for binding to human integrin $\alpha 5\beta 1$ with such an antibody.

[0023] In one embodiment, the disclosure provides the material deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9377. In another embodiment, the disclosure provides the material deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9378. In another embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the heavy chain variable region as

deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9377. In another embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the light chain variable region as deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9378. In another embodiment, the disclosure provides an isolated antibody comprising the heavy chain variable region as deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9377, but wherein the germline mutations I30S and N33S have been made in the VH region. In a further embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the heavy chain and light chain variable regions as deposited at the ATCC as Deposit Nos. PTA-9377 and PTA-9378, respectively, or said antibody wherein the germline mutations I30S and N33S have been made in the VH region. In a further embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the heavy chain variable region as deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9377, or comprises said CDR1, CDR2, and CDR3 when said heavy chain variable region contains the germline mutations I30S and N33S. In a further embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the light chain CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the light chain variable region as deposited at the ATCC as Deposit No. PTA-9378. In a further embodiment, the disclosure provides an isolated antibody that comprises the light chain CDR1, CDR2, and CDR3 regions and the heavy chain CDR1, CDR2, and CDR3 regions of the heavy and light chain variable regions as deposited at the ATCC as Deposit Nos. PTA-9377 and PTA-9378, respectively, or comprises said CDR1, CDR2, and CDR3 regions when said heavy chain variable region contains the germline mutations I30S and N33S.

[0024] The antibodies of the disclosure can be, for example, full-length antibodies, for example of an IgG1 or IgG4 subclass. Alternatively, the antibodies can be antibody fragments, such as Fab or Fab'2 fragments, or single chain antibodies. In one case, the present disclosure provides any of the antibodies as described above, which is a human full-length antibody of subclass IgG1, wherein at least one amino acid in the Fc region of the IgG1 subclass is mutated. In a further case, the at least one mutation occurs at position serine 247, alanine 338, or isoleucine 340. In a further case, the at least one mutation is selected from the group consisting of S247D, A338L, and I340E. In yet a further case, the antibody comprises the mutations S247D, A338L, and I340E.

[0025] In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody comprising a heavy chain as shown in SEQ ID NO: 9, or conservative modifications thereof. For example, the antibody comprises a heavy chain that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody comprising a light chain as shown in SEQ ID NO: 10, or conservative modifications thereof. For example, the antibody comprises a light chain that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:10. In a further aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody comprising a heavy chain as shown in SEQ ID NO: 9, or conservative modifications thereof, and a light chain as shown in SEQ ID NO: 10, or conservative modifications thereof. For example, the antibody comprises a heavy chain that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:9, and a light chain that is at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:10.

[0026] In some embodiments, the C-terminal lysine of the heavy chain of any of the anti-α5β1 antibodies of the disclosure as described is cleaved, and is thus not present. For example, in some embodiments antibodies of the present disclosure comprise the IgG1 constant heavy region as shown in SEQ ID NO: 43, but where the C-terminal lysine is not present. In various cases, the heavy and light chains of the anti-α5β1 antibodies may optionally include a signal sequence.

[0027] In a further aspect, the disclosure provides a composition comprising any of the antibodies, or antigen-binding portions thereof, as described herein, and a pharmaceutically acceptable carrier.

[0028] In a further aspect, the disclosure provides an immunoconjugate comprising any of the antibodies, or antigen-binding portions thereof, as described herein, linked to a therapeutic agent. In one case, the therapeutic agent is a cytotoxin or a radioactive isotope. In a further aspect, the disclosure provides a composition comprising any of the immunoconjugates described herein and a pharmaceutically acceptable carrier. The disclosure also provides a bispecific molecule comprising an antibody, or antigen-binding

portion thereof, linked to a second functional moiety having a different binding specificity than said antibody, or antigen binding portion thereof.

[0029] Compositions comprising an antibody, or antigen-binding portion thereof, or immunoconjugate or bispecific molecule of the disclosure and a pharmaceutically acceptable carrier are also provided.

[0030] Nucleic acid molecules encoding the antibodies, or antigen-binding portions thereof, are also encompassed by the disclosure, as well as expression vectors comprising such nucleic acids and host cells comprising such expression vectors. One aspect, for example, is an isolated nucleic acid molecule, or an expression vector, comprising the sequence as shown in SEQ ID NO: 11, or conservative modifications thereof. A further aspect is an isolated nucleic acid molecule, or an expression vector, comprising the sequence as shown in SEQ ID NO: 12, or conservative modifications thereof. A further aspect is an isolated nucleic acid molecule, or an expression vector, comprising the sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 21, 22, 31, 32, 41, and 42, or conservative modifications thereof. The disclosure also provides a transgenic mouse comprising human immunoglobulin heavy and light chain transgenes, wherein the mouse expresses an antibody of the disclosure, as well as hybridomas prepared from such a mouse, wherein the hybridoma produces the antibody of the disclosure.

[0031] The disclosure further provides a host cell comprising any of the expression vectors described herein.

[0032] In a further aspect, the disclosure provides a method for preparing an anti-integrin $\alpha5\beta1$ antibody which comprises expressing the antibody in any of the host cells described herein and isolating the antibody from the host cell.

[0033] In a further aspect, the disclosure provides a method for inhibiting growth of tumor cells expressing integrin $\alpha5\beta1$, comprising contacting the cells with an antibody or antigen binding portion thereof that binds to human integrin $\alpha5\beta1$ with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less and is capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity. In one case, the antibody is a fully human antibody. In a further case, the antibody or antigen-binding portion thereof is engineered to enhance its ability to induce antibody dependent cellular cytotoxicity. In yet a further case, the enhancement is achieved by mutation of at least one amino acid residue in the Fc region.

[0034] In a further aspect, the disclosure provides a method of inhibiting growth of tumor cells expressing integrin α5β1, comprising contacting the cells with any of the antibodies, or antigen-binding portions thereof, as described herein, in an amount effective to inhibit growth of the tumor cells.

[0035] In a further aspect, the disclosure provides the use of any of the antibodies or antigen-binding portions thereof, as described herein, for the manufacture of a medicament for the treatment of abnormal cell growth. In still a further aspect, the disclosure provides any of the antibodies or antigen-binding portions thereof, as described herein, for use in the treatment and/or diagnosis of abnormal cell growth. In one embodiment of this method, the abnormal cell growth is cancer, including, but not limited to, mesothelioma, hepatobilliary (hepatic and billiary duct), a primary or secondary CNS tumor, a primary or secondary brain tumor, lung cancer (NSCLC and SCLC), bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, prostate cancer, testicular cancer, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, non hodgkins's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, multiple myeloma, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the foregoing cancers.

[0036] The disclosure also provides methods for making "second generation" anti-α5β1 antibodies based on the sequences of the anti-α5β1 antibodies provided herein. For example, the disclosure provides a method for preparing an anti-α5β1 antibody comprising: (a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence as shown in SEQ ID NOs: 1, 13, 23, or 33, a CDR2 sequence as shown in SEQ ID

NO: 2, 14, 24, or 34 and/or a CDR3 sequence as shown in SEQ ID NO: 3, 15, 25, or 35; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence as shown in SEQ ID NOs: 4, 16, 26, or 36, a CDR2 sequence as shown in SEQ ID NOs: 5, 17, 27, or 37 and/or a CDR3 sequence as shown in SEQ ID NOs: 6, 18, 28, or 38; (b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and (c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

[0037] Other features and advantages of the instant disclosure will be apparent from the following detailed description and examples which should not be construed as limiting. The contents of all references, Genbank entries, patents and published patent applications cited throughout this specification are expressly incorporated herein by reference.

Brief Description of the Drawings

[0038] Figure 1A shows the DNA sequence of the 22B5 heavy chain variable region (SEQ ID NO:11); Figure 1B shows the amino acid sequence of the 22B5 heavy chain variable region (SEQ ID NO:7) - CDR regions are underlined; Figure 1C shows the DNA sequence of the 22B5 light chain variable region (SEQ ID NO:12); Figure 1D shows the amino acid sequence of the 22B5 light chain variable region (SEQ ID NO:8) - CDR regions are underlined; Figure 1E shows the DNA sequence of the 24C7 heavy chain variable region (SEQ ID NO:21); Figure 1F shows the amino acid sequence of the 24C7 heavy chain variable region (SEQ ID NO:19) - CDR regions are underlined; Figure 1G shows the DNA sequence of the 24C7 light chain variable region (SEQ ID NO:22); Figure 1H shows the amino acid sequence of the 24C7 light chain variable region (SEQ ID NO:20) - CDR regions are underlined; Figure 1I shows the DNA sequence of the 1D9 heavy chain variable region (SEQ ID NO:31); Figure 1J shows the amino acid sequence of the 1D9 heavy chain variable region (SEQ ID NO:29) - CDR regions are underlined. Figure 1K shows the DNA sequence of the 1D9 light chain variable region (SEQ ID NO:32); Figure 1L shows the amino acid sequence of the 1D9 light chain variable region (SEQ ID NO:30) - CDR regions are underlined; Figure 1M shows the DNA sequence of the 2D2 heavy chain variable region (SEQ ID NO:41); Figure 1N shows the amino acid sequence of the 2D2 heavy chain variable region (SEQ ID NO:39) - CDR regions are underlined; Figure 1O shows the DNA sequence

of the 2D2 light chain variable region (SEQ ID NO:42); Figure 1P shows the amino acid sequence of the 2D2 light chain variable region (SEQ ID NO:40) - CDR regions are underlined; Figure 1Q shows the amino acid sequence of the IgG1 heavy chain constant region with mutations S247D, A338L, and I340E underlined; and Figure 1R shows the amino acid sequence of the IgG1 light chain constant region.

[0039] Figure 2 shows the alignment of the 22B5 heavy chain variable domain (V_H) with the corresponding germline sequence. Also shown is the alignment of the 22B5 light chain variable domain (V_K) with the corresponding germline sequence. CDR regions are underlined, identical residues are represented by dashes and dots indicate deletions.

[0040] Figure 3 shows an overlay of the sensorgrams obtained by injecting various concentrations of $\alpha 5\beta 1$ recombinant extracellular domain over immobilized 22B5/DLE. This data was collected in the presence of 4.0 mM $CaCl_2$. The order of injections was from low to high concentration.

[0041] Figure 4 shows dose-dependent binding of 22B5/DLE to HUVEC by FACS.

[0042] Figure 5 shows equilibrium dissociation constants comparing human and mouse Fcγ receptors. "wt" refers to 22B5 wild type IgG1; "DLE" refers to 22B5/DLE.

[0043] Figure 6 shows the results of a HUVEC cellular adhesion blockade assay. The results indicate the level of inhibition of HUVEC adhesion to fibronectin for 22B5 and various subclass variants as well as the negative control (BHA2 IgG1). The calculated IC_{50} values are also shown.

[0044] Figure 7 shows human α5 expression from HUVEC and 20 tumor cell lines measured by Western Blotting.

[0045] Figure 8 shows in-vitro ADCC induced by 22B5/DLE compared with 22B5 wt IgG1. Figure 8A shows a LDH-based detection assay measuring ADCC of U87MG cells in the presence of human PBMCs by 22B5/DLE and 22B5 wt IgG1. Figure 8B shows a ToxiLight-based detection assay measuring ADCC of HUVECs in the presence of human PBMCs by 22B5/DLE and 22B5 wt IgG1.

[0046] Figure 9 shows LDH-based detection assays that indicate substantial ADCC enhancement from 22B5/DLE over wt 22B5 IgG1 across a broad range of antigen expression levels.

[0047] Figure 10 shows the inhibition activity of 22B5/DLE in the A549-Luc experimental metastasis model. Figure 10A: Lung metastasis volume measured by BLI at week 8 (n=11 for the control group, n=14 for the 22B5 IgG2 group and n=12 for the 22B5/DLE group). Figure 10B: Regrowth of lung tumors in the 22B5 IgG2 treated group after dosing was stopped. By comparison, the 22B5/DLE treated group showed little regrowth. Figure 10C: Kaplan-Meier Plot of animal survival rate of each treatment group (endpoint = BLI $1x10^8$ photons/second), $p< 0.0001$ for control vehicle group comparing to all other groups, and $p<0.05$ for comparison between 22B5/DLE and 22B5 IgG2 groups.

[0048] Figure 11 shows dose-dependent binding of 1D9, 1D9/DLE, 24C7/DLE, 2D2/DLE, 22B5, and 22B5/DLE to HUVEC by FACS.

[0049] Figure 12 shows in-vitro ADCC induced by 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE, and 24C7/DLE.

[0050] Figure 13 shows ADCC-dependent anti-tumor efficacy of 1D9/DLE in a syngeneic model of metastatic melanoma. Figure 13A: Gross appearance of lungs resected from all groups. Figure 13B: Quantitation of lung weight (* $p<0.05$, 1D9 IgG1 DLE vs 1D9 IgG2). Figure 13C: Quantitation of the numbers of metastatic colonies visible on the lung surface. Statistical analysis by ANOVA and Bonferroni's multiple comparison test (* $p<0.05$, 1D9 IgG1 DLE vs 1D9 IgG2; * $p<0.05$, 1D9 IgG1 DLE vs anti-KLH IgG2).

Detailed Description

[0051] The present disclosure relates to isolated monoclonal antibodies, particularly human monoclonal antibodies, that bind specifically to $\alpha5\beta1$ with high affinity. In certain cases, the antibodies of the disclosure are derived from particular heavy and light chain germline sequences and/or comprise particular structural features such as CDR regions comprising particular amino acid sequences. The disclosure provides isolated antibodies, methods of making such antibodies, immunoconjugates and bispecific molecules comprising such antibodies and pharmaceutical compositions containing the antibodies, immunoconjugates or bispecific molecules of the disclosure. The disclosure also relates to methods of using the antibodies, such as to detect $\alpha5\beta1$, as well as to treat diseases associated with expression of $\alpha5\beta1$, such as abnormal cell growth (e.g. cancer). Accordingly, the disclosure also provides methods of using the anti-$\alpha5\beta1$ antibodies or antigen binding portions thereof to treat various types of abnormal cell growth, such as cancer.

[0052] In order that the present disclosure may be more readily understood, certain terms are first defined. Additional definitions are set forth throughout the detailed description.

[0053] Unless otherwise defined herein, scientific and technical terms used in connection with the present disclosure shall have the meanings that are commonly understood by those of ordinary skill in the art. Further, unless otherwise required by context, singular terms shall include pluralities and plural terms shall include the singular. Generally, nomenclatures used in connection with, and techniques of, cell and tissue culture, molecular biology, immunology, microbiology, genetics and protein and nucleic acid chemistry and hybridization described herein are those well known and commonly used in the art.

[0054] The methods and techniques of the present disclosure are generally performed according to methods well known in the art and as described in various general and more specific references that are cited and discussed throughout the present specification unless otherwise indicated. Such references include, *e.g.*, Sambrook and Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001), Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (2002), and Harlow and Lane *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990). Enzymatic reactions and purification techniques are performed according to manufacturer's specifications, as commonly accomplished in the art or as described herein. The nomenclatures used in connection with, and the laboratory procedures and techniques of, analytical chemistry, synthetic organic chemistry, and medicinal and pharmaceutical chemistry described herein are those well known and commonly used in the art. Standard techniques are used for chemical syntheses, chemical analyses, pharmaceutical preparation, formulation, and delivery, and treatment of patients.

[0055] As used herein, each of the following terms has the meaning associated with it in this section.

[0056] The articles "a" and "an" are used herein to refer to one or to more than one (*i.e.*, to at least one) of the grammatical object of the article. By way of example, "an element" means one element or more than one element.

[0057] As used herein, the twenty conventional amino acids and their abbreviations follow conventional usage. See *Immunology--A Synthesis* (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

[0058] The terms "α5β1" and "integrin α5β1" are used interchangeably, and include variants, isoforms and species homologs of human α5β1. Native human α5β1, for example, is made up of the α5 subunit (which derives from a precursor sequence that is subsequently cleaved into two chains that are linked by a disulfide bond) (Genbank Accession No. P08648) and a β1 subunit (which derives from a precursor sequence that is subsequently processed into a mature form) (Genbank Accession No. P05556-1). The β1 subunit is known to exist as several isoforms produced by alternative splicing (see, e.g., Genbank Accession Nos. P05556-2, P05556-3, P05556-4, and P05556-5). The human α5β1 antibodies of the disclosure may, in certain cases, cross-react with α5β1 from species other than human. In other cases, the antibodies may be completely specific for human α5β1 and may not exhibit species or other types of cross-reactivity.

[0059] An "immune response", as would be understood by the skilled artisan, includes, but is not limited to, any detectable antigen-specific or allogenic activation of a helper T cell or cytotoxic T cell response, production of antibodies, T cell-mediated activation of allergic reactions, and the like. The term encompasses the action of, for example, lymphocytes, antigen presenting cells, phagocytic cells, granulocytes, and soluble macromolecules produced by the above cells or the liver (including antibodies, cytokines, and complement) that results in selective damage to, destruction of, or elimination from the human body of invading pathogens, cells or tissues infected with pathogens, cancerous cells, or, in cases of autoimmunity or pathological inflammation, normal human cells or tissues.

[0060] A "signal transduction pathway" refers to the biochemical relationship between a variety of signal transduction molecules that play a role in the transmission of a signal from one portion of a cell to another portion of a cell. As used herein, the phrase "cell surface receptor" includes, for example, molecules and complexes of molecules capable of receiving a signal and the transmission of such a signal across the plasma membrane of a cell. An example of a "cell surface receptor" of the present disclosure is the α5β1 integrin.

[0061] The term "antibody" as referred to herein includes whole antibodies and any antigen binding fragment (*i.e.*, "antigen-binding portion") or single chains thereof. An

"antibody" refers to a glycoprotein comprising at least two heavy (H) chains and two light (L) chains inter-connected by disulfide bonds, or an antigen binding portion thereof. Each heavy chain is comprised of a heavy chain variable region (abbreviated herein as V_H) and a heavy chain constant region. The heavy chain constant region is comprised of three domains, C_{H1}, C_{H2} and C_{H3}. Each light chain is comprised of a light chain variable region (abbreviated herein as V_L) and a light chain constant region. The light chain constant region is comprised of one domain, C_L. The V_H and V_L regions can be further subdivided into regions of hypervariability, termed complementarity determining regions (CDR), interspersed with regions that are more conserved, termed framework regions (FR). Each V_H and V_L is composed of three CDRs and four FRs, arranged from amino-terminus to carboxy-terminus in the following order: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. The variable regions of the heavy and light chains contain a binding domain that interacts with an antigen. The constant regions of the antibodies may mediate the binding of the immunoglobulin to host tissues or factors, including various cells of the immune system (*e.g.*, effector cells) and the first component (Clq) of the classical complement system. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 10 or more amino acids. See generally, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

[0062] The term "antigen-binding portion" of an antibody (or simply "antibody portion"), as used herein, refers to one or more fragments of an antibody that retain the ability to specifically bind to an antigen (*e.g.*, $\alpha5\beta1$). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L, V_H, C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody, (v) a dAb fragment (Ward *et al.*, (1989) *Nature* 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementarity determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H, are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be

made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv); *see e.g.,* Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; and Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883*)*. Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. These antibody fragments may be obtained using any suitable technique, including conventional techniques known to those with skill in the art, and the fragments may be screened for utility in the same manner as are intact antibodies.

[0063] An "isolated antibody", as used herein, is intended to refer to an antibody that is substantially free of other antibodies having different antigenic specificities (*e.g.*, an isolated antibody that specifically binds α5β1 is substantially free of antibodies that specifically bind antigens other than α5β1). An isolated antibody that specifically binds α5β1 may, however, have cross-reactivity to other antigens, such as α5β1 molecules from other species. Moreover, an isolated antibody may be substantially free of other cellular material and/or chemicals.

[0064] The terms "monoclonal antibody" or "monoclonal antibody composition" as used herein refer to a preparation of antibody molecules of single molecular composition. A monoclonal antibody composition displays a single binding specificity and affinity for a particular epitope.

[0065] The terms "human antibody", or "fully human antibody", as used herein, are intended to include antibodies having variable regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. Furthermore, if the antibody contains a constant region, the constant region also is derived from human germline immunoglobulin sequences. The human antibodies of the disclosure or antigen binding portions thereof may include amino acid residues not encoded by human germline immunoglobulin sequences (*e.g.*, mutations introduced by random or site-specific mutagenesis *in vitro* or by somatic mutation *in vivo*). However, the term "human antibody", as used herein, is not intended to include antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences.

[0066] The terms "human monoclonal antibody" or "fully human monoclonal antibody" refer to antibodies displaying a single binding specificity which have variable

regions in which both the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In one embodiment, the human monoclonal antibodies are produced by a hybridoma which includes a B cell obtained from a transgenic nonhuman animal, *e.g.*, a transgenic mouse, having a genome comprising a human heavy chain transgene and a light chain transgene, where the B cell is fused to an immortalized cell.

[0067] The term "recombinant human antibody", as used herein, includes all human antibodies that are prepared, expressed, created or isolated by recombinant means, such as (a) antibodies isolated from an animal (*e.g.*, a mouse) that is transgenic or transchromosomal for human immunoglobulin genes or a hybridoma prepared therefrom (described further below), (b) antibodies isolated from a host cell transformed to express the human antibody, *e.g.*, from a transfectoma, (c) antibodies isolated from a recombinant, combinatorial human antibody library, and (d) antibodies prepared, expressed, created or isolated by any other means that involve splicing of human immunoglobulin gene sequences to other DNA sequences. Such recombinant human antibodies have variable regions in which the framework and CDR regions are derived from human germline immunoglobulin sequences. In certain embodiments, however, such recombinant human antibodies can be subjected to *in vitro* mutagenesis (or, when an animal transgenic for human Ig sequences is used, *in vivo* somatic mutagenesis) and thus the amino acid sequences of the V_H and V_L regions of the recombinant antibodies are sequences that, while derived from and related to human germline V_H and V_L sequences, may not naturally exist within the human antibody germline repertoire *in vivo*.

[0068] As used herein, "isotype" or "class" refers to the antibody class (*e.g.*, IgM or IgG) that is encoded by the heavy chain constant region genes. The constant domains of antibodies are not involved in binding to antigen, but exhibit various effector functions. Depending on the amino acid sequence of the heavy chain constant region, a given human antibody or immunoglobulin can be assigned to one of five major classes of immunoglobulins: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. The structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well-known. Of the various human immunoglobulin classes, only human IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, and IgM are known to activate complement. Human IgG1 and IgG3 are known to mediate ADCC in humans.

[0069] As used herein, "subclass" refers to the further specification within an isotype of the heavy chain constant region gene, such as, for example, the IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4 subclasses within the IgG isotype.

[0070] As used herein, the term "compound" or "pharmaceutical compound" includes antibodies, antigen-binding portions thereof, immunoconjugates, and bispecific molecules.

[0071] The phrases "an antibody recognizing an antigen" and "an antibody specific for an antigen" are used interchangeably herein with the term "an antibody which binds specifically to an antigen."

[0072] The term "antibody dependent cellular cytotoxicity" or "ADCC" refers to a cell-mediated reaction in which non-specific cytotoxic cells (e.g. NK cells, neutrophils, macrophages, etc.) recognize antibody bound on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. Such cytotoxic cells that mediate ADCC generally express Fc receptors (FcR). The primary cells for mediating ADCC (NK cells) express FcγRIII, whereas monocytes express FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and/or FcγRIV. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in U.S. Pat. Nos. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecules of interest may be assessed *in vivo*, e.g., in an animal model such as that disclosed in Clynes et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* (USA), 95:652-656 (1998).

[0073] The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody where the Fc region comprises a hinge region and the C_H2 and C_H3 domains of the heavy chain. For example, the FcR can be a native sequence human FcR. The FcR can be one that binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcγRIV subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. FcγRII receptors include FcγRIIA (an "activating receptor") and FcγRIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor FcγRIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its

cytoplasmic domain. Inhibiting receptor FcγRIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain (see, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.*, 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.*, 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods*, 4:25-34 (1994); and de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.*, 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer et al., *Immunol.*, 117:587 (1976) and Kim et al., J. Immunol., 24:249 (1994)). The primary FcR binding site on immunoglobulin Fc fragments resides in the hinge region between the C_H1 and C_H2 domains. This hinge region interacts with the FcR1-3 on various leukocytes and triggers these cells to attack the target (Wines et al., *J. Immunol.*, 164:5313-5318 (2000)). The hinge region encompasses, but is no limited to, the sequences described in U.S. Patent No. 6,165,476.

[0074] The term "capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity" refers to the ability of an agent, such as an antibody, to demonstrate ADCC as measured by assay(s) known to those of skill in the art. Such activity is typically characterized by the binding of the Fc region with various FcRs. Without being limited by any particular mechanism, those of skill in the art will recognize that the ability of an antibody to demonstrate ADCC can be, for example, by virtue of it subclass (such as IgG1 or IgG3), by mutations introduced into the Fc region, or by virtue of modifications to the carbohydrate patterns in the Fc region of the antibody. Such modifications are described, for example, in U.S. Patent Publication No. 2007-0092521.

[0075] The term "human antibody derivatives" refers to any modified form of the human antibody, *e.g.*, a conjugate of the antibody and another agent or antibody.

[0076] The term "humanized antibody" is intended to refer to antibodies in which CDR sequences derived from the germline of another mammalian species, such as a mouse, have been grafted onto human framework sequences. Additional framework region modifications may be made within the human framework sequences.

[0077] The term "chimeric antibody" is intended to refer to antibodies in which the variable region sequences are derived from one species and the constant region sequences are derived from another species, such as an antibody in which the variable region sequences are

derived from a mouse antibody and the constant region sequences are derived from a human antibody.

[0078] By the phrase "specifically binds," as used herein, is meant a compound, *e.g.*, a protein, a nucleic acid, an antibody, and the like, which recognizes and binds a specific molecule, but does not substantially recognize or bind other molecules in a sample. For instance, an antibody or a peptide inhibitor which recognizes and binds a cognate ligand (*e.g.*, an anti-α5β1 antibody that binds with its cognate antigen, α5β1) in a sample, but does not substantially recognize or bind other molecules in the sample. Thus, under designated assay conditions, the specified binding moiety (*e.g.*, an antibody or an antigen-binding portion thereof) binds preferentially to a particular target molecule, *e.g.*, α5β1, and does not bind in a significant amount to other components present in a test sample. A variety of assay formats may be used to select an antibody that specifically binds a molecule of interest. For example, solid-phase ELISA immunoassay, immunoprecipitation, BIAcore, FACS, and Western blot analysis are among many assays that may be used to identify an antibody that specifically reacts with α5β1. Typically, a specific or selective reaction will be at least twice the background signal or noise and more typically more than 10 times the background, even more specifically, an antibody is said to "specifically bind" an antigen when the equilibrium dissociation constant (K_D) is ≤ 1 μM, for example ≤ 100 nM and, further for example, ≤ 10 nM.

[0079] As used herein, an antibody that "specifically binds to human integrin α5β1" is intended to refer to an antibody that binds to human integrin α5β1 with a K_D of 1×10^{-7} M or less, 5×10^{-8} M or less, 3×10^{-8} M or less, 1×10^{-8} M or less, or 5×10^{-9} M or less.

[0080] The term "k_{on}", as used herein, is intended to refer to the on-rate, or association rate of a particular antibody-antigen interaction, whereas the term "k_{off}," as used herein, is intended to refer to the off-rate, or dissociation rate of a particular antibody-antigen interaction. The term "K_D", as used herein, is intended to refer to the dissociation constant, which is obtained from the ratio of k_{off} to k_{on} (*i.e.*, k_{off}/k_{on}) and is expressed as a molar concentration (M). K_D values for antibodies can be determined using methods well established in the art. One method for determining the K_D of an antibody is by using surface plasmon resonance, typically using a biosensor system such as a Biacore® system.

[0081] As used herein, the term "high affinity" for an IgG antibody refers to an antibody having a K_D of 1 x 10^{-7} M or less, 5 x 10^{-8} M or less, or 5 x 10^{-9} M or less for a target antigen. However, "high affinity" binding can vary for other antibody isotypes. For example, "high affinity" binding for an IgM isotype refers to an antibody having a K_D of 10^{-6} M or less, 10^{-7} M or less, or 10^{-8} M or less.

[0082] The term "compete", as used herein with regard to an antibody, refers to when a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, competes for binding with a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, where binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s). For instance, cross-competing antibodies can bind to the epitope, or portion of the epitope, to which the antibodies as disclosed herein bind. Use of both competing and cross-competing antibodies is encompassed by the present disclosure. Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (*e.g.*, steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof, and the like), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies are encompassed and can be useful for the methods disclosed herein.

[0083] The term "epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor. Epitopic determinants usually consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or sugar side chains and usually have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. Conformational and nonconformational epitopes are distinguished in that the binding to the former, but not the latter, is lost in the presence of denaturing solvents.

[0084] "Glycoform" refers to a complex oligosaccharide structure comprising linkages of various carbohydrate units. Such structures are described in, *e.g.*, *Essentials of Glycobiology* Varki et al., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), which also provides a review of standard glycobiology nomenclature. Such glycoforms include, but are not limited to, G2, G1, G0, G-1, and G-2 (*see, e.g.*, International Patent Publication No. WO 99/22764).

[0085] "Glycosylation pattern" is defined as the pattern of carbohydrate units that are covalently attached to a protein (*e.g.*, the glycoform) as well as to the site(s) to which the glycoform(s) are covalently attached to the peptide backbone of a protein, more specifically to an immunoglobulin protein.

[0086] It is likely that antibodies expressed by different cell lines or in transgenic animals will have different glycoforms and/or glycosylation patterns compared with each other. However, all antibodies encoded by the nucleic acid molecules provided herein, or comprising the amino acid sequences provided herein are part of the present disclosure, regardless of the glycosylation of such antibodies.

[0087] As used herein, the term "subject" includes any human or nonhuman animal. The term "nonhuman animal" includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as nonhuman primates, sheep, dogs, cats, horses, cows, chickens, amphibians, reptiles, *etc.*

[0088] As used herein, to "treat" means reducing the frequency with which symptoms of a disease (*i.e.*, tumor growth and/or metastasis, or other effect mediated by the numbers and/or activity of immune cells, and the like) are experienced by a patient. The term includes the administration of the compounds or agents of the present disclosure to prevent or delay the onset of the symptoms, complications, or biochemical indicia of a disease, alleviating the symptoms or arresting or inhibiting further development of the disease, condition, or disorder. Treatment may be prophylactic (to prevent or delay the onset of the disease, or to prevent the manifestation of clinical or subclinical symptoms thereof) or therapeutic suppression or alleviation of symptoms after the manifestation of the disease.

[0089] Various aspects of the disclosure are described in further detail in the following subsections.

Anti-α5β1 Antibodies

[0090] The antibodies of the disclosure are characterized by particular functional features or properties of the antibodies. For example, the antibodies bind specifically to human α5β1. Preferably, an antibody of the disclosure binds to α5β1 with high affinity, for example with a K_D of 1 x 10^{-7} M or less.

[0091] Preferably, the antibody binds to human α5β1 with a K_D of 5 x 10^{-8} M or less, 2 x 10^{-8} M or less, 5x10^{-9} M or less, 4x10^{-9} M or less, 3x10^{-9} M or less, or 2.7 x 10^{-9} M or less. Assays to evaluate the binding ability of the antibodies toward α5β1 are known in the art, including for example, ELISAs, Western blots, RIAs, and flow cytometry analysis. Suitable assays are described in detail in the Examples. The binding kinetics (*e.g.*, binding affinity) of the antibodies also can be assessed by assays known in the art, such as by Biacore analysis.

[0092] The anti-α5β1 antibodies of the present disclosure are also capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC). Such functionality can be achieved, for example, by the use of a specific subclass (e.g. IgG1, IgG2, IgG3), including mutations to the Fc domain that can further enhance the level of ADCC activity of an antibody. Such mutations and methods of measuring ADCC are described further in the Examples.

Monoclonal Antibody 22B5

[0093] One illustrative antibody of the disclosure is the human monoclonal antibody 22B5, as described in Examples 1 and 2. The V_H amino acid sequence of 22B5 is shown in Figure 1B and is set forth in SEQ ID NO:7. The V_L amino acid sequence of 22B5 is shown in Figure 1D and is set forth in SEQ ID NO:8. As shown in Figure 1B and Figure 2, the heavy chain variable region of 22B5 comprises two mutations back to the human germline gene sequence. That is, 22B5 comprises one mutation from isoleucine to serine at amino acid residue number 30 (I30S) and a mutation from asparagine to serine at amino acid residue number 33 (N33S). As used herein, "22B5" refers to the antibody wherein said I30S and N33S heavy chain variable region germline mutations have been made.

[0094] Given that 22B5 can bind to α5β1, the V_H and V_L sequences can be "mixed and matched" with other anti-α5β1 antibodies to create additional anti-α5β1 binding molecules of the disclosure. α5β1 binding of such "mixed and matched" antibodies can be

tested using the binding assays described above and in the Examples (*e.g.*, ELISAs). In one case, when V_H and V_L chains are mixed and matched, a V_H sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_H sequence. Likewise, in another case a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_L sequence.

[0095] In another aspect, the disclosure provides antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s and CDR3s of 22B5. The amino acid sequence of the V_H CDR1 of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 1. The amino acid sequence of the V_H CDR2 of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 2. The amino acid sequence of the V_H CDR3 of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 3. The amino acid sequence of the V_L CDR1 of 22B5 is shown in SEQ ID NO 4. The amino acid sequence of the V_L CDR2 of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 5. The amino acid sequence of the V_L CDR3 of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 6. The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

[0096] Given that 22B5 binds to $\alpha5\beta1$ and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, the V_H CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and V_L CDR1, CDR2, and CDR3 sequences can be "mixed and matched" (*i.e.*, CDRs from different $\alpha5\beta1$antibodies can be mixed and matched, although each antibody will typically contain a V_H CDR1, CDR2, and CDR3 and a V_L CDR1, CDR2, and CDR3) to create additional anti-$\alpha5\beta1$ binding molecules of the disclosure. $\alpha5\beta1$ binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays described above and in the Examples (*e.g.*, ELISAs, Biacore analysis). In one case, when V_H CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_H sequence is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when V_L CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_L sequence typically is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel V_H and V_L sequences can be created by substituting one or more V_H and/or V_L CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences disclosed herein.

[0097] Accordingly, in another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising: (a) a heavy chain

variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3; (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4; (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 5; and/or (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 6; wherein the antibody specifically binds α5β1, preferably human α5β1.

Monoclonal Antibodies 2D2, 24C7 and 1D9

[0098] Another illustrative antibody of the disclosure is the human monoclonal antibody 2D2, described in Examples 1 and 8. The V_H amino acid sequence of 2D2 is shown in SEQ ID NO: 39. The V_L amino acid sequence of 2D2 is shown in SEQ ID NO: 40.

[0099] Another illustrative antibody of the disclosure is the human monoclonal antibody 24C7, described in Examples 1 and 8. The V_H amino acid sequence of 24C7 is shown in SEQ ID NO: 19. The V_L amino acid sequence of 24C7 is shown in SEQ ID NO: 20.

[0100] Another illustrative antibody of the disclosure is the human monoclonal antibody 1D9, described in Examples 1 and 8. The V_H amino acid sequence of 1D9 is shown in SEQ ID NO: 29. The V_L amino acid sequence of 1D9 is shown in SEQ ID NO: 30.

[0101] Given that 2D2, 24C7, and 1D9 can bind to α5β1, the V_H and V_L sequences of these antibodies can be "mixed and matched" with other anti-α5β1 antibodies to create additional anti-α5β1 binding molecules of the disclosure. α5β1 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays described above and in the Examples (*e.g.*, ELISAs). In one case, when V_H and V_L chains are mixed and matched, a V_H sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_H sequence. Likewise, in another case a V_L sequence from a particular V_H/V_L pairing is replaced with a structurally similar V_L sequence.

[0102] In another aspect, the disclosure provides antibodies that comprise the heavy chain and light chain CDR1s, CDR2s and CDR3s of 2D2, 24C7, and 1D9. The corresponding amino acid sequences of these CDRs are indicated below.

Antibody	CDR	SEQ ID NO:		Antibody	CDR	SEQ ID NO:
2D2	V_H CDR1	33		24C7	V_L CDR1	16
2D2	V_H CDR2	34		24C7	V_L CDR2	17
2D2	V_H CDR3	35		24C7	V_L CDR3	18
2D2	V_L CDR1	36		1D9	V_H CDR1	23
2D2	V_L CDR2	37		1D9	V_H CDR2	24
2D2	V_L CDR3	38		1D9	V_H CDR3	25
24C7	V_H CDR1	13		1D9	V_L CDR1	26
24C7	V_H CDR2	14		1D9	V_L CDR2	27
24C7	V_H CDR3	15		1D9	V_L CDR3	28

The CDR regions are delineated using the Kabat system (Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

[0103] Given that 2D2, 24C7 and 1D9 bind to α5β1 and that antigen-binding specificity is provided primarily by the CDR1, CDR2, and CDR3 regions, the V_H CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and V_L CDR1, CDR2, and CDR3 sequences can be "mixed and matched" (*i.e.*, CDRs from different α5β1antibodies can be mixed and matched, although each antibody will typically contain a V_H CDR1, CDR2, and CDR3 and a V_L CDR1, CDR2, and CDR3) to create additional anti-α5β1 binding molecules of the disclosure. α5β1 binding of such "mixed and matched" antibodies can be tested using the binding assays described above and in the Examples (*e.g.*, ELISAs, Biacore analysis). In one case, when V_H CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_H sequence is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). Likewise, when V_L CDR sequences are mixed and matched, the CDR1, CDR2 and/or CDR3 sequence from a particular V_L sequence typically is replaced with a structurally similar CDR sequence(s). It will be readily apparent to the ordinarily skilled artisan that novel V_H and V_L sequences can be created by substituting one or more V_H and/or V_L CDR region sequences with structurally similar sequences from the CDR sequences disclosed herein.

[0104] Accordingly, in another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising: (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 33; (b) a heavy

chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 34; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 35; (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 36; (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 37; and/or (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 38; wherein the antibody specifically binds α5β1, preferably human α5β1.

[0105] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising: (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15; (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16; (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17; and/or (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 18; wherein the antibody specifically binds α5β1, preferably human α5β1.

[0106] In another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof comprising: (a) a heavy chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 23; (b) a heavy chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 24; (c) a heavy chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 25; (d) a light chain variable region CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 26; (e) a light chain variable region CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 27; and/or (f) a light chain variable region CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 28; wherein the antibody specifically binds α5β1, preferably human α5β1.

Antibodies Having Particular Germline Sequences

[0107] In certain aspects, an antibody of the disclosure comprises a heavy chain variable region from a particular germline heavy chain immunoglobulin gene and/or a light chain variable region from a particular germline light chain immunoglobulin gene.

[0108] For example, in one aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 4-39 gene, wherein the antibody

specifically binds α5β1. In another aspect, the disclosure provides and isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human V_H 3-30.3 gene, wherein the antibody specifically binds α5β1. In yet another aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, comprising a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene, wherein the antibody specifically binds α5β1. In yet another illustrative aspect, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen-binding portion thereof, wherein the antibody:

(a) comprises a heavy chain variable region that is the product of or derived from a human VH 4-39 gene (which gene encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7) or a human 3-30.3 gene (which gene encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 19, 29, or 39);

(b) comprises a light chain variable region that is the product of or derived from a human V_K L6 gene (which gene encodes the amino acid sequence set forth in SEQ ID NOs: 8, 20, 30, or 40); and

(c) specifically binds to α5β1, preferably human α5β1.

[0109] An example of an antibody having V_H and V_L of V_H 4-39 and V_K L6, respectively, is 22B5. Examples of antibodies having V_H and V_L of V_H 3-30.3 and V_K L6, respectively, are 24C7, 2D2, and 1D9.

[0110] As used herein, a human antibody comprises heavy or light chain variable regions that is "the product of" or "derived from" a particular germline sequence if the variable regions of the antibody are obtained from a system that uses human germline immunoglobulin genes. Such systems include immunizing a transgenic mouse carrying human immunoglobulin genes with the antigen of interest or screening a human immunoglobulin gene library displayed on phage with the antigen of interest. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a human germline immunoglobulin sequence can be identified as such by comparing the amino acid sequence of the human antibody to the amino acid sequences of human germline immunoglobulins and selecting the human germline immunoglobulin sequence that is closest in sequence (*i.e.*, greatest % identity) to the sequence of the human antibody. A human antibody that is "the product of" or "derived from" a particular human germline immunoglobulin sequence may contain amino

acid differences as compared to the germline sequence, due to, for example, naturally-occurring somatic mutations or intentional introduction of site-directed mutation. However, a selected human antibody typically is at least 90% identical in amino acids sequence to an amino acid sequence encoded by a human germline immunoglobulin gene and contains amino acid residues that identify the human antibody as being human when compared to the germline immunoglobulin amino acid sequences of other species (*e.g.*, murine germline sequences). In certain cases, a human antibody may be at least 95%, or even at least 96%, 97%, 98%, or 99% identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene. In certain cases, the human antibody is identical in amino acid sequence to the amino acid sequence encoded by the germline Ig gene. Typically, a human antibody derived from a particular human germline sequence will display no more than 10 amino acid differences from the amino acid sequence encoded by the human germline immunoglobulin gene. In certain cases, the human antibody may display no more than 5, or even no more than 4, 3, 2, or 1 amino acid difference from the amino acid sequence encoded by the germline immunoglobulin gene.

Homologous Antibodies

[0111] In yet another aspect, an antibody of the disclosure comprises heavy and light chain variable regions comprising amino acid sequences that are homologous to the amino acid sequences of the illustrative antibodies described herein, and wherein the antibodies retain the desired functional properties of the anti-$\alpha 5\beta 1$ antibodies of the disclosure.

[0112] For example, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region and a light chain variable region, wherein:

(a) the heavy chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 7, 19, 29, and 39;

(b) the light chain variable region comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to the amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 8, 20, 30, and 40; and the antibody exhibits one or more of the following properties:

(i) the antibody binds to human $\alpha5\beta1$ with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less;

(ii) the antibody is capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity.

[0113] In various examples, the antibody can be, for example, a human antibody, a humanized antibody or a chimeric antibody.

[0114] In other examples, the V_H and/or V_L amino acid sequences may be 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% homologous to the sequences set forth above. An antibody having V_H and V_L regions having high (*i.e.*, 80% or greater) homology to the V_H and V_L regions of the sequences set forth above, can be obtained by mutagenesis (*e.g.*, site-directed or PCR-mediated mutagenesis) of nucleic acid molecules encoding SEQ ID NOs: 7, 19, 29, 39, 8, 20, 30, and/or 40, followed by testing of the encoded altered antibody for retained function (*i.e.*, the properties set forth in (i) and/or (ii) above) using the functional assays described herein.

[0115] As used herein, the percent homology between two amino acid sequences is equivalent to the percent identity between the two sequences. The percent identity between the two sequences is a function of the number of identical positions shared by the sequences (*i.e.*, % homology = # of identical positions/total # of positions x 100), taking into account the number of gaps, and the length of each gap, which need to be introduced for optimal alignment of the two sequences. The comparison of sequences and determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm, as described in the non-limiting examples below.

[0116] The percent identity between two amino acid sequences can be determined using the algorithm of E. Meyers and W. Miller (*Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17 (1988)) which has been incorporated into the ALIGN program (version 2.0), using a PAM120 weight residue table, a gap length penalty of 12 and a gap penalty of 4. In addition, the percent identity between two amino acid sequences can be determined using the Needleman and Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) algorithm which has been incorporated into the GAP program in the GCG software package (available at http://www.gcg.com), using either a Blossum 62 matrix or a PAM250 matrix, and a gap weight of 16, 14, 12, 10, 8, 6, or 4 and a length weight of 1, 2, 3, 4, 5, or 6.

[0117] Additionally or alternatively, the protein sequences of the present disclosure can further be used as a "query sequence" to perform a search against public databases to, for

example, identify related sequences. Such searches can be performed using the XBLAST program (version 2.0) of Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to the antibody molecules of the disclosure. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be utilized as described in Altschul *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. When utilizing BLAST and Gapped BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used. See http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Antibodies with Conservative Modifications

[0118] In certain cases, an antibody of the disclosure comprises a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2 and CDR3 sequences, wherein one or more of these CDR sequences comprise specified amino acid sequences based on the illustrative antibodies described herein (*e.g.*, 22B5, 1D9, 24C7, and 2D2), or conservative modifications thereof, and wherein the antibodies retain one or more of the desired functional properties of the anti-α5β1 antibodies of the disclosure. Accordingly, the disclosure provides an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, wherein:

(a) the heavy chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 15, 25, and 35, and conservative modifications thereof;

(b) the light chain variable region CDR3 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 6, 18, 28, and 38, and conservative modifications thereof; and the antibody exhibits one or more of the following properties:

(i) the antibody binds to human α5β1 with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less;

(ii) the antibody is capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity.

[0119] In other cases, the heavy chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 14, 24, and 34,

and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR2 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 17, 27, and 37, and conservative modifications thereof. In another case, the heavy chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 13, 23, and 33, and conservative modifications thereof; and the light chain variable region CDR1 sequence comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 16, 26, and 36, and conservative modifications thereof.

[0120] As used herein, the term "conservative modification" is intended to refer to amino acid modifications that do not significantly affect or alter the binding characteristics of the antibody containing the amino acid sequence. Such conservative modifications include amino acid substitutions, additions and deletions. Modifications can be introduced into an antibody of the disclosure by standard techniques known in the art, such as site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Conservative modification of a given sequence can include those sequences that are at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95%, at least 97%, at least 98%, or at least 99% identical to that sequence. Conservative amino acid substitutions are ones in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a similar side chain. Families of amino acid residues having similar side chains have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (*e.g.*, lysine, arginine, histidine), acidic side chains (*e.g.*, aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (*e.g.*, glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine, tryptophan), nonpolar side chains (*e.g.*, alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine), beta-branched side chains (*e.g.*, threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (*e.g.*, tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Thus, one or more amino acid residues within the CDR regions of an antibody of the disclosure can be replaced with other amino acid residues from the same side chain family and the altered antibody can be tested for retained function (*i.e.*, the properties set forth in (i) through (ii) above) using the functional assays described herein. Another type of amino acid modification is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In another example, the C-terminal lysine of the heavy chain of an $\alpha 5\beta 1$ antibody of the disclosure has been cleaved, and is thus not present. The C-terminal lysine cleavage can be engineered in advance, or may result

from the conditions used to express and purify the antibody. In various cases, the heavy and light chains of the α5β1 antibodies may optionally include a signal sequence.

Antibodies that Bind the Same Epitope as the Illustrative Anti-α5β1 Antibodies of the Disclosure

[0121] In another aspect, the disclosure provides antibodies that bind to the same epitope on human α5β1 as any of the illustrative α5β1 monoclonal antibodies of the disclosure (*i.e.*, antibodies that have the ability to cross-compete for binding to α5β1 with any of the monoclonal antibodies of the disclosure). For example, the reference antibody for cross-competition studies can be the monoclonal antibody 22B5 (having V_H and V_L sequences as shown in SEQ ID NOs: 7 and 8, respectively), or the monoclonal antibody 24C7 (having V_H and V_L sequences as shown in SEQ ID NOs: 19 and 20, respectively), or the monoclonal antibody 1D9 (having V_H and V_L sequences as shown in SEQ ID NOs: 29 and 30, respectively), or the monoclonal antibody 2D2 (having V_H and V_L sequences as shown in SEQ ID NOs: 39 and 40, respectively). Such cross-competing antibodies can be identified based on their ability to cross-compete with 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2 in standard α5β1 binding assays. For example, BIAcore analysis, ELISA assays or flow cytometry may be used to demonstrate cross-competition with the illustrative antibodies of the current disclosure. The ability of a test antibody to inhibit the binding of, for example, 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2 to human α5β1 demonstrates that the test antibody can compete with 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2 for binding to human α5β1 and thus binds to the same epitope on human α5β1 as 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2. In one case, the antibody that binds to the same epitope on human α5β1 as 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2 is a human monoclonal antibody. Such human monoclonal antibodies can be prepared and isolated as described, for example, in the Examples.

Engineered and Modified Antibodies

[0122] An antibody, or antigen binding portion thereof, of the disclosure further can be prepared using an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences disclosed herein as starting material to engineer a modified antibody, which modified antibody may have altered properties from the starting antibody. An antibody can be engineered by modifying one or more residues within one or both variable regions (*i.e.*, V_H and/or V_L), for example within one or more CDR regions and/or within one or more framework regions.

Additionally or alternatively, an antibody can be engineered by modifying residues within the constant region(s), for example to alter the effector function(s) of the antibody.

[0123] One type of variable region engineering that can be performed is CDR grafting. Antibodies interact with target antigens predominantly through amino acid residues that are located in the six heavy and light chain complementarity determining regions (CDRs). For this reason, the amino acid sequences within CDRs are more diverse between individual antibodies than sequences outside of CDRs. Because CDR sequences are responsible for most antibody-antigen interactions, it is possible to express recombinant antibodies that mimic the properties of specific naturally occurring antibodies by constructing expression vectors that include CDR sequences from the specific naturally occurring antibody grafted onto framework sequences from a different antibody with different properties (see, *e.g.*, Riechmann, L. *et al.* (1998) *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al.* (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C. *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*)

[0124] Accordingly, another aspect of the disclosure pertains to an isolated monoclonal antibody, or antigen binding portion thereof, comprising a heavy chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 13, 23, and 33, SEQ ID NOs: 2, 14, 24, and 34, and SEQ ID NOs: 3, 15, 25, and 35, respectively, and a light chain variable region comprising CDR1, CDR2, and CDR3 sequences comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 16, 26, and 36, SEQ ID NOs: 5, 17, 27, and 37, and SEQ ID NOs: 6, 18, 28, and 38, respectively. Thus, such antibodies contain the V_H and V_L CDR sequences of the monoclonal antibodies 22B5, 24C7, 1D9, and 2D2, yet may contain different framework sequences from these antibodies.

[0125] Such framework sequences can be obtained from public DNA databases or published references that include germline antibody gene sequences. For example, germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be found in the "VBase" human germline sequence database (available on the Internet at www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), as well as in Kabat, E. A., *et al.* (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH

Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., *et al.* (1992), *J. Mol. Biol.* 227:776-798; and Cox, J. P. L. *et al.* (1994), *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; the contents of each of which are expressly incorporated herein by reference). As another example, the germline DNA sequences for human heavy and light chain variable region genes can be found in the Genbank database. For example, the following heavy chain germline sequences found in the HCo7 HuMAb mouse are available in the accompanying Genbank accession numbers: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 and BC070333), 3-33 (NG_0010109 and NT_024637) and 3-7 (NG_0010109 and NT_024637). As another example, the following heavy chain germline sequences found in the HCo12 HuMAb mouse are available in the accompanying Genbank accession numbers: 1-69 (NG_0010109, NT_024637 and BC070333), 5-51 (NG_0010109 and NT_024637), 4-34 (NG_0010109 and NT_024637), 3-30.3 (X92283), and 3-23 (AJ406678).

[0126] Framework sequences for use in the antibodies of the disclosure include, but are not limited to, those that are structurally similar to the framework sequences used by selected antibodies of the disclosure, *e.g.*, similar to the V_H 4-39 and/or the V_H 3-30.3 framework sequences and/or the V_K L6 framework sequences used by illustrative monoclonal antibodies of the disclosure. For example, the V_H CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, and the V_L CDR1, CDR2, and CDR3 sequences, can be grafted onto framework regions that have the identical sequence as that found in the germline immunoglobulin gene from which the framework sequence derive, or the CDR sequences can be grafted onto framework regions that contain one or more mutations as compared to the germline sequences. For example, it has been found that in certain instances it is beneficial to mutate residues within the framework regions to maintain or enhance the antigen binding ability of the antibody (see *e.g.*, U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al*).

[0127] Another type of variable region modification is to mutate amino acid residues within the V_H and/or V_L CDR1, CDR2 and/or CDR3 regions to thereby improve one or more binding properties (*e.g.*, affinity) of the antibody of interest. Site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis can be performed to introduce the mutation(s) and the effect on antibody binding, or other functional property of interest, can be evaluated in *in vitro* or *in vivo* assays as described herein and provided in the Examples. Typically, conservative

modifications (as discussed above) are introduced. The mutations may be amino acid substitutions, additions or deletions. Moreover, typically no more than one, two, three, four or five residues within a CDR region are altered.

[0128] Accordingly, in another embodiment, the disclosure provides isolated anti-α5β1 monoclonal antibodies, or antigen binding portions thereof, comprising a heavy chain variable region comprising: (a) a V_H CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 13, 23, and 33 and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 1, 13, 23, or 33; (b) a V_H CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2, 14, 24, and 34, and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 2, 14, 24, or 34; (c) a V_H CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 15, 25, and 35, and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 3, 15, 25, or 35; (d) a V_L CDR1 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 16, 26, and 36, and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 4, 16, 26, or 36; (e) a V_L CDR2 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 17, 27, and 37, and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 5, 17, 27, or 37; and (f) a V_L CDR3 region comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 6, 18, 28, and 38, and an amino acid sequence having one, two, three, four or five amino acid substitutions, deletions or additions as compared to SEQ ID NOs: 6, 18, 28, or 38.

[0129] Engineered antibodies of the disclosure include those in which modifications have been made to framework residues within V_H and/or V_L, *e.g.*, to improve the properties of the antibody. Typically such framework modifications are made to decrease the immunogenicity of the antibody. For example, one approach is to "backmutate" one or more framework residues to the corresponding germline sequence. More specifically, an antibody that has undergone somatic mutation may contain framework residues that differ

from the germline sequence from which the antibody is derived. Such residues can be identified by comparing the antibody framework sequences to the germline sequences from which the antibody is derived. To return the framework region sequences to their germline configuration, the somatic mutations can be "backmutated" to the germline sequence by, for example, site-directed mutagenesis or PCR-mediated mutagenesis.

[0130] Another type of framework modification involves mutating one or more residues within the framework region, or even within one or more CDR regions, to remove T cell epitopes to thereby reduce the potential immunogenicity of the antibody. This approach is also referred to as "deimmunization" and is described in further detail in U.S. Patent Publication No. 20030153043 by Carr *et al.*

[0131] In addition or alternative to modifications made within the framework or CDR regions, antibodies of the disclosure may be engineered to include modifications within the Fc region, typically to alter one or more functional properties of the antibody, such as serum half-life, complement fixation, Fc receptor binding, and/or antigen-dependent cellular cytotoxicity. Furthermore, an antibody of the disclosure may be chemically modified (*e.g.*, one or more chemical moieties can be attached to the antibody) or be modified to alter its glycosylation, again to alter one or more functional properties of the antibody. Each of these aspects is described in further detail below. The numbering of residues in the Fc region is that of the EU index of Kabat.

[0132] In one case, the hinge region of CH1 is modified such that the number of cysteine residues in the hinge region is altered, *e.g.*, increased or decreased. This approach is described further in U.S. Patent No. 5,677,425 by Bodmer *et al.* The number of cysteine residues in the hinge region of CH1 is altered to, for example, facilitate assembly of the light and heavy chains or to increase or decrease the stability of the antibody.

[0133] In another case, the Fc hinge region of an antibody is mutated to decrease the biological half life of the antibody. More specifically, one or more amino acid mutations are introduced into the CH2-CH3 domain interface region of the Fc-hinge fragment such that the antibody has impaired *Staphylococcyl* protein A (SpA) binding relative to native Fc-hinge domain SpA binding. This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,165,745 by Ward *et al.*

[0134] In another case, the antibody is modified to increase its biological half life. Various approaches are possible. For example, one or more of the following mutations can be introduced: T252L, T254S, T256F, as described in U.S. Patent No. 6,277,375 to Ward. Alternatively, to increase the biological half life, the antibody can be altered within the CH1 or CL region to contain a salvage receptor binding epitope taken from two loops of a CH2 domain of an Fc region of an IgG, as described in U.S. Patent Nos. 5,869,046 and 6,121,022 by Presta *et al.*

[0135] In yet other cases, the Fc region is altered by replacing at least one amino acid residue with a different amino acid residue to alter the effector function(s) of the antibody. For example, one or more amino acids selected from amino acid residues 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has an altered affinity for an effector ligand but retains the antigen-binding ability of the parent antibody. The effector ligand to which affinity is altered can be, for example, an Fc receptor or the C1 component of complement. This approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,624,821 and 5,648,260, both by Winter *et al.*

[0136] In another case, one or more amino acids selected from amino acid residues 329, 331 and 322 can be replaced with a different amino acid residue such that the antibody has altered C1q binding and/or reduced or abolished complement dependent cytotoxicity (CDC). This approach is described in further detail in U.S. Patent No. 6,194,551 by Idusogie *et al.*

[0137] In another example, one or more amino acid residues within amino acid positions 231 and 239 are altered to thereby alter the ability of the antibody to fix complement. This approach is described further in PCT Publication WO 94/29351 by Bodmer *et al.*

[0138] In yet another example, the Fc region is modified to increase the ability of the antibody to mediate antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) and/or to increase the affinity of the antibody for an Fcγ receptor by modifying one or more amino acids at the following positions: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 or 439. This

approach is described further in PCT Publication WO 00/42072 by Presta. Moreover, the binding sites on human IgG1 for FcγR1, FcγRII, FcγRIII and FcRn have been mapped and variants with improved binding have been described (see Shields, R.L. *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604). Specific mutations at positions 256, 290, 298, 333, 334 and 339 were shown to improve binding to FcγRIII. Additionally, the following combination mutants were shown to improve FcγRIII binding: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A and S298A/E333A/K334A. For example, the 22B5/DLE antibody described herein uses the IgG1 subclass of the IgG isotype, but has incorporated the following mutations (as compared to the wild-type IgG1 subclass) through site-directed mutagenesis: S247D; A338L; and I340E. Similarly, as described in more detail below, such S247D, A338L, and I340E mutations have been introduced into the 24C7, 1D9 and 2D2 monoclonal antibodies. As described further in the Examples, such mutations can increase the antibody's affinity to Fcγ receptors and thus increase its effector function. Thus, the disclosure provides an antibody that comprises at least one mutation in the Fc region and has detectably greater ADCC response than an otherwise identical antibody not comprising the at least one mutation.

[0139] In still another example, the glycosylation of an antibody is modified. For example, an aglycoslated antibody can be made (*i.e.*, the antibody lacks glycosylation). Glycosylation can be altered to, for example, increase the affinity of the antibody for antigen. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, altering one or more sites of glycosylation within the antibody sequence. For example, one or more amino acid substitutions can be made that result in elimination of one or more variable region framework glycosylation sites to thereby eliminate glycosylation at that site. Such aglycosylation may increase the affinity of the antibody for antigen. Such an approach is described in further detail in U.S. Patent Nos. 5,714,350 and 6,350,861 by Co *et al.*

[0140] Additionally or alternatively, an antibody can be made that has an altered type of glycosylation, such as a hypofucosylated antibody having reduced amounts of fucosyl residues or an antibody having increased bisecting GlcNac structures. Such altered glycosylation patterns have been demonstrated to increase the ADCC ability of antibodies. Such carbohydrate modifications can be accomplished by, for example, expressing the antibody in a host cell with altered glycosylation machinery. Cells with altered glycosylation machinery have been described in the art and can be used as host cells in which to express

recombinant antibodies of the disclosure to thereby produce an antibody with altered glycosylation. For example, the cell lines Ms704, Ms705, and Ms709 lack the fucosyltransferase gene, FUT8 (alpha (1,6) fucosyltransferase), such that antibodies expressed in the Ms704, Ms705, and Ms709 cell lines lack fucose on their carbohydrates. The Ms704, Ms705, and Ms709 $FUT8^{-/-}$ cell lines were created by the targeted disruption of the FUT8 gene in CHO/DG44 cells using two replacement vectors (see U.S. Patent Publication No. 20040110704 by Yamane *et al.* and Yamane-Ohnuki *et al.* (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). As another example, EP 1,176,195 by Hanai *et al.* describes a cell line with a functionally disrupted FUT8 gene, which encodes a fucosyl transferase, such that antibodies expressed in such a cell line exhibit hypofucosylation by reducing or eliminating the alpha 1,6 bond-related enzyme. Hanai *et al.* also describe cell lines which have a low enzyme activity for adding fucose to the N-acetylglucosamine that binds to the Fc region of the antibody or does not have the enzyme activity, for example the rat myeloma cell line YB2/0 (ATCC CRL 1662). PCT Publication WO 03/035835 by Presta describes a variant CHO cell line, Lec13 cells, with reduced ability to attach fucose to Asn(297)-linked carbohydrates, also resulting in hypofucosylation of antibodies expressed in that host cell (see also Shields, R.L. *et al.* (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). PCT Publication WO 99/54342 by Umana *et al.* describes cell lines engineered to express glycoprotein-modifying glycosyl transferases (*e.g.*, beta(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII)) such that antibodies expressed in the engineered cell lines exhibit increased bisecting GlcNac structures which results in increased ADCC activity of the antibodies (see also Umana *et al.* (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternatively, the fucose residues of the antibody may be cleaved off using a fucosidase enzyme. For example, the fucosidase alpha-L-fucosidase removes fucosyl residues from antibodies (Tarentino, A.L. *et al.* (1975) *Biochem.* 14:5516-23).

[0141] Another modification of the antibodies herein that is contemplated by the disclosure is pegylation. An antibody can be pegylated to, for example, increase the biological (*e.g.*, serum) half life of the antibody. To pegylate an antibody, the antibody, or fragment thereof, typically is reacted with polyethylene glycol (PEG), such as a reactive ester or aldehyde derivative of PEG, under conditions in which one or more PEG groups become attached to the antibody or antibody fragment. Typically, the pegylation is carried out via an

acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive PEG molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer). As used herein, the term "polyethylene glycol" is intended to encompass any of the forms of PEG that have been used to derivatize other proteins, such as mono (C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol or polyethylene glycol-maleimide. In certain cases, the antibody to be pegylated is an aglycosylated antibody. Methods for pegylating proteins are known in the art and can be applied to the antibodies of the disclosure. See for example, EP 0 154 316 by Nishimura *et al.* and EP 0 401 384 by Ishikawa *et al.*

Methods of Engineering Antibodies

[0142] As discussed above, the anti-α5β1 antibodies having V_H and V_L sequences disclosed herein can be used to create new anti-α5β1 antibodies by modifying the V_H and/or V_L sequences, or the constant region(s) attached thereto. Thus, in another aspect of the disclosure, the structural features of an anti-α5β1 antibody of the disclosure, *e.g.* 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2 are used to create structurally related anti-α5β1 antibodies that retain at least one functional property of the antibodies of the disclosure, such as binding to human α5β1. For example, one or more CDR regions of 22B5, 24C7, 1D9, or 2D2, or mutations thereof, can be combined recombinantly with known framework regions and/or other CDRs to create additional, recombinantly-engineered, anti-α5β1 antibodies of the disclosure, as discussed above. Other types of modifications include those described in the previous section. The starting material for the engineering method is one or more of the V_H and/or V_L sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. To create the engineered antibody, it is not necessary to actually prepare (*i.e.*, express as a protein) an antibody having one or more of the V_H and/or V_L sequences provided herein, or one or more CDR regions thereof. Rather, the information contained in the sequence(s) may be used as the starting material to create a "second generation" sequence(s) derived from the original sequence(s) and then the "second generation" sequence(s) is prepared and expressed as a protein.

[0143] Accordingly, in another aspect, the disclosure provides a method for preparing an anti-α5β1 antibody comprising:

(a) providing: (i) a heavy chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1, 13, 23, and 33, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 2,

14, 24, and 34, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 3, 15, 25, and 35; and/or (ii) a light chain variable region antibody sequence comprising a CDR1 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 4, 16, 26, and 36, a CDR2 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 5, 17, 27, and 37, and/or a CDR3 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 6, 18, 28, and 38;

(b) altering at least one amino acid residue within the heavy chain variable region antibody sequence and/or the light chain variable region antibody sequence to create at least one altered antibody sequence; and

(c) expressing the altered antibody sequence as a protein.

[0144] Standard molecular biology techniques can be used to prepare and express the altered antibody sequence.

[0145] Preferably, the antibody encoded by the altered antibody sequence(s) is one that retains one, some or all of the functional properties of the anti-α5β1 antibodies described herein, which functional properties include, but are not limited to:

(i) binds to human α5β1 with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less;

(ii) is capable of inducing ADCC.

[0146] The functional properties of the altered antibodies can be assessed using standard assays available in the art and/or described herein, such as those set forth in the Examples (*e.g.*, flow cytometry, binding assays).

[0147] In certain aspects of the methods of engineering antibodies of the disclosure, mutations can be introduced randomly or selectively along all or part of an anti-α5β1 antibody coding sequence and the resulting modified anti-α5β1 antibodies can be screened for binding activity and/or other functional properties as described herein. Mutational methods have been described in the art. For example, PCT Publication WO 02/092780 by Short describes methods for creating and screening antibody mutations using saturation mutagenesis, synthetic ligation assembly, or a combination thereof. Alternatively, PCT Publication WO 03/074679 by Lazar *et al.* describes methods of using computational screening methods to optimize physiochemical properties of antibodies.

Nucleic Acid Molecules Encoding Antibodies of the Disclosure

[0148] Another aspect of the disclosure pertains to nucleic acid molecules that encode the antibodies of the disclosure. The nucleic acids may be present in whole cells, in a cell lysate, or in a partially purified or substantially pure form. A nucleic acid is "isolated" or "rendered substantially pure" when purified away from other cellular components or other contaminants, *e.g.*, other cellular nucleic acids or proteins, by any suitable techniques, including alkaline/SDS treatment, CsCl banding, column chromatography, agarose gel electrophoresis and others. *See*, F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. A nucleic acid of the disclosure can be, for example, DNA or RNA and may or may not contain intronic sequences. Typically, the nucleic acid is a cDNA molecule.

[0149] Nucleic acids of the disclosure can be obtained using any suitable molecular biology techniques. For antibodies expressed by hybridomas (*e.g.*, hybridomas prepared from transgenic mice carrying human immunoglobulin genes as described further below), cDNAs encoding the light and heavy chains of the antibody made by the hybridoma can be obtained by PCR amplification or cDNA cloning techniques. For antibodies obtained from an immunoglobulin gene library (*e.g.*, using phage display techniques), nucleic acid encoding the antibody can be recovered from the library.

[0150] Nucleic acid molecules of the disclosure include, for example, those encoding the V_H and V_L sequences of the 22B5 monoclonal antibody. The DNA sequence encoding the V_H sequence of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 11. The DNA sequence encoding the V_L sequence of 22B5 is shown in SEQ ID NO: 12. Other illustrative nucleic acid molecules disclosed herein are those encoding the V_H and V_L sequences of the 24C7, 1D9, and 2D2 monoclonal antibodies. The DNA sequence encoding the V_H sequence of 24C7 is shown in SEQ ID NO: 21. The DNA sequence encoding the VL sequence of 24C7 is shown in SEQ ID NO: 22. The DNA sequence encoding the V_H sequence of 1D9 is shown in SEQ ID NO: 31. The DNA sequence encoding the VL sequence of 1D9 is shown in SEQ ID NO: 32. The DNA sequence encoding the V_H sequence of 2D2 is shown in SEQ ID NO: 41. The DNA sequence encoding the VL sequence of 2D2 is shown in SEQ ID NO: 42.

[0151] Once DNA fragments encoding V_H and V_L segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by any suitable recombinant DNA techniques, for

example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes or to a scFv gene. In these manipulations, a V_L- or V_H-encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

[0152] The isolated DNA encoding the V_H region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the V_H-encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., el al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG4 constant region. The IgG1 constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitution in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H-encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region.

[0153] The isolated DNA encoding the V_L region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the V_L-encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, CL. The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see *e.g.*, Kabat, E. A., *et al.* (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region.

[0154] To create a scFv gene, the V_H- and V_L-encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, *e.g.*, encoding the amino acid sequence $(Gly_4\text{-}Ser)_3$, such that the V_H and V_L sequences can be expressed as a

contiguous single-chain protein, with the V_L and V_H regions joined by the flexible linker (see *e.g.*, Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; Huston *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty *et al.*, (1990) *Nature* 348:552-554).

Production of Monoclonal Antibodies of the Disclosure

[0155] Monoclonal antibodies (mAbs) of the present disclosure can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology *e.g.*, the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Other techniques for producing monoclonal antibody also can be employed, *e.g.*, viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

[0156] The preferred animal system for preparing hybridomas is the murine system. Hybridoma production in the mouse is a very well-established procedure. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art. Fusion partners (*e.g.*, murine myeloma cells) and fusion procedures are also known.

[0157] Chimeric or humanized antibodies of the present disclosure can be prepared based on the sequence of a murine monoclonal antibody prepared as described above. DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulins can be obtained from the murine hybridoma of interest and engineered to contain non-murine (*e.g.*, human) immunoglobulin sequences using suitable molecular biology techniques. For example, to create a chimeric antibody, the murine variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly *et al.*). To create a humanized antibody, the murine CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art (see *e.g.*, U.S. Patent No. 5,225,539 to Winter, and U.S. Patent Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 and 6,180,370 to Queen *et al.*).

[0158] In some cases, the antibodies of the disclosure are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against $\alpha 5\beta 1$ can be generated using transgenic or transchromosomic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse system. These transgenic and transchromosomic mice include mice referred to herein as the HuMAb Mouse® and KM Mouse®, respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

[0159] The HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin

sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see *e.g.*, Lonberg, *et al.* (1994) Nature 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ, and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgGκ monoclonal (Lonberg, N. *et al.* (1994), *supra*; reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Preparation and use of the HuMAb Mouse®, and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor, L. *et al.* (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *et al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon *et al.* (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi *et al.* (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. *et al.* (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon *et al.* (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. *et al.* (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851. See further, U.S. Patent Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; all to Lonberg and Kay; U.S. Patent No. 5,545,807 to Surani *et al.*; PCT Publication Nos. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962, all to Lonberg and Kay; and PCT Publication No. WO 01/14424 to Korman *et al.*

[0160] In another case, human antibodies of the disclosure can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and transchomosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome. Such mice, referred to herein as "KM mice™", are described in detail in PCT Publication WO 02/43478 to Ishida *et al.*

[0161] Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-α5β1 antibodies of the disclosure. For example, an alternative transgenic system referred to as the Xenomouse (Abgenix, Inc.) can be used; such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 and 6,162,963 to Kucherlapati *et al.*

[0162] Moreover, alternative transchromosomic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise anti-α5β1 antibodies

of the disclosure. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain transchromosome, referred to as "TC mice" can be used; such mice are described in Tomizuka *et al.* (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Furthermore, cows carrying human heavy and light chain transchromosomes have been described in the art (Kuroiwa *et al.* (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) and can be used to raise anti-α5β1 antibodies of the disclosure.

[0163] Human monoclonal antibodies of the disclosure can also be prepared using phage display methods for screening libraries of human immunoglobulin genes. Such phage display methods for isolating human antibodies are established in the art. See for example: U.S. Patent Nos. 5,223,409; 5,403,484; and 5,571,698 to Ladner *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,427,908 and 5,580,717 to Dower *et al.*; U.S. Patent Nos. 5,969,108 and 6,172,197 to McCafferty *et al.*; and U.S. Patent Nos. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 and 6,593,081 to Griffiths *et al.*

[0164] Human monoclonal antibodies of the disclosure can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. Such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos. 5,476,996 and 5,698,767 to Wilson *et al.*

Immunization of Human Ig Mice

[0165] When human Ig mice are used to raise human antibodies of the disclosure, such mice can be immunized with a purified or enriched preparation of α5β1 antigen and/or recombinant α5β1, or an α5β1 fusion protein, as described by Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild, D. *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; and PCT Publication WO 98/24884 and WO 01/14424. Preferably, the mice will be 6-16 weeks of age upon the first infusion. For example, a purified or recombinant preparation (5-50 μg) of α5β1 antigen can be used to immunize the human Ig mice intraperitoneally. Moreover, polypeptide fragments of the relevant proteins, e.g., α5 and/or β1, may be used to immunize the mice. For example, the polypeptide fragments may be conjugated to a carrier molecule to increase their immunogenicity. Such carrier molecules are well-known in the art, and include keyhole limpet hemocyanin, bovine serum albumin, thyroglobulin, diphtheria toxoid, and tetanus toxoid, among others.

[0166] Detailed procedures to generate fully human monoclonal antibodies to α5β1 are described in Example 1 below. Cumulative experience with various antigens has shown that the transgenic mice respond when initially immunized intraperitoneally (IP) with antigen in complete Freund's adjuvant, followed by every other week IP immunizations (up to a total of 6) with antigen in incomplete Freund's adjuvant. However, adjuvants other than Freund's are also found to be effective. In addition, whole cells in the absence of adjuvant are found to be highly immunogenic. The immune response can be monitored over the course of the immunization protocol with plasma samples being obtained by retroorbital bleeds. The plasma can be screened by ELISA (as described below), and mice with sufficient titers of anti-α5β1 human immunoglobulin can be used for fusions. Mice can be boosted intravenously with antigen 3 days before sacrifice and removal of the spleen. It is expected that 2-3 fusions for each immunization may need to be performed. Between 6 and 24 mice are typically immunized for each antigen. Usually both HCo7 and HCo12 strains are used. In addition, both HCo7 and HCo12 transgene can be bred together into a single mouse having two different human heavy chain transgenes (HCo7/HCo12). Alternatively or additionally, the KM Mouse® strain can be used, as described in Example 1.

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies

[0167] To generate hybridomas producing human monoclonal antibodies of the disclosure, splenocytes and/or lymph node cells from immunized mice can be isolated and fused to an appropriate immortalized cell line, such as a mouse myeloma cell line. The resulting hybridomas can be screened for the production of antigen-specific antibodies. For example, single cell suspensions of splenic lymphocytes from immunized mice can be fused to one-sixth the number of P3X63-Ag8.653 nonsecreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL 1580) with 50% PEG. Cells are plated at approximately 2×10^5 in flat bottom microtiter plate, followed by a two week incubation in selective medium containing 20% fetal Clone Serum, 18% "653" conditioned media, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 units/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin, 50 mg/ml gentamycin and 1X HAT (Sigma; the HAT is added 24 hours after the fusion). After approximately two weeks, cells can be cultured in medium in which the HAT is replaced with HT. Individual wells can then be screened by ELISA for human monoclonal IgM and IgG antibodies. Once extensive hybridoma growth occurs, medium can

be observed usually after 10-14 days. The antibody secreting hybridomas can be replated, screened again, and if still positive for human IgG, the monoclonal antibodies can be subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones can then be cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for characterization.

[0168] To purify human monoclonal antibodies, selected hybridomas can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, N.J.). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD280 using 1.43 extinction coefficient. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80°C.

Generation of Transfectomas Producing Monoclonal Antibodies

[0169] Antibodies of the disclosure also can be produced in a host cell transfectoma using, for example, a combination of recombinant DNA techniques and gene transfection methods as is well known in the art (*e.g.*, Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

[0170] For example, to express the antibodies, or antibody fragments thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, can be obtained by standard molecular biology techniques (*e.g.*, PCR amplification or cDNA cloning using a hybridoma or phage that expresses the antibody of interest) and the DNAs can be inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vector or, more typically, both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by any suitable methods (*e.g.*, ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present). The light and heavy chain variable regions of the antibodies described herein can be used to create full-length antibody genes of any antibody isotype and subclass by inserting

them into expression vectors already encoding heavy chain constant and light chain constant regions of the desired isotype and subclass such that the V_H segment is operatively linked to the C_H segment(s) within the vector and the V_K segment is operatively linked to the C_L segment within the vector. Additionally or alternatively, the recombinant expression vector can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene can be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the antibody chain gene. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (*i.e.*, a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

[0171] In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors of the disclosure typically carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host cell. The term "regulatory sequence" is intended to include promoters, enhancers and other expression control elements (*e.g.*, polyadenylation signals) that control the transcription or translation of the antibody chain genes. Such regulatory sequences are described, for example, in Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). It will be appreciated by those skilled in the art that the design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences, may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired, *etc.* Preferred regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from cytomegalovirus (CMV), Simian Virus 40 (SV40), adenovirus, (*e.g.*, the adenovirus major late promoter (AdMLP) and polyoma. Alternatively, nonviral regulatory sequences may be used, such as the ubiquitin promoter or β-globin promoter. Still further, regulatory elements composed of sequences from different sources, such as the SR promoter system, which contains sequences from the SV40 early promoter and the long terminal repeat of human T cell leukemia virus type 1 (Takebe, Y. *et al.* (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

[0172] In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors of the disclosure may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (*e.g.*, origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into

which the vector has been introduced (see, *e.g.*, U.S. Pat. Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, all by Axel *et al.*). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr- host cells with methotrexate selection/amplification) and the neo gene (for G418 selection).

[0173] For expression of the light and heavy chains, the expression vector(s) encoding the heavy and light chains is transfected into a host cell by any suitable techniques. The various forms of the term "transfection" are intended to encompass a wide variety of techniques commonly used for the introduction of exogenous DNA into a prokaryotic or eukaryotic host cell, *e.g.*, electroporation, calcium-phosphate precipitation, DEAE-dextran transfection and the like. Although it is possible to express the antibodies of the disclosure in either prokaryotic or eukaryotic host cells, expression of antibodies in eukaryotic cells, and typically mammalian host cells, is most typical.

[0174] Mammalian host cells for expressing the recombinant antibodies of the disclosure include, for example, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells (including dhfr- CHO cells, described in Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, used with a DHFR selectable marker, *e.g.*, as described in R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol. 159*:601-621), NS0 myeloma cells, COS cells and Sp2 cells. In particular, for use with NS0 myeloma or CHO cells, another expression system is the GS (glutamine synthetase) gene expression system disclosed in WO 87/04462, WO 89/01036 and EP 338,841. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using any suitable protein purification methods.

Characterization of Antibody Binding to Antigen

[0175] Antibodies, or antigen binding portions thereof, of the disclosure can be tested for binding to α5β1 by, for example, standard ELISA. Briefly, microtiter plates are coated with purified α5β1 at 0.25 μg/ml in PBS, and then blocked with 5% bovine serum albumin in PBS. Dilutions of antibody (*e.g.*, dilutions of plasma from α5β1-immunized

mice) are added to each well and incubated for 1-2 hours at 37°C. The plates are washed with PBS/Tween and then incubated with secondary reagent (*e.g.*, for human antibodies, a goat-anti-human IgG Fc-specific polyclonal reagent) conjugated to alkaline phosphatase for 1 hour at 37°C. After washing, the plates are developed with pNPP substrate (1 mg/ml), and analyzed at OD of 405-650. Preferably, mice which develop the highest titers will be used for fusions.

[0176] An ELISA assay as described above can also be used to screen for hybridomas that show positive reactivity with α5β1 immunogen. Hybridomas that bind with high avidity to α5β1 are subcloned and further characterized. One clone from each hybridoma, which retains the reactivity of the parent cells (by ELISA), can be chosen for making a 5 to 10 vial cell bank stored at -140°C, and for antibody purification.

[0177] To purify anti-α5β1 antibodies, selected hybridomas can be grown in two-liter spinner-flasks for monoclonal antibody purification. Supernatants can be filtered and concentrated before affinity chromatography with protein A-sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ). Eluted IgG can be checked by gel electrophoresis and high performance liquid chromatography to ensure purity. The buffer solution can be exchanged into PBS, and the concentration can be determined by OD_{280} using 1.43 extinction coefficient. The monoclonal antibodies can be aliquoted and stored at -80°C.

[0178] Further, the epitope bound by the antibody can be characterized by standard methods known in the art. Such methods include producing an array of overlapping peptide fragments of α5 and/or β1 and assessing the binding of the antibody to the various fragments. Alternatively, mutations, *e.g.*, alanine-scanning mutagenesis where each amino acid is replaced by an alanine residue, can be introduced into the α5 and/or β1 peptide and the binding of the antibody to the mutant peptide can be compared with binding of the antibody to the wild type protein, and thereby identify sites where mutation(s) affect binding. *See*, *e.g.*, Cunningham *et al.*, (1989) *Science* 244:1081-1085.

[0179] To determine if the selected anti-α5β1monoclonal antibodies or antigen binding portion thereof bind to unique epitopes, each antibody can be biotinylated using commercially available reagents (Pierce, Rockford, IL). Competition studies using unlabeled monoclonal antibodies and biotinylated monoclonal antibodies can be performed using α5β1

coated-ELISA plates as described above. Biotinylated mAb binding can be detected with a strep-avidin-alkaline phosphatase probe.

[0180] To determine the isotype of purified antibodies, isotype ELISAs can be performed using reagents specific for antibodies of a particular isotype. For example, to determine the isotype of a human monoclonal antibody, wells of microtiter plates can be coated with 1 μg/ml of anti-human immunoglobulin overnight at 4°C. After blocking with 1% BSA, the plates are reacted with 1 μg/ml or less of test monoclonal antibodies or purified isotype controls, at ambient temperature for one to two hours. The wells can then be reacted with either human IgG1 or human IgM-specific alkaline phosphatase-conjugated probes. Plates are developed and analyzed as described above.

[0181] Anti-α5β1 human IgGs can be further tested for reactivity with α5β1 antigen by Western blotting. Briefly, α5β1 can be prepared and subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. After electrophoresis, the separated antigens are transferred to nitrocellulose membranes, blocked with 10% fetal calf serum, and probed with the monoclonal antibodies to be tested. Human IgG binding can be detected using anti-human IgG alkaline phosphatase and developed with BCIP/NBT substrate tablets (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Immunoconjugates

[0182] In another aspect, the present disclosure features an anti-α5β1 antibody, or a fragment thereof, conjugated to a therapeutic moiety, such as a cytotoxin, a drug (*e.g.*, an immunosuppressant) or a radiotoxin. Such conjugates are referred to herein as "immunoconjugates". Immunoconjugates that include one or more cytotoxins are referred to as "immunotoxins." A cytotoxin or cytotoxic agent includes any agent that is detrimental to (*e.g.*, kills) cells. Examples include taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicin, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. Therapeutic agents also include, for example, antimetabolites (*e.g.*, methotrexate, 6-mercaptopurine, 6-thioguanine, cytarabine, 5-fluorouracil decarbazine), alkylating agents (*e.g.*, mechlorethamine, thioepa chlorambucil, melphalan, carmustine (BSNU) and lomustine (CCNU), cyclothosphamide, busulfan,

dibromomannitol, streptozotocin, mitomycin C, and cis-dichlorodiamine platinum (II) (DDP) cisplatin), anthracyclines (*e.g.*, daunorubicin (formerly daunomycin) and doxorubicin), antibiotics (*e.g.*, dactinomycin (formerly actinomycin), bleomycin, mithramycin, and anthramycin (AMC)), and anti-mitotic agents (*e.g.*, vincristine and vinblastine).

[0183] Other examples of therapeutic cytotoxins that can be conjugated to an antibody, or antigen binding portion thereof, of the disclosure include duocarmycins, calicheamicins, maytansines and auristatins, and derivatives thereof. An example of a calicheamicin antibody conjugate is commercially available (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

[0184] Cytoxins can be conjugated to antibodies of the disclosure or antigen binding portions thereof using various linker technologies. Examples of linker types that have been used to conjugate a cytotoxin to an antibody include, but are not limited to, hydrazones, thioethers, esters, disulfides and peptide-containing linkers. A linker can be chosen that is, for example, susceptible to cleavage by low pH within the lysosomal compartment or susceptible to cleavage by proteases, such as proteases preferentially expressed in tumor tissue such as cathepsins (*e.g.*, cathepsins B, C, D).

[0185] For further discussion of types of cytotoxins, linkers and methods for conjugating therapeutic agents to antibodies, see also Saito, G. *et al.* (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

[0186] Antibodies or antigen binding portions thereof of the present disclosure also can be conjugated to a radioactive isotope to generate cytotoxic radiopharmaceuticals, also referred to as radioimmunoconjugates. Examples of radioactive isotopes that can be conjugated to antibodies for use diagnostically or therapeutically include, but are not limited to, iodine^{131}, indium^{111}, yttrium^{90} and lutetium^{177}. Methods for preparing radioimmunoconjugates are established in the art. Examples of radioimmunoconjugates are commercially available, including Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) and Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), and similar methods can be used to prepare radioimmunoconjugates using the antibodies of the disclosure.

[0187] The antibody conjugates of the disclosure can be used to modify a given biological response, and the drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, an enzymatically active toxin, or active fragment thereof, such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor or interferon-γ; or, biological response modifiers such as, for example, lymphokines, interleukin-1 ("IL-1"), interleukin-2 ("IL-2"), interleukin-6 ("IL-6"), granulocyte macrophage colony stimulating factor ("GM-CSF"), granulocyte colony stimulating factor ("G-CSF"), or other growth factors.

[0188] Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are known, see, *e.g.*, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Bispecific Molecules

[0189] In another aspect, the present disclosure features bispecific molecules comprising an anti-α5β1 antibody, or a fragment thereof, of the disclosure. An antibody of the disclosure, or antigen-binding portions thereof, can be derivatized or linked to another functional molecule, *e.g.*, another peptide or protein (*e.g.*, another antibody or ligand for a receptor) to generate a bispecific molecule that binds to at least two different binding sites or target molecules. The antibody of the disclosure may in fact be derivatized or linked to more than one other functional molecule to generate multispecific molecules that bind to more than two different binding sites and/or target molecules; such multispecific molecules are also

intended to be encompassed by the term "bispecific molecule" as used herein. To create a bispecific molecule of the disclosure, an antibody of the disclosure can be functionally linked (*e.g.*, by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other binding molecules, such as another antibody, antibody fragment, peptide or binding mimetic, such that a bispecific molecule results.

[0190] Accordingly, the present disclosure includes bispecific molecules comprising at least one first binding specificity for α5β1 and a second binding specificity for a second target epitope. In a particular aspect of the disclosure, the second target epitope is an Fc receptor, *e.g.*, human FcγRI (CD64) or a human Fcγ receptor (CD89). Therefore, the disclosure includes bispecific molecules capable of binding both to FcγR or FcγR expressing effector cells (*e.g.*, monocytes, macrophages or polymorphonuclear cells (PMNs)), and to target cells expressing α5β1. These bispecific molecules target α5β1 expressing cells to effector cell and trigger Fc receptor-mediated effector cell activities, such as phagocytosis of an α5β1 expressing cells, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), cytokine release, or generation of superoxide anion.

[0191] In an aspect of the disclosure in which the bispecific molecule is multispecific, the molecule can further include a third binding specificity, in addition to an anti-Fc binding specificity and an anti-α5β1 binding specificity. In one case, the third binding specificity is an anti-enhancement factor (EF) portion, *e.g.*, a molecule which binds to a surface protein involved in cytotoxic activity and thereby increases the immune response against the target cell. The "anti-enhancement factor portion" can be an antibody, functional antibody fragment or a ligand that binds to a given molecule, *e.g.*, an antigen or a receptor, and thereby results in an enhancement of the effect of the binding determinants for the Fc receptor or target cell antigen. The "anti-enhancement factor portion" can bind an Fc receptor or a target cell antigen. Alternatively, the anti-enhancement factor portion can bind to an entity that is different from the entity to which the first and second binding specificities bind. For example, the anti-enhancement factor portion can bind a cytotoxic T-cell (*e.g.* via CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 or other immune cell that results in an increased immune response against the target cell).

[0192] In one case, the bispecific molecules of the disclosure comprise as a binding specificity at least one antibody, or an antibody fragment thereof, including, *e.g.*, an Fab,

Fab', $F(ab')_2$, Fv, or a single chain Fv. The antibody may also be a light chain or heavy chain dimer, or any minimal fragment thereof such as a Fv or a single chain construct as described in Ladner *et al.* U.S. Patent No. 4,946,778.

[0193] In one case, the binding specificity for an Fcγ receptor is provided by a monoclonal antibody, the binding of which is not blocked by human immunoglobulin G (IgG). As used herein, the term "IgG receptor" refers to any of the eight γ-chain genes located on chromosome 1. These genes encode a total of twelve transmembrane or soluble receptor isoforms which are grouped into three Fcγ receptor classes: FcγRI (CD64), Fcγ RII(CD32), and FcγRIII (CD16). In one case, the Fcγ receptor is a human high affinity Fcγ RI. The human FcγRI is a 72 kDa molecule, which shows high affinity for monomeric IgG (10^8 - 10^9 M^{-1}).

[0194] The production and characterization of certain anti-Fcγ monoclonal antibodies are described by Fanger *et al.* in PCT Publication WO 88/00052 and in U.S. Patent No. 4,954,617. These antibodies bind to an epitope of FcγRI, FcγRII or FcγRIII at a site which is distinct from the Fcγ binding site of the receptor and, thus, their binding is not blocked substantially by physiological levels of IgG. Specific anti-FcγRI antibodies useful in this disclosure are mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 and mAb 197. The hybridoma producing mAb 32 is available from the American Type Culture Collection, ATCC Accession No. HB9469. In other cases the anti-Fcγ receptor antibody is a humanized form of monoclonal antibody 22 (H22). The production and characterization of the H22 antibody is described in Graziano, R.F. *et al.* (1995*) J. Immunol* 155 (10): 4996-5002 and PCT Publication WO 94/10332. The H22 antibody producing cell line was deposited at the American Type Culture Collection under the designation HA022CL1 and has the Accession No. CRL 11177.

[0195] In still other cases, the binding specificity for an Fc receptor is provided by an antibody that binds to a human IgA receptor, *e.g.*, an Fc-alpha receptor (FcαRI (CD89)), the binding of which is typically not blocked by human immunoglobulin A (IgA). The term "IgA receptor" is intended to include the gene product of one α-gene (FcαRI) located on chromosome 19. This gene is known to encode several alternatively spliced transmembrane isoforms of 55 to 110 kDa. FcαRI (CD89) is constitutively expressed on

monocytes/macrophages, eosinophilic and neutrophilic granulocytes, but not on non-effector cell populations. FcαRI has medium affinity ($\approx 5 \times 10^7$ M^{-1}) for both IgA1 and IgA2, which is increased upon exposure to cytokines such as G-CSF or GM-CSF (Morton, H.C. *et al.* (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440). Four FcαRI-specific monoclonal antibodies, identified as A3, A59, A62 and A77, which bind FcαRI outside the IgA ligand binding domain, have been described (Monteiro, R.C. *et al.* (1992) *J. Immunol.* 148:1764).

[0196] FcαRI and FcγRI are illustrative trigger receptors for use in the bispecific molecules of the disclosure because they are (1) expressed primarily on immune effector cells, *e.g.*, monocytes, PMNs, macrophages and dendritic cells; (2) expressed at high levels (*e.g.*, 5,000-100,000 per cell); (3) mediators of cytotoxic activities (*e.g.*, ADCC, phagocytosis); (4) mediate enhanced antigen presentation of antigens, including self-antigens, targeted to them.

[0197] While human monoclonal antibodies are preferred, other antibodies which can be employed in the bispecific molecules of the disclosure are murine, chimeric and humanized monoclonal antibodies.

[0198] The bispecific molecules of the present disclosure can be prepared by conjugating the constituent binding specificities, *e.g.*, the anti-FcR and anti-α5β1 binding specificities, using any suitable methods. For example, each binding specificity of the bispecific molecule can be generated separately and then conjugated to one another. When the binding specificities are proteins or peptides, a variety of coupling or cross-linking agents can be used for covalent conjugation. Examples of cross-linking agents include protein A, carbodiimide, N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), o-phenylenedimaleimide (oPDM), N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP), and sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohaxane-1-carboxylate (sulfo-SMCC) (see *e.g.*, Karpovsky *et al.* (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Other methods include those described in Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan *et al.* (1985) *Science* 229:81-83), and Glennie *et al.* (1987) *J. Immunol.* 139:2367-2375). Suitable conjugating agents include SATA and sulfo-SMCC, both available from Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

[0199] When the binding specificities are antibodies, they can be conjugated via sulfhydryl bonding of the C-terminus hinge regions of the two heavy chains. In one case, the hinge region is modified to contain an odd number of sulfhydryl residues, such as one residue, prior to conjugation.

[0200] Alternatively, both binding specificities can be encoded in the same vector and expressed and assembled in the same host cell. This method is particularly useful where the bispecific molecule is a mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x $F(ab')_2$ or ligand x Fab fusion protein. A bispecific molecule of the disclosure can be a single chain molecule comprising one single chain antibody and a binding determinant, or a single chain bispecific molecule comprising two binding determinants. Bispecific molecules may comprise at least two single chain molecules. Methods for preparing bispecific molecules are described for example in U.S. Patent Number 5,260,203; U.S. Patent Number 5,455,030; U.S. Patent Number 4,881,175; U.S. Patent Number 5,132,405; U.S. Patent Number 5,091,513; U.S. Patent Number 5,476,786; U.S. Patent Number 5,013,653; U.S. Patent Number 5,258,498; and U.S. Patent Number 5,482,858.

[0201] Binding of the bispecific molecules to their specific targets can be confirmed by, for example, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), FACS analysis, bioassay (*e.g.*, growth inhibition), or Western Blot assay. Each of these assays generally detects the presence of protein-antibody complexes of particular interest by employing a labeled reagent (*e.g.*, an antibody) specific for the complex of interest. For example, the FcR-antibody complexes can be detected using *e.g.*, an enzyme-linked antibody or antibody fragment which recognizes and specifically binds to the antibody-FcR complexes. Alternatively, the complexes can be detected using any of a variety of other immunoassays. For example, the antibody can be radioactively labeled and used in a radioimmunoassay (RIA) (see, for example, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). The radioactive isotope can be detected by such means as the use of a γ counter or a scintillation counter or by autoradiography.

Pharmaceutical Compositions

[0203] In another aspect, the present disclosure provides a composition, *e.g.*, a pharmaceutical composition, containing one or a combination of monoclonal antibodies, or

antigen-binding portion(s) thereof, of the present disclosure, formulated together with a pharmaceutically acceptable carrier. Such compositions may include one or a combination of (*e.g.*, two or more different) antibodies, or immunoconjugates or bispecific molecules of the disclosure. For example, a pharmaceutical composition of the disclosure can comprise a combination of antibodies (or immunoconjugates or bispecifics) that bind to different epitopes on the target antigen or that have complementary activities.

[0204] Pharmaceutical compositions of the disclosure also can be administered in combination therapy, *i.e.*, combined with other agents. For example, the combination therapy can include an anti-$\alpha 5\beta 1$ antibody of the present disclosure combined with at least one other anti-inflammatory or immunosuppressant agent. Examples of therapeutic agents that can be used in combination therapy are described in greater detail below in the section on uses of the antibodies of the disclosure.

[0205] As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" includes any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Typically, the carrier is suitable for intravenous, intramuscular, subcutaneous, parenteral, spinal or epidermal administration (*e.g.*, by injection or infusion). Depending on the route of administration, the active compound, *i.e.*, antibody, antigen-binding portion thereof, immunoconjugate, or bispecific molecule, may be coated in a material to protect the compound from the action of acids and other natural conditions that may inactivate the compound.

[0206] In certain embodiments, the antibodies of the present disclosure may be present in a neutral form (including zwitter ionic forms) or as a positively or negatively-charged species. In some cases, the antibodies may be complexed with a counterion to form a pharmaceutically acceptable salt. Thus, the pharmaceutical compounds of the disclosure may include one or more pharmaceutically acceptable salts.

[0207] A "pharmaceutically acceptable salt" refers to a salt that retains the desired biological activity of the parent compound (e.g. antibody) and does not impart undesired toxicological effects (see *e.g.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). For example, the term "pharmaceutically acceptable salt" includes a complex comprising one or

more antibodies and one or more counterions, where the counterions are derived from pharmaceutically acceptable inorganic and organic acids and bases.

[0208] Examples of such salts include acid addition salts and base addition salts. Acid addition salts include those derived from nontoxic inorganic acids, such as hydrochloric, nitric, phosphoric, sulfuric, hydrobromic, hydroiodic, phosphorous and the like, as well as from nontoxic organic acids such as aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids and the like. Base addition salts include those derived from alkaline earth metals, such as sodium, potassium, magnesium, calcium and the like, as well as from nontoxic organic amines, such as N,N'-dibenzylethylenediamine, N-methylglucamine, chloroprocaine, choline, diethanolamine, ethylenediamine, procaine and the like.

[0209] Furthermore, pharmaceutically acceptable inorganic bases include metallic ions. Metallic ions include, but are not limited to, appropriate alkali metal salts, alkaline earth metal salts and other physiological acceptable metal ions. Salts derived from inorganic bases include aluminum, ammonium, calcium, cobalt, nickel, molybdenum, vanadium, manganese, chromium, selenium, tin, copper, ferric, ferrous, lithium, magnesium, manganic salts, manganous, potassium, rubidium, sodium, and zinc, and in their usual valences.

[0210] Pharmaceutically acceptable acid addition salts of the antibodies of the present disclosure can be prepared from the following acids, including, without limitation formic, acetic, acetamidobenzoic, adipic, ascorbic, boric, propionic, benzoic, camphoric, carbonic, cyclamic, dehydrocholic, malonic, edetic, ethylsulfuric, fendizoic, metaphosphoric, succinic, glycolic, gluconic, lactic, malic, tartaric, tannic, citric, nitric, ascorbic, glucuronic, maleic, folic, fumaric, propionic, pyruvic, aspartic, glutamic, benzoic, hydrochloric, hydrobromic, hydroiodic, lysine, isocitric, trifluoroacetic, pamoic, propionic, anthranilic, mesylic, orotic, oxalic, oxalacetic, oleic, stearic, salicylic, aminosalicylic, silicate, p-hydroxybenzoic, nicotinic, phenylacetic, mandelic, embonic, sulfonic, methanesulfonic, phosphoric, phosphonic, ethanesulfonic, ethanedisulfonic, ammonium, benzenesulfonic, pantothenic, naphthalenesulfonic, toluenesulfonic, 2-hydroxyethanesulfonic, sulfanilic, sulfuric, nitric, nitrous, sulfuric acid monomethyl ester, cyclohexylaminosulfonic, β-hydroxybutyric, glycine, glycylglycine, glutamic, cacodylate, diaminohexanoic,

camphorsulfonic, gluconic, thiocyanic, oxoglutaric, pyridoxal 5-phosphate, chlorophenoxyacetic, undecanoic, N-acetyl-L-aspartic, galactaric and galacturonic acids.

[0211] Pharmaceutically acceptable organic bases include trimethylamine, diethylamine, N, N'-dibenzylethylenediamine, chloroprocaine, choline, dibenzylamine, diethanolamine, ethylenediamine, meglumine (N-methylglucamine), procaine, cyclic amines, quaternary ammonium cations, arginine, betaine, caffeine, clemizole, 2-ethylaminoethanol, 2-diethylaminoethanol, 2-dimethylaminoethanol, ethanediamine, butylamine, ethanolamine, ethylenediamine, N-ethylmorpholine, N-ethylpiperidine, ethylglucamine, glucamine, glucosamine, histidine, hydrabamine, imidazole, isopropylamine, methylglucamine, morpholine, piperazine, pyridine, pyridoxine, neodymium, piperidine, polyamine resins, procaine, purines, theobromine, triethylamine, tripropylamine, triethanolamine, tromethamine, methylamine, taurine, cholate, 6-amino-2-methyl-2-heptanol, 2-amino-2-methyl-1,3-propanediol, 2-amino-2-methyl-1-propanol, aliphatic mono- and dicarboxylic acids, phenyl-substituted alkanoic acids, hydroxy alkanoic acids, aromatic acids, aliphatic and aromatic sulfonic acids, strontium, tricine, hydrazine, phenylcyclohexylamine, 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid, bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methane, *N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid, 3-morpholino-2-hydroxypropanesulfonic acid, 1,3-bis[tris(hydroxymethyl)methylamino]propane, 4-morpholinepropanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, 2-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]ethanesulfonic acid, N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid, 4-(N-morpholino)butanesulfonic acid, 3-(*N,N*-bis[2-hydroxyethyl]amino)-2-hydroxypropanesulfonic acid, 2-hydroxy-3-[tris(hydroxymethyl)methylamino]-1-propanesulfonic acid, 4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-(2-hydroxypropanesulfonic acid), piperazine-1,4-bis(2-hydroxypropanesulfonic acid) dihydrate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinepropanesulfonic acid, *N,N*-bis(2-hydroxyethyl)glycine, N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(4-butanesulfonic acid), N-[tris(hydroxymethyl)methyl]-3-aminopropanesulfonic acid, N-tris(Hydroxymethyl)methyl-4-aminobutanesulfonic acid, N-(1,1-dimethyl-2-hydroxyethyl)-3-amino-2-hydroxypropanesulfonic acid, 2-(cyclohexylamino)ethanesulfonic acid, 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid, 3-(cyclohexylamino)-1-

propanesulfonic acid, *N*-(2-acetamido)iminodiacetic acid, 4-(cyclohexylamino)-1-butanesulfonic acid, *N*-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine, 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, and trometamol.

[0212] A pharmaceutical composition of the disclosure also may include a pharmaceutically acceptable anti-oxidant. Examples of pharmaceutically acceptable antioxidants include: (1) water soluble antioxidants, such as ascorbic acid, cysteine hydrochloride, sodium bisulfate, sodium metabisulfite, sodium sulfite and the like; (2) oil-soluble antioxidants, such as ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole (BHA), butylated hydroxytoluene (BHT), lecithin, propyl gallate, alpha-tocopherol, and the like; and (3) metal chelating agents, such as citric acid, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), sorbitol, tartaric acid, phosphoric acid, and the like.

[0213] Examples of suitable aqueous and nonaqueous carriers that may be employed in the pharmaceutical compositions of the disclosure include water, ethanol, polyols (such as glycerol, propylene glycol, polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof, vegetable oils, such as olive oil, and injectable organic esters, such as ethyl oleate. Proper fluidity can be maintained, for example, by the use of coating materials, such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersions, and by the use of surfactants.

[0214] These compositions may also contain adjuvants such as preservatives, wetting agents, emulsifying agents and dispersing agents. Prevention of presence of microorganisms may be ensured both by sterilization procedures, *supra*, and by the inclusion of various antibacterial and antifungal agents, for example, paraben, chlorobutanol, phenol sorbic acid, and the like. It may also be desirable to include isotonic agents, such as sugars, sodium chloride, and the like into the compositions. In addition, prolonged absorption of the injectable pharmaceutical form may be brought about by the inclusion of agents which delay absorption such as aluminum monostearate and gelatin.

[0215] Pharmaceutically acceptable carriers include sterile aqueous solutions or dispersions and sterile powders for the extemporaneous preparation of sterile injectable solutions or dispersion. The use of such media and agents for pharmaceutically active substances is known in the art. Except insofar as any conventional media or agent is incompatible with the active compound, use thereof in the pharmaceutical compositions of

the disclosure is contemplated. Supplementary active compounds can also be incorporated into the compositions.

[0216] Therapeutic compositions typically must be sterile and stable under the conditions of manufacture and storage. The composition can be formulated as a solution, microemulsion, liposome, or other ordered structure suitable to high drug concentration. The carrier can be a solvent or dispersion medium containing, for example, water, ethanol, polyol (for example, glycerol, propylene glycol, and liquid polyethylene glycol, and the like), and suitable mixtures thereof. The proper fluidity can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Prolonged absorption of the injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

[0217] Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the active compound in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by sterilization microfiltration. Generally, dispersions are prepared by incorporating the active compound into a sterile vehicle that contains a basic dispersion medium and the required other ingredients from those enumerated above. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, methods of preparation include, but are not limited to, vacuum drying and freeze-drying (lyophilization) that yield a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof.

[0218] The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will vary depending upon the subject being treated, and the particular mode of administration. The amount of active ingredient which can be combined with a carrier material to produce a single dosage form will generally be that amount of the composition which produces a therapeutic effect. Generally, out of one hundred percent, this amount will range from about 0.01 percent to about ninety-nine percent of active ingredient, preferably from about 0.1 percent to about 70 percent, most preferably

from about 1 percent to about 30 percent of active ingredient in combination with a pharmaceutically acceptable carrier.

[0219] Dosage regimens are adjusted to provide the optimum desired response (*e.g.*, a therapeutic response). For example, a single bolus may be administered, several divided doses may be administered over time or the dose may be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the subjects to be treated; each unit contains a predetermined quantity of active compound calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier. The specification for the dosage unit forms of the disclosure are dictated by and directly dependent on (a) the unique characteristics of the active compound and the particular therapeutic effect to be achieved, and (b) the limitations inherent in the art of compounding such an active compound for the treatment of sensitivity in individuals.

[0220] For administration of the antibody, the dosage ranges from about 0.0001 to 100 mg/kg, and more usually 0.01 to 5 mg/kg, of the host body weight. For example dosages can be 0.3 mg/kg body weight, 1 mg/kg body weight, 3 mg/kg body weight, 5 mg/kg body weight or 10 mg/kg body weight or within the range of 1 to 10 mg/kg. An exemplary treatment regime entails administration once per week, once every two weeks, once every three weeks, once every four weeks, once per month, once every 3 months or once every three to 6 months. Dosage regimens for an anti-$\alpha 5\beta 1$ antibody or antigen binding portion thereof of the disclosure include, for example, 1 mg/kg body weight or 3 mg/kg body weight via intravenous administration, with the antibody being given using one of the following dosing schedules: (i) every four weeks for six dosages, then every three months; (ii) every three weeks; (iii) 3 mg/kg body weight once followed by 1 mg/kg body weight every three weeks.

[0221] In some methods, two or more monoclonal antibodies with different binding specificities are administered simultaneously, in which case the dosage of each antibody administered falls within the ranges indicated. Antibody is usually administered on multiple occasions. Intervals between single dosages can be, for example, weekly, monthly, every

three months or yearly. Intervals can also be irregular as indicated by measuring blood levels of antibody to the target antigen in the patient. In some methods, dosage is adjusted to achieve a plasma antibody concentration of about 1 to 1000 μg/ml and in some methods about 25 to 300 μg/ml.

[0222] Alternatively, antibody can be administered as a sustained release formulation, in which case less frequent administration is required. Dosage and frequency vary depending on the half-life of the antibody in the patient. In general, human antibodies show the longest half life, followed by humanized antibodies, chimeric antibodies, and nonhuman antibodies. The dosage and frequency of administration can vary depending on whether the treatment is prophylactic or therapeutic. In prophylactic applications, a relatively low dosage is administered at relatively infrequent intervals over a long period of time. Some patients continue to receive treatment for the rest of their lives. In therapeutic applications, a relatively high dosage at relatively short intervals is sometimes required until progression of the disease is reduced or terminated, and preferably until the patient shows partial or complete amelioration of symptoms of disease. Thereafter, the patient can be administered a prophylactic regime.

[0223] Actual dosage levels of the active ingredients in the pharmaceutical compositions of the present disclosure may be varied so as to obtain an amount of the active ingredient which is effective to achieve the desired therapeutic response for a particular patient, composition, and mode of administration, without being toxic to the patient. The selected dosage level will depend upon a variety of pharmacokinetic factors including the activity of the particular compositions of the present disclosure employed, or the ester, salt or amide thereof, the route of administration, the time of administration, the rate of excretion of the particular compound being employed, the duration of the treatment, other drugs, compounds and/or materials used in combination with the particular compositions employed, the age, sex, weight, condition, general health and prior medical history of the patient being treated, and like factors well known in the medical arts.

[0224] A "therapeutically effective dosage" of an anti-α5β1 antibody of the disclosure preferably results in a decrease in severity of disease symptoms, an increase in frequency and duration of disease symptom-free periods, or a prevention of impairment or disability due to the disease affliction. For example, for the treatment of α5β1-positive

tumors, a "therapeutically effective dosage" preferably inhibits cell growth or tumor growth by at least about 20%, more preferably by at least about 40%, even more preferably by at least about 60%, and still more preferably by at least about 80% relative to untreated subjects. The ability of a compound to inhibit tumor growth can be evaluated in an animal model system predictive of efficacy in human tumors. Alternatively, this property of a composition can be evaluated by examining the ability of the compound to inhibit, such inhibition *in vitro* by assays known to the skilled practitioner. A therapeutically effective amount of a therapeutic compound can decrease tumor size, or otherwise ameliorate symptoms in a subject. One of ordinary skill in the art would be able to determine such amounts based on such factors as the subject's size, the severity of the subject's symptoms, and the particular composition or route of administration selected.

[0225] A composition of the present disclosure can be administered via one or more routes of administration using one or more of a variety of methods known in the art. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results. Routes of administration for antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure include intravenous, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutaneous, spinal or other parenteral routes of administration, for example by injection or infusion. The phrase "parenteral administration" as used herein means modes of administration other than enteral and topical administration, usually by injection, and includes, without limitation, intravenous, intramuscular, intraarterial, intrathecal, intracapsular, intraorbital, intracardiac, intradermal, intraperitoneal, transtracheal, subcutaneous, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subarachnoid, intraspinal, epidural and intrasternal injection and infusion.

[0226] Alternatively, an antibody or antigen biding portion thereof of the disclosure can be administered via a non-parenteral route, such as a topical, epidermal or mucosal route of administration, for example, intranasally, orally, vaginally, rectally, sublingually or topically.

[0227] The active compounds can be prepared with carriers that will protect the compound against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid,

collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations are patented or generally known to those skilled in the art. *See, e.g., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

[0228] Therapeutic compositions can be administered with medical devices known in the art. For example, a therapeutic composition of the disclosure can be administered with a needleless hypodermic injection device, such as the devices disclosed in U.S. Patent Nos. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; or 4,596,556. Examples of well-known implants and modules useful in the present disclosure include: U.S. Patent No. 4,487,603, which discloses an implantable micro-infusion pump for dispensing medication at a controlled rate; U.S. Patent No. 4,486,194, which discloses a therapeutic device for administering medicants through the skin; U.S. Patent No. 4,447,233, which discloses a medication infusion pump for delivering medication at a precise infusion rate; U.S. Patent No. 4,447,224, which discloses a variable flow implantable infusion apparatus for continuous drug delivery; U.S. Patent No. 4,439,196, which discloses an osmotic drug delivery system having multi-chamber compartments; and U.S. Patent No. 4,475,196, which discloses an osmotic drug delivery system. Many other such implants, delivery systems, and modules are known to those skilled in the art.

[0229] In certain case, the human monoclonal antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure can be formulated to ensure proper distribution *in vivo*. For example, the blood-brain barrier (BBB) excludes many highly hydrophilic compounds. To ensure that the therapeutic compounds of the disclosure cross the BBB (if desired), they can be formulated, for example, in liposomes. For methods of manufacturing liposomes, see, *e.g.*, U.S. Patents 4,522,811; 5,374,548; and 5,399,331. The liposomes may comprise one or more moieties which are selectively transported into specific cells or organs, thus enhance targeted drug delivery (*see, e.g.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Exemplary targeting moieties include folate or biotin (see, *e.g.*, U.S. Patent 5,416,016 to Low *et al.*); mannosides (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); antibodies (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); surfactant protein A receptor (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); see also K.

Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273.

Uses and Methods of the Disclosure

[0230] The antibodies, particularly the human antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure have numerous *in vitro* and *in vivo* diagnostic and therapeutic utilities involving the diagnosis and treatment of α5β1 mediated disorders. For example, these molecules can be administered to cells in culture, *in vitro* or *ex vivo*, or to human subjects, *e.g.*, *in vivo*, to treat, prevent and to diagnose a variety of disorders. As used herein, the term "subject" is intended to include human and non-human animals. Non-human animals includes all vertebrates, *e.g.*, mammals and non-mammals, such as non-human primates, sheep, dogs, cats, cows, horses, chickens, amphibians, and reptiles. Preferred subjects include human patients having disorders mediated by α5β1 activity. The methods are particularly suitable for treating human patients having a disorder associated with aberrant α5β1 expression. When antibodies to α5β1 are administered together with another agent, the two can be administered in either order or simultaneously.

[0231] Given the specific binding of the antibodies of the disclosure for α5β1, the antibodies of the disclosure can be used to specifically detect α5β1 expression on the surface of cells and, moreover, can be used to purify α5β1 via immunoaffinity purification.

[0232] Furthermore, given the expression of α5β1 on various tumor cells (see, e.g. Example 6, Figure 7), and its involvement in angiogenesis, the human antibodies, antibody compositions and methods of the present disclosure can be used to treat a subject with abnormal cell growth, *e.g.*, a disorder characterized by the presence of tumor cells expressing α5β1 including, for example, mesothelioma, hepatobilliary (hepatic and billiary duct), a primary or secondary CNS tumor, a primary or secondary brain tumor, lung cancer (NSCLC and SCLC), bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal

gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, prostate cancer, testicular cancer, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, multiple myeloma, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the foregoing cancers.

[0233] In one case, the antibodies (e.g., human monoclonal antibodies, multispecific and bispecific molecules and compositions) or antigen binding portions thereof of the disclosure can be used to detect levels of α5β1, or levels of cells which contain α5β1 on their membrane surface, which levels can then be linked to certain disease symptoms. Alternatively, the antibodies can be used to inhibit or block α5β1 function which, in turn, can be linked to the prevention or amelioration of certain disease symptoms, thereby implicating α5β1 as a mediator of the disease. This can be achieved by contacting a sample and a control sample with the anti-α5β1 antibody under conditions that allow for the formation of a complex between the antibody and α5β1. Any complexes formed between the antibody and α5β1 are detected and compared in the sample and the control.

[0234] In another case, the antibodies (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules and compositions) or antigen binding portions thereof of the disclosure can be initially tested for binding activity associated with therapeutic or diagnostic use *in vitro*. For example, compositions of the disclosure can be tested using the flow cytometric assays described in the Examples below.

[0235] The antibodies (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules, immunoconjugates and compositions) or antigen binding portions thereof of the disclosure have additional utility in therapy and diagnosis of α5β1-related diseases. For example, the human monoclonal antibodies, the multispecific or bispecific molecules and the immunoconjugates can be used to elicit *in vivo* or *in vitro* one or more of the following biological activities: to inhibit the growth of and/or kill a cell expressing α5β1; to mediate phagocytosis or ADCC of a cell expressing α5β1 in the presence of human effector cells, or to block α5β1 ligand binding to α5β1.

[0236] In a particular case, the antibodies (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules and compositions) or antigen binding portions thereof are used *in vivo* to treat, prevent or diagnose a variety of α5β1-related diseases. Examples of α5β1-related diseases include, among others, abnormal cell growth, such as cancer. In one embodiment, the abnormal cell growth is cancer, including, but not limited to, mesothelioma, hepatobilliary (hepatic and billiary duct), a primary or secondary CNS tumor, a primary or secondary brain tumor, lung cancer (NSCLC and SCLC), bone cancer, pancreatic cancer, skin cancer, cancer of the head or neck, cutaneous or intraocular melanoma, ovarian cancer, colon cancer, rectal cancer, cancer of the anal region, stomach cancer, gastrointestinal (gastric, colorectal, and duodenal), breast cancer, uterine cancer, carcinoma of the fallopian tubes, carcinoma of the endometrium, carcinoma of the cervix, carcinoma of the vagina, carcinoma of the vulva, Hodgkin's Disease, cancer of the esophagus, cancer of the small intestine, cancer of the endocrine system, cancer of the thyroid gland, cancer of the parathyroid gland, cancer of the adrenal gland, sarcoma of soft tissue, cancer of the urethra, cancer of the penis, prostate cancer, testicular cancer, chronic or acute leukemia, chronic myeloid leukemia, lymphocytic lymphomas, cancer of the bladder, cancer of the kidney or ureter, renal cell carcinoma, carcinoma of the renal pelvis, neoplasms of the central nervous system (CNS), primary CNS lymphoma, non-Hodgkin's lymphoma, spinal axis tumors, brain stem glioma, pituitary adenoma, adrenocortical cancer, gall bladder cancer, multiple myeloma, cholangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, or a combination of one or more of the foregoing cancers.

[0236] Suitable routes of administering the antibody compositions (*e.g.*, human monoclonal antibodies, multispecific and bispecific molecules and immunoconjugates) or antigen binding portions thereof of the disclosure *in vivo* and *in vitro* are well known in the art and can be selected by those of ordinary skill. For example, the antibody compositions can be administered by injection (*e.g.*, intravenous or subcutaneous). Suitable dosages of the molecules used will depend on the age and weight of the subject and the concentration and/or formulation of the antibody composition.

[0237] As previously described, human anti-α5β1 antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure can be co-administered with one or other more therapeutic agents, *e.g.*, a cytotoxic agent, a radiotoxic agent or an immunosuppressive agent. The

antibody can be linked to the agent (as an immunocomplex) or can be administered separate from the agent. In the latter case (separate administration), the antibody can be administered before, after or concurrently with the agent or can be co-administered with other known therapies, *e.g.*, an anti-cancer therapy, *e.g.*, radiation. Such therapeutic agents include, among others, anti-neoplastic agents such as doxorubicin (adriamycin), cisplatin bleomycin sulfate, carmustine, chlorambucil, and cyclophosphamide hydroxyurea which, by themselves, are only effective at levels which are toxic or subtoxic to a patient. Cisplatin can be intravenously administered as a 100 mg/dose once every four weeks and adriamycin is intravenously administered as a 60 to 75 mg/ml dose once every 21 days. Co-administration of the human anti-α5β1 antibodies, or antigen binding fragments thereof, of the present disclosure with chemotherapeutic agents provides two anti-cancer agents which operate via different mechanisms which yield a cytotoxic effect to human tumor cells. Such co-administration can solve problems due to development of resistance to drugs or a change in the antigenicity of the tumor cells which would render them unreactive with the antibody.

[0238] Target-specific effector cells, *e.g.*, effector cells linked to compositions (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules) of the disclosure can also be used as therapeutic agents. Effector cells for targeting can be human leukocytes such as macrophages, neutrophils or monocytes. Other cells include eosinophils, natural killer cells and other IgG- or IgA-receptor bearing cells. If desired, effector cells can be obtained from the subject to be treated. The target-specific effector cells can be administered as a suspension of cells in a physiologically acceptable solution. The number of cells administered can be in the order of 10^8 to 10^9 but will vary depending on the therapeutic purpose. In general, the amount will be sufficient to obtain localization at the target cell, *e.g.*, a tumor cell expressing α5β1, and to effect cell killing by, *e.g.*, phagocytosis. Routes of administration can also vary.

[0239] Therapy with target-specific effector cells can be performed in conjunction with other techniques for removal of targeted cells. For example, anti-tumor therapy using the compositions (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules) of the disclosure and/or effector cells armed with these compositions can be used in conjunction with chemotherapy. Additionally, combination immunotherapy may be used to direct two distinct cytotoxic effector populations toward tumor cell rejection. For example, anti-α5β1

antibodies linked to anti-Fc-gamma RI or anti-CD3 may be used in conjunction with IgG- or IgA-receptor specific binding agents.

[0240] Bispecific and multispecific molecules of the disclosure can also be used to modulate FcγR or FcγR levels on effector cells, such as by capping and elimination of receptors on the cell surface. Mixtures of anti-Fc receptors can also be used for this purpose.

[0241] The compositions (*e.g.*, human, humanized, or chimeric antibodies, multispecific and bispecific molecules and immunoconjugates) of the disclosure which have complement binding sites, such as portions from IgG1, -2, or -3 or IgM which bind complement, can also be used in the presence of complement. In one case, *ex vivo* treatment of a population of cells comprising target cells with a binding agent of the disclosure and appropriate effector cells can be supplemented by the addition of complement or serum containing complement. Phagocytosis of target cells coated with a binding agent of the disclosure can be improved by binding of complement proteins. In another case target cells coated with the compositions (*e.g.*, human antibodies, multispecific and bispecific molecules) of the disclosure can also be lysed by complement. In yet another case, the compositions of the disclosure do not activate complement.

[0242] The compositions (*e.g.*, human, humanized, or chimeric antibodies, multispecific and bispecific molecules and immunoconjugates) of the disclosure can also be administered together with complement. Accordingly, within the scope of the disclosure are compositions comprising human antibodies, multispecific or bispecific molecules and serum or complement. These compositions are advantageous in that the complement is located in close proximity to the human antibodies, multispecific or bispecific molecules. Alternatively, the human antibodies, multispecific or bispecific molecules of the disclosure and the complement or serum can be administered separately.

[0243] Also within the scope of the present disclosure are kits comprising the antibody compositions of the disclosure (*e.g.*, human antibodies, bispecific or multispecific molecules, or immunoconjugates) and instructions for use. The kit can further contain one ore more additional reagents, such as an immunosuppressive reagent, a cytotoxic agent or a radiotoxic agent, or one or more additional human antibodies or antigen binding portions thereof of the disclosure (*e.g.*, a human antibody having a complementary activity which binds to an epitope in the α5β1 antigen distinct from the first human antibody).

[0244] Accordingly, patients treated with antibody compositions of the disclosure can be additionally administered (prior to, simultaneously with, or following administration of a human antibody of the disclosure) another therapeutic agent, such as a cytotoxic or radiotoxic agent, which enhances or augments the therapeutic effect of the human antibodies.

[0245] In other cases, the subject can be additionally treated with an agent that modulates, *e.g.*, enhances or inhibits, the expression or activity of Fcγ or Fcγ receptors by, for example, treating the subject with a cytokine. Cytokines for administration during treatment with the multispecific molecule include granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), granulocyte- macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), interferon-γ (IFN-γ), and tumor necrosis factor (TNF).

[0246] The compositions (e.g., human antibodies, multispecific and bispecific molecules) of the disclosure can also be used to target cells expressing FcγR or α5β1, for example for labeling such cells. For such use, the binding agent can be linked to a molecule that can be detected. Thus, the disclosure provides methods for localizing *ex vivo* or *in vitro* cells expressing Fc receptors, such as FcγR, or α5β1. The detectable label can be, e.g., a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor.

[0247] In a particular case, the disclosure provides methods for detecting the presence of α5β1 antigen in a sample, or measuring the amount of α5β1 antigen, comprising contacting the sample, and a control sample, with a human monoclonal antibody, or an antigen binding portion thereof, which specifically binds to α5β1, under conditions that allow for formation of a complex between the antibody or portion thereof and α5β1. The formation of a complex is then detected, wherein a different complex formation between the sample compared to the control sample is indicative the presence of α5β1 antigen in the sample.

[0248] In other cases, the disclosure provides methods for treating an α5β1 mediated disorder in a subject, *e.g.*, abnormal cell growth such as cancer, by administering to the subject the human antibodies or antigen binding portions thereof described above. Such antibodies and derivatives thereof are used to inhibit α5β1 induced activities associated with certain disorders, *e.g.*, angiogenesis, proliferation, and differentiation. By contacting the antibody with α5β1 (*e.g.*, by administering the antibody to a subject), the ability of α5β1 to

induce such activities is inhibited and, thus, the associated disorder is treated. The antibody composition can be administered alone or along with another therapeutic agent, such as a cytotoxic or a radiotoxic agent which acts in conjunction with or synergistically with the antibody composition to treat or prevent the α5β1 mediated disease.

[0249] In yet another case, immunoconjugates of the disclosure can be used to target compounds (*e.g.*, therapeutic agents, labels, cytotoxins, radiotoxoins immunosuppressants, etc.) to cells which have α5β1 cell surface receptors by linking such compounds to the antibody. Thus, the disclosure also provides methods for localizing *ex vivo* or *in vivo* cells expressing α5β1 (*e.g.*, with a detectable label, such as a radioisotope, a fluorescent compound, an enzyme, or an enzyme co-factor). Alternatively, the immunoconjugates can be used to kill cells which have α5β1 cell surface receptors by targeting cytotoxins or radiotoxins to α5β1.

[0250] The present disclosure is further illustrated by the following examples which should not be construed as further limiting. The contents of all figures and all references, patents and published patent applications cited throughout this disclosure are expressly incorporated herein by reference in their entirety.

EXAMPLES

Example 1: Generation of a Hybridoma Producing Anti-α5β1 Antibody

[0251] Illustrative antibodies in accordance with the disclosure were prepared, selected, and assayed as follows:

Immunization and hybridoma generation:

[0252] The following immunogens were used for hybridoma generation: purified recombinant human integrin-α5 protein-Fc; integrin-α5-His (R&D Systems, custom order); NIH3T3 cells transfected to express human α5; a Jurkat cell line, a U-937 cell line (ATCC Cat No CRL-1593) and a K-562 cell line (ATCC Cat No CCL-243) which naturally express human integrin α5β1.

[0253] Purified recombinant human integrin-α5 protein-Fc is a chimeric construct of the extracellular domain of human integrin α5 (amino acids 42-995) fused to a rat Fc domain that was cloned into the pSecTag2 vector and expressed using the 293-FreeStyle system (Invitrogen). NIH3T3 cells, transfected to express human α5, were produced as follows.

Full-length human integrin α5 cDNA (Invitrogen, Cat. No. FL1002, clone ID:3629647) was cloned from full-length human integrin α5 MGC clone (Invitrogen) and subcloned into a retrovirus expression vector (pBabe). The virus particles were generated and used to infect NIH3T3 cells (ATCC Cat No. CRL-1658). Puromycin was added to select for positive stable cell clones. Western Blot and FACS analyses of human α5 protein expression were performed to pick the high expression stable cell clones.

[0254] Fully human monoclonal antibodies to human integrin α5β1 were prepared using human Ig transgenic mouse strain Hco7/Hco12 as well as the human transchromosomal/transgenic strain, KM (Medarex, Inc.). These strains all express fully human antibodies that are indistinguishable from antibodies isolated from humans. In these mouse strains, the endogenous mouse kappa light chain gene has been homozygously disrupted as described in Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 and the endogenous mouse heavy chain gene has been homozygously disrupted as described in Example 1 of PCT Publication WO 01/09187. Each of these mouse strains carries a human kappa light chain transgene, KCo5, as described in Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. The HCo7 strain carries the HCo7 human heavy chain transgene as described in U.S. Patent Nos. 5,545,806, 5,625,825, and 5,545,807. The HCo12 strain carries the HCo12 human heavy chain transgene as described in Example 2 of PCT Publication WO 01/09187. The HCo7/HCo12 strain carries both the HCo7 and the HCo12 heavy chain transgenes. The KM strain carries a human mini-chromosome as described in Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102.

[0255] To generate fully human monoclonal antibodies to α5β1, HuMab mice of Hco7/Hco12 and KM strains were immunized with recombinant human integrin-α5 protein-Fc or integrin-α5-His, NIH3T3 cells, transfected to express human α5, and Jurkat cell line, U-937 cell line and K-562 cell line which naturally express human α5β1. General immunization schemes for HuMab mice are described in Lonberg, N. et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 and PCT Publication WO 98/24884. The mice were 6-16 weeks of age upon the first infusion of antigen. A purified recombinant preparation of human integrin-α5 protein-Fc or integrin-α5-his antigen (15-20 μg), a preparation of transfected NIH3T3 cells or Jurkat cells, U-937 cells,

and K-562 cells (1 x 10^7 cells) was used to immunize the HuMab mice intraperitoneally (IP) and subcutaneously (Sc).

[0256] Transgenic mice were immunized with antigen in Ribi adjuvant intraperitoneally and subcutaneously in 1-4 week intervals (up to a total of 16 immunizations). The immune response was monitored in blood taken by retro orbital bleeds. The serum was screened by FACS (as described below), and mice with sufficient titers of anti-α5β1 human immunoglobulin were used for fusions. Mice were boosted intravenously with antigen 3 and 2 days before sacrifice and removal of the spleen and/or lymph nodes. Typically, 10-20 fusions for each antigen were performed. A total of 60 Hco7/Hco12 and KM mice were immunized. Several dozen mice were immunized for each antigen.

Selection of HuMab Mice Producing Anti-α5β1 Antibodies:

[0257] To select HuMab mice producing antibodies that bound α5β1, sera from immunized mice were screened by flow cytometry (FACS) for binding to a cell line expressing full length human α5β1, and not to a control cell line not expressing α5β1. Briefly, α5-expressing NIH3T3 cells were incubated with serum from immunized mice diluted at 1:20. Cells were washed and specific antibody binding was detected with FITC-labeled anti-human IgG Ab. Flow cytometric analyses were performed on a FACS flow cytometry instrument (Becton Dickinson, San Jose, CA). Mice that developed the highest titers of anti-α5β1 antibodies were used for fusions. Fusions were performed as described below and hybridoma supernatants were tested for anti-α5β1 activity by FACS.

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies to α5β1:

[0258] The mouse splenocytes and/or lymph node lymphocytes, isolated from the HuMab mice, were fused using electrofusion (E-fusion, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) to the mouse myeloma cell line, Sp2/0 (ATCC, CRL-1581, Manassas, VA), using manufacturer recommended protocols. Briefly, single cell suspensions of splenic and/or lymph node lymphocytes from immunized mice were fused to equal number of Sp2/0 nonsecreting mouse myeloma cells using E-fusion. Cells were plated at approximately 2x10^4 splenocytes /well in flat bottom microtiter plates, and incubated for 10 to 14 days in selective medium containing 10% fetal bovine serum, 10% P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63) conditioned medium, 3 to 5% (IGEN) in DMEM (Mediatech, Herndon, VA,

Cat.No. CRL 10013), with high glucose, L-glutamine and sodium pyruvate), 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 mg/ml gentamycin and 1x HAT (Sigma, Cat. No. CRL -P-7185). After 1 to 2 weeks, cells were cultured in medium in which the HAT was replaced with HT. Approximately 10 to 14 days after cell plating supernatants from individual wells were screened first for whether they contained human gamma, kappa antibodies. The supernatants which were scored positive for human gamma, kappa were then subsequently screened by FACS (described above) for human anti-α5β1.

Monoclonal IgG antibodies:

[0259] The antibody secreting hybridomas were transferred to 24 well plates, screened again and, if confirmed positive for human anti-α5β1 IgG monoclonal antibodies, were subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones were then cultured *in vitro* to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for further characterization. The procedures described above were used to produce several anti-α5β1 monoclonal antibodies, including antibodies designated as "22B5", "24C7", "1D9", and "2D2", which are described herein.

Example 2: Structural Characterization of Human Monoclonal Antibody 22B5

[0260] The cDNA sequences encoding the heavy and light chain variable regions of the 22B5 monoclonal antibody were obtained from the 22B5 hybridoma using standard PCR techniques and were sequenced using standard DNA sequencing techniques.

[0261] The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 22B5 are shown in Figures 1A and 1B and in SEQ ID NOs: 11 and 7, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 22B5 are shown in Figures 1C and 1D and in SEQ ID NOs: 12 and 8, respectively.

[0262] The subclass of the original 22B5 molecule was IgG4. The IgG subclass was switched to IgG1 to provide FcγR binding and effector functions, such as ADCC. Three mutations were introduced into the IgG1 constant region (S247D, A338L, and I340E) by site-directed mutagenesis to further increase binding to FcγRs and effector function activity. 22B5 with the IgG1 subclass and containing these three mutations is referred to as "22B5/DLE" or "22B5 IgG1 DLE". Two mutations of the heavy chain variable domain were returned to germ line to minimize immunogenicity (I30S and N33S). No mutations were

found in the light chain variable sequence. The heavy chain of 22B5/DLE is shown as SEQ ID NO: 9, while the light chain of 22B5/DLE is shown as SEQ ID NO: 10.

[0263] Comparison of the 22B5 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences demonstrated that the 22B5 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 4-39, a D segment from the human germline 3-10, and a JH segment from human germline JH 6b. The alignment of the 22B5 V_H sequence to the germline V_H 4-39 sequence is shown in Figure 2. Further analysis of the 22B5 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1B, and in SEQ ID NOs: 1, 2 and 3, respectively.

[0264] Comparison of the 22B5 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences demonstrated that the 22B5 light chain utilizes a V_L segment from human germline VK L6 and a JK segment from human germline JK 4. The alignment of the 22B5 V_L sequence to the germline VK L6 sequence is shown in Figure 2. Further analysis of the 22B5 V_L sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1D, and in SEQ ID NOs: 4, 5 and 6, respectively.

Example 3: Characterization of Binding Specificity and Binding Kinetics of Human Monoclonal Antibody 22B5

[0265] In this example, binding affinity and binding kinetics of the 22B5 human anti-α5β1 antibody with the IgG1 DLE mutations (22B5/DLE) were examined by Biacore analysis. Also, binding specificity was examined by flow cytometry (FACS).

Binding affinity and kinetics

[0266] Binding kinetics and nominal avidity of 22B5/DLE to the extracellular domain of α5β1 was determined using Biacore analysis (Biacore AB, Uppsala, Sweden). To perform BIAcore kinetic analyses, the 22B5/DLE antibody was immobilized on a biosensor chip and various concentrations of human recombinant α5β1 extracellular domain were flowed across the surface at 25.0°C (see Figure 3). The binding data were fit globally to a simple one-to-one binding model with drifting baseline. 22B5/DLE binds reversibly to α5β1. The binding constant (K_D) to human recombinant α5β1 extracellular domain ranged from 2.7

to 4.1 nM. The K_D was greater when measured in the absence of divalent cations, consistent with cation-dependent activation of integrin. The kinetic binding parameters ranged from 3.4 x 10^{-5} to 4.5 x 10^{-5} $M^{-1}s^{-1}$ for the on-rate and from 1.2 x 10^{-3} to 1.4 x 10^{-3} s^{-1} for the off-rate (see Figure 3 and Table 1).

[0267] To obtain a nominal avidity measurement, human recombinant α5β1 extracellular domain was immobilized on a biosensor chip and various concentrations of 22B5/DLE were flowed across the surface at 25.0°C. A nominal avidity value was estimated to be 0.05 pM in 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % P20 with 4.0 mM $MgCl_2$.

Table 1: Summary of Binding and Kinetic Data Obtained from BIAcore Studies

Affinity of 22B5/DLE for α5β1 (Biacore)	
K_D ($CaCl_2$)	2.7 nM
K_D ($MgCl_2$)	4.1 nM
On rate (k_{on}) ($CaCl_2$)	4.5 x 10^{-5} $M^{-1}s^{-1}$
On rate (k_{on}) ($MgCl_2$)	3.4 x 10^{-5} $M^{-1}s^{-1}$
Off rate (k_{off}) ($CaCl_2$)	1.2 x 10^{-3} s^{-1}
Off rate (k_{off}) ($MgCl_2$)	1.4 x 10^{-3} s^{-1}
Avidity of 22B5/DLE for α5β1 (K_D, Biacore)	0.05 pM

$CaCl_2$ refers to buffer conditions of 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20 with 4.0 mM $CaCl_2$; $MgCl_2$ refers to buffer conditions of 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20 with 4.0 mM $MgCl_2$.

Cellular affinity for α5β1 determination by FACS

[0268] The 22B5/DLE antibody was tested for its binding affinity to cell surface integrin α5 using a FACS assay, employing endogenous human integrin α5β1 expressing cells (HUVEC). Briefly, the cells were detached using trypsin-EDTA and washed with cold PBS. After being aliquoted into 96-well plates, the cells were blocked by serum and incubated with different concentrations of specific mAb for 1 hour at 4°C. Subsequently, the cells were washed and incubated with an anti-human κ secondary antibody conjugated with the R-PE fluorophore and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. 10,000 events were collected for each sample without applying any gating. For K_D determination, the Geometric Mean of each sample histogram was calculated and plotted as a function of the mAb concentration. K_D was calculated after fitting to a two-state equilibrium model. 22B5/DLE binds to endogenous α5β1 with K_D of 2.15 nM (n=4) in HUVEC (see Figure 4).

Example 4: Affinity for Fcγ Receptors by Biacore

[0269] The ability of 22B5/DLE, which contains the IgG1 DLE triple mutations (as discussed previously in Example 2), to enhance binding to the FcγRs was evaluated in a Biacore binding experiment. The FcγR binding affinities of 22B5/DLE were compared with the binding affinity of wild type (wt) IgG1. The three classes of FcγRs tested were: 1) the high affinity receptor FcγRI; 2) the two polymophic variants of the low affinity receptor FcγRIIa/131H and FcγRIIa/131R; and 3) the two polymorphic variants of the medium affinity receptor, FcγRIIIa/158F and FcγRIIIa /158V. The results (shown in Figure 5, and summarized in Table 2) show an approximate 6-fold increase for the high affinity receptor FcγRI. A 122- and 70-fold enhancement for binding to the medium affinity receptor FcγRIII/158F and 158V, respectively, was observed. The binding affinity comparison of 22B5/DLE and wild type IgG1 was also evaluated against the murine Fcγ receptors. The greatest enhancement in binding was to the mFcγRIV, followed by mFcγRI, and mFcγRIII (see Figure 5).

Table 2: Biacore binding to FcγRs (K_D, Fold enhancement over wt IgG1)

FcγR	K_D (Fold enhancement over wt IgG1)
Human FcγRI	5.8 nM (6 X)
Human FcγRIIa/131H	1000 nM (1.6 X)
Human FcγRIIa/131R	650 nM (2.3 X)
Human FcγRIII/158F	27 nM (122 X)
Human FcγRIII/158V	9.4 nM (70 X)
Murine FcγRI	96 nM (14 X)
Murine FcγRIII	1700 nM (5 X)
Murine FcγRIV	9.1 nM (260 X)

Example 5: Cellular Functional Activity of 22B5/DLE

Cell Adhesion Blockade

[0270] The ability of 22B5/DLE to interrupt integrin α5β1-mediated cell adhesion was tested. Cell adhesion assays were performed by pre-incubating HUVEC cells with an antibody (22B5/DLE, 22B5 IgG1, IgG2 and IgG4 subclass variants, or a negative control mAb (BHA2 IgG1)) and subsequently plated in fibronectin (FN) or collagen coated plates. HUVEC cells (15,000) were mixed with antibody in adhesion buffer (Hepes-buffered salt solution containing glucose and bovine serum albumin) for 20 minutes at room temperature. Cells were added to the wells of 96-well plate coated with fibronectin or collagen, and allowed to adhere to the plate for one hour at 37°C / 5% CO_2. Non-adherent cells were removed by washing each well three times. The amount of adherent cells remaining in each well was measured. The adherent cells were lysed by the addition of a buffer containing the CyQUANT GR dye and fluorescence was measured at Ex/Em: 485/535 nm with a plate reader. As can be seen in Figure 6, function-blocking integrin α5β1 mAbs selectively inhibit HUVEC adhesion to fibronectin, but not to collagen (negative control). As shown in Figure 6, the IC_{50} for 22B5/DLE and its subclass variants (wild type IgG1, IgG1 DLE, IgG2, and IgG4) were similar in this one-hour assay. These data demonstrate that binding of the antibody with α5 and/or α5β1 inhibits binding of the integrin with fibronectin. These data further indicate that the antibody binds α5β1 when it is expressed on the surface of the cells. That is, the epitope recognized by the antibody is available when the α5 and β1 chains are associated and the epitope is available for binding when the integrin is expressed on the cell surface.

Example 6: In-vitro ADCC Effector Function

[0271] Effector function activities were assessed through ADCC assays in the presence of human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) against α5β1-positive target cells using standard methods. Integrin α5 expression levels across a range of cell lines were measured by Western blot analysis, as follows. Cells were lysed in RIPA Lysis Buffer (Upstate) containing protease (Roche) and phosphatase inhibitors (Calbiochem). Lysates (3 μg of total protein each) were electrophoresed on SDS-PAGE gel and immunoblotted with anti-integrin α5 antibodies. Immunoreative bands were identified and analyzed by Odyssey

Infrared Imaging System from LI-COR Bioscience. An example of the range of expression is shown in Figure 7.

[0272] To measure ADCC, effector cells (PBMCs) were isolated using Ficoll gradient centrifugation from San Diego Blood Bank samples, according to standard methods. Ten thousand target cells (HUVEC or tumor lines) were pre-incubated with antibody in growth medium at room temperature for 20 minutes, then one million human PBMCs (E:T=100:1) were added, and the mixture was incubated at 37°C/5% CO_2 for 4 hours. ADCC mediated cell lysis was measured using lactate dehydrogenase (LDH) release detection (Roche) or ToxiLight BioAssay Kit (Cambrex), following standard protocols.

[0273] 22B5/DLE binds to tumor or endothelial-expressed integrin $\alpha5\beta1$ and promotes ADCC (up to 80% target cell lysis) with an EC_{50} of 0.04 nM compared with 0.23 nM for wt 22B5 IgG1. These data indicate that the DLE mutation enhanced ADCC activity compared with wild type IgG1. No ADCC was observed for either 22B5 IgG2 or 22B5 IgG4 in the four-hour assay. KLH IgG1 was used as a negative control mAb. Examples of ADCC in HUVEC and a representative tumor line (U87MG) are shown in Figure 8 (representatives of both detection methods).

[0274] The cellular cytotoxicity induced by 22B5/DLE and wt 22B5 IgG1 correlates with the level of $\alpha5\beta1$-expression by the cell line, as shown by the data provided in Figure 9. The cells with highest expression of $\alpha5\beta1$ (panel A, U87MG) demonstrated the highest level of cell toxicity, while the cell ines with medium expression (Figure 9, Hs578T and 3T3,a5) demonstrated intermediate cytotoxicity. Notably, 22B5/DLE enhanced the ADCC effects in M24met cells, which expressed low level of $\alpha5\beta1$ (examples in the lower panel of Figure 9). These data demonstrate that ADCC is mediated, at least in part, by antibody binding with $\alpha5\beta1$ expressed by the cell.

Example 7: In Vivo Anti-metastatic Efficacy

[0275] In addition to its pro-proliferation, pro-migration and pro-survival activities in endothelial and tumor cells, integrin $\alpha5\beta1$ is also implicated in tumor metastasis by promoting tumor cell extravasation and migration to distant organs. The following study aimed to demonstrate anti-metastatic efficacy of 22B5/DLE in a preclinical model.

Inhibition of A549-Luc Experimental Metastasis to the Lung

[0276] A549-Luc is a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line transfected with the luciferase gene. When implanted intravenously, it preferably localizes in the lung, which can be measured by bioluminescence imaging (BLI). In this study, A549-Luc cells were injected ($3x10^6$ per animal) via tail vein in SCID BALB/c mice that had received a pre-dose of the relevant antibody two days prior to the injection. Following implantation, animals were dosed once a week until week 8. Bioluminescence of individual animals was measured once a week until week 20.

[0277] 22B5/DLE exhibited superior anti-tumor metastasis efficacy with a TGI (tumor growth inhibition) of 97% at week 8 (final week of dosing), which is statistically significant ($p<0.01$) compared with the control group. Dosing with 22B5 IgG2, which is not expected to mediate ADCC in this model, also achieved a significant TGI of 89% at week 8 (Figure 10A). The p values of the comparison between 22B5/DLE and 22B5 IgG2 at weeks 5, 6, 7, and 8 were 0.07, 0.03, 0.08 and 0.17, respectively. All treatments were stopped after week 8 while daily monitoring for adverse physiological signs and weekly measurements by BLI of the animals were continued.

[0278] Tumors in the 22B5/DLE treated group remained suppressed through week 13, whereas those in 22B5 IgG2 treated group began to grow rapidly approximately 2 weeks after dosing cessation (Figure 10B). The study end point was considered reached when tumor BLI reached $1x10^8$ photons/second, at which time the mice were sacrificed. The Kaplan-Meier plot (Figure 10C) shows that 22B5/DLE significantly extended the median survival time of the animals to 20 weeks compared with 14 weeks for 22B5 IgG2 treated animals and 10 weeks for the control group.

[0279] These data demonstrate that in this model, the anti-tumor effect of 22B5 is not mediated exclusively by ADCC. That is, 22B5-IgG2 inhibited tumor growth/invasion even though human IgG2 is not known to mediate effector functions, including cell cytotoxicity, and yet the antibody mediated anti-tumor effects. Further, the data demonstrated that tumor growth remained suppressed after administration of 22B5-IgG1-DLE was stopped. These data show that blocking of $\alpha5\beta1$ binding with FN mediates an anti-tumor effect (22B5-IgG2) which is further enhanced by ADCC (22B5-IgG1/DLE).

Example 8: Structural Characterization of Human Monoclonal Antibodies 24C7, 1D9, and 2D2

[0280] The cDNA sequences encoding the heavy and light chain variable regions of the 24C7, 1D9, and 2D2 monoclonal antibodies were obtained from the 24C7, 1D9, and 2D2 (respectively) hybridomas using standard PCR techniques and were sequenced using standard DNA sequencing techniques.

[0281] The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 24C7 are shown in Figures 1E and 1F and in SEQ ID NOs: 21 and 19, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 24C7 are shown in Figures 1G and 1H and in SEQ ID NOs: 22 and 20, respectively.

[0282] The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 1D9 are shown in Figures 1I and 1J and in SEQ ID NOs: 31 and 29, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 1D9 are shown in Figures 1K and 1L and in SEQ ID NOs: 32 and 30, respectively.

[0283] The nucleotide and amino acid sequences of the heavy chain variable region of 2D2 are shown in Figures 1M and 1N and in SEQ ID NOs: 41 and 39, respectively. The nucleotide and amino acid sequences of the light chain variable region of 1D9 are shown in Figures 1O and 1P and in SEQ ID NOs: 42 and 40, respectively.

[0284] The subclass of the original 24C7, 1D9, and 2D2 molecules was IgG1. For the IgG1 subclass, three mutations were introduced into the IgG1 constant region (S247D, A338L, and I340E) by site-directed mutagenesis to further increase binding to FcγRs and effector function activity. Thus, 24C7 with the IgG1 subclass and containing these three mutations is referred to as "24C7/DLE" or "24C7 IgG1 DLE". Similarly, analogous antibodies with these three mutations are referred to herein as "1D9/DLE" or "1D9 IgG1 DLE", and "2D2/DLE" or "2D2 IgG1 DLE". Similarly, antibodies with the two mutations S247D and I340E are referred to herein as "DE" mutants, e.g. "24C7/DE", or "24C7 IgG1 DE". Similar designations for any of the antibodies as described herein and with any one, two, or three of the mutations mentioned above, are referred to in a similar manner. For example, "1D9/DE" refers to the 1D9 antibody as described herein, with an IgG1 subclass with the following mutations in the Fc region – S247D and I340E. Similarly, "2D2/L"

would refer to the 2D2 antibody as described herein, with an IgG1 isotype and containing the A338L mutation, and so forth.

[0285] Comparison of the 24C7 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences demonstrated that the 24C7 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-30.3, a D segment from the human germline 7-27, and a JH segment from human germline JH 6b. Analysis of the 24C7 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1F, and in SEQ ID NOs: 13, 14 and 15, respectively.

[0286] Comparison of the 24C7 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences demonstrated that the 24C7 light chain utilizes a V_L segment from human germline VK L6 and a JK segment from human germline JK 2. Analysis of the 24C7 V_L sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1H, and in SEQ ID NOs: 16, 17 and 18, respectively.

[0287] Comparison of the 1D9 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences demonstrated that the 1D9 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-30.3, and a JH segment from human germline JH 6b. The D segment could not be assigned a germline gene because of extensive mutations. Analysis of the 1D9 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1J, and in SEQ ID NOs: 23, 24 and 25, respectively.

[0288] Comparison of the 1D9 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences demonstrated that the 1D9 light chain utilizes a V_L segment from human germline VK L6 and a JK segment from human germline JK 1. Analysis of 1D9 V_L sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1L, and in SEQ ID NOs: 26, 27 and 28, respectively.

[0289] Comparison of the 2D2 heavy chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin heavy chain sequences demonstrated that the 2D2 heavy chain utilizes a V_H segment from human germline V_H 3-30.3, a D segment from the human

germline 7-27, and a JH segment from human germline JH 6b. Analysis of the 2D2 V_H sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the heavy chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1N, and in SEQ ID NOs: 33, 34 and 35, respectively.

[0290] Comparison of the 2D2 light chain immunoglobulin sequence to the known human germline immunoglobulin light chain sequences demonstrated that the 2D2 light chain utilizes a V_L segment from human germline VK L6 and a JK segment from human germline JK 3. Analysis of the 2D2 V_L sequence using the Kabat system of CDR region determination led to the delineation of the light chain CDR1, CDR2 and CD3 regions as shown in Figure 1P, and in SEQ ID NOs: 36, 37 and 38, respectively. A table showing the gene utilization for antibodies 22B5, 2D2, 24C7, and 1D9 monoclonal antibodies is shown below as Table 3.

Table 3: Gene Utilization

	Heavy Chain			Light Chain	
Antibody	**VH**	**D**	**JH**	**VK**	**JK**
22B5	4-39	3-10	JH 6b	Vk L6	JK 4
2D2	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 3
24C7	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 2
1D9	3-30.3	Not determined	JH 6b	Vk L6	JK 1

Example 9: Characterization of Binding Specificity and Binding Kinetics of Human Monoclonal Antibodies 22B5, 24C7, 1D9, and 2D2

[0291] In this example, binding specificity of the 22B5, 24C7, 1D9, and 2D2 human anti-α5β1 antibodies of IgG1 subclass – with and without the IgG1 DLE mutations (i.e. "22B5 G1 DLE", "22B5 G1", "1D9 G1 DLE", "1D9 G1" etc.) was examined by flow cytometry using fluorescence activated cell sorting (FACS).

Cellular affinity for α5β1 determination by FACS

[0292] The 22B5/DLE, 24C7/DLE, 1D9/DLE, and 2D2/DLE antibodies were tested for their binding affinity to cell surface integrin α5 using a FACS assay, employing

endogenous human integrin α5β1 expressing cells (HUVEC). Briefly, the cells were detached using trypsin-EDTA and washed with cold PBS. After being aliquoted into 96-well plates, the cells were blocked by serum and incubated with different concentrations of specific mAb for 1 hour at 4°C. Subsequently, the cells were washed and incubated with an anti-human κ secondary antibody conjugated with the R-PE fluorophore and analyzed using a FACSCalibur flow cytometer. 10,000 events were collected for each sample without applying any gating. For K_D determination, the Geometric Mean of each sample histogram was calculated and plotted as a function of the mAb concentration. K_D was calculated after fitting to a two-state equilibrium model. Results are shown in Figures 11A and 11B.

Example 10: *In vitro* ADCC Effector Function of Human Monoclonal Antibodies 22B5, 24C7, 1D9, and 2D2

[0293] Effector function activities were assessed through antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) assays as described previously in Example 6. EC_{50} values for promoting ADCC (up to 80% target cell lysis) in a representative tumor line (U87MG) are shown in Figure 12 for the antibodies 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE, and 24C7/DLE.

Example 11: In vivo ADCC-dependent anti-tumor efficacy in a syngeneic model of metastatic melanoma

[0294] To demonstrate an ADCC specific response the human monoclonal antibody 1D9/DLE (which binds to human and murine α5β1 but does not functionally neutralize α5β1) was tested in a tumor growth inhibition (TGI) model in syngenic mice with intact immune effector cells. Specifically, ADCC-mediated anti-tumor activity was evaluated in a syngeneic mouse model in which murine melanoma B16F10 cells expressed α5β1. Integrin α5-expressing mouse melanoma line B16F10 is highly metastatic and primarily colonizes to the lung once injected intravenously. The tumor cells were injected intravenously into immune-competent C57BL/6 mice. B16F10 cells (2×10^5 per animal) were injected via tail vein into the syngeneic host C57BL/6 mice pre-dosed with antibodies (10 mg/kg, n=10 per group) 1 day prior to injection. The animals were dosed subcutaneously with antibody once

a week for a total of 3 weeks. The animals were sacrificed and the lungs were resected at day 21.

[0295] As shown by the results in Figure 13, the 1D9/DLE antibody produced significant *in vivo* anti-tumor efficacy indicating that an ADCC response alone is sufficient to produce TGI. To delineate the specific impact of ADCC in the model, animals were treated with 1D9 IgG2 (not known to mediate ADCC) and 1D9 IgG1 DLE (IgG1 isotype with Fc enhancement by virtue of the DLE mutations). A greater anti-tumor efficacy was observed with 1D9 IgG1 DLE than with 1D9 IgG2. Because the isotype pairs have identical amino acid sequences in the antigen binding domain and *in vitro* activities, the data show that enhanced ADCC as a result of DLE mutations was responsible for the superior efficacy of 1D9 IgG1 DLE.

Deposit Information

[0296] Applicants have deposited the heavy and light chain variable regions of the antibody designated as 22B5 herein with the American Type Culture Collection (ATCC) Manassas, VA 20110-2209 U.S.A. The 22B5 VH region was deposited on July 16, 2008, and was assigned ATCC Deposit No. PTA-9377. The 22B5 VL region was deposited on July 16, 2008, and was assigned ATCC Deposit No. PTA-9377. These deposits were made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). These deposits will be maintained without restriction in the ATCC depository for a period of 30 years, or 5 years after the most recent request, or for the effective life of the patent, whichever is longer, and will be replaced if the deposits become non-viable during that period. Availability of the deposited materials is not to be construed as a license to practice any aspects of the present disclosure in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws. The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice all aspects of the present disclosure. The present disclosure is not to be limited in scope by the materials deposited since the deposited embodiment is intended as a single illustration of certain aspects of the disclosure and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this disclosure. The deposit of material herein does not

constitute an admission that the written description herein is inadequate to enable the practice of any aspect of the disclosure, including the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that it represents. Indeed, various modifications of the disclosure in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING (a.a. = amino acid; n.a. = nucleic acid)

SEQ ID NO:	SEQUENCE		SEQ ID NO:	SEQUENCE
1	V_H CDR1 a.a. 22B5		23	V_H CDR1 a.a. 1D9
2	V_H CDR2 a.a. 22B5		24	V_H CDR2 a.a. 1D9
3	V_H CDR3 a.a. 22B5		25	V_H CDR3 a.a. 1D9
4	V_L CDR1 a.a. 22B5		26	V_L CDR1 a.a. 1D9
5	V_L CDR2 a.a. 22B5		27	V_L CDR2 a.a. 1D9
6	V_L CDR3 a.a. 22B5		28	V_L CDR3 a.a. 1D9
7	V_H a.a. 22B5		29	V_H a.a. 1D9
8	V_L a.a. 22B5		30	V_L a.a. 1D9
9	Heavy a.a. 22B5/DLE		31	V_H n.a. 1D9
10	Light a.a. 22B5		32	V_L n.a. 1D9
11	V_H n.a. 22B5			
12	V_L n.a. 22B5		33	V_H CDR1 a.a. 2D2
			34	V_H CDR2 a.a. 2D2
13	V_H CDR1 a.a. 24C7		35	V_H CDR3 a.a. 2D2
14	V_H CDR2 a.a. 24C7			
15	V_H CDR3 a.a. 24C7		36	V_L CDR1 a.a. 2D2
			37	V_L CDR2 a.a. 2D2
16	V_L CDR1 a.a. 24C7		38	V_L CDR3 a.a. 2D2
17	V_L CDR2 a.a. 24C7			
18	V_L CDR3 a.a. 24C7		39	V_H a.a. 2D2
			40	V_L a.a. 2D2
19	V_H a.a. 24C7		41	V_H n.a. 2D2
20	V_L a.a. 24C7		42	V_L n.a. 2D2
21	V_H n.a. 24C7		43	IgG1 a.a. heavy chain constant regions with A247D, A338L, and I340E mutations
22	V_L n.a. 24C7		44	IgG1 a.a. light chain constant region

Claims

We claim:

1. An isolated monoclonal antibody, or an antigen-binding portion thereof, that:
(a) binds to human integrin $\alpha5\beta1$ with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less; and
(b) is capable of inducing antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

2. The antibody of claim 1, which is a full-length human antibody of subclass IgG1.

3. The antibody or antigen-binding portion thereof of claim 1, wherein said antibody or antigen-binding portion binds to human integrin $\alpha5\beta1$ with a K_D of $5 x10^{-8}$ M or less.

4. An isolated monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof that binds to human integrin $\alpha5\beta1$ with a K_D of $1x10^{-7}$ M or less and comprises a heavy chain variable region that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:7.

5. The antibody or antigen-binding portion thereof of claim 4 further comprising a light chain variable region that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:8.

6. An isolated monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising:
(a) a heavy chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 1;
(b) a heavy chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 2;
(c) a heavy chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 3;
(d) a light chain variable region CDR1 comprising SEQ ID NO: 4;
(e) a light chain variable region CDR2 comprising SEQ ID NO: 5; and
(f) a light chain variable region CDR3 comprising SEQ ID NO: 6.

7. The antibody or antigen-binding portion of claim 6, comprising:
(a) a heavy chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 7; and
(b) a light chain variable region comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 8.

8. The antibody of any of claims 1 to 7, where said antibody is a human full-length IgG1 antibody, and wherein at least one amino acid in the Fc region of said antibody is mutated, and further wherein said antibody exhibits greater ADCC than an identical antibody wherein said at least one amino acid is not mutated.

9. The antibody of claim 8, wherein the at least one mutation occurs at amino acid position serine 247, alanine 338, or isoleucine 340.

10. The antibody of claim 9, where the at least one mutation is selected from the group consisting of serine 247 to aspartic acid (S247D), alanine 338 to leucine (A338L), and isoleucine 340 to glutamic acid (I340E).

11. The antibody of claim 10, where the antibody comprises the mutations S247D, A338L, and I340E.

12. The antibody of claim 6 where said antibody comprises a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.

13. The antibody of claim 6, where said antibody comprises a light chain amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10.

14. The antibody of claim 6, where said antibody comprises a heavy chain amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID

NO: 9 and a light chain amino acid sequence that is at least 90% identical to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10.

15. A composition comprising the antibody or antigen-binding portion of any of claims 1 to 14, and a pharmaceutically acceptable carrier.

16. An isolated nucleic acid molecule encoding the heavy and/or light chain of any of the antibodies, or antigen-binding portions thereof of any of claims 1 to 14.

17. An expression vector comprising the nucleic acid molecule of claim 16.

18. A host cell comprising the expression vector of claim 17.

19. A method for preparing an anti-α5β1 antibody or antigen-binding portion thereof, comprising expressing the antibody or antigen-binding portion in the host cell of claim 18.

20. A method of inhibiting growth of tumor cells expressing integrin α5β1, comprising contacting the cells with the antibody, or antigen-binding portion thereof, of any of claims 1 to 14 in an amount effective to inhibit growth of the tumor cells.

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGAC
CCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTAGCT
ACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGG
AGTATCTACTATAGTGGGAGAAACTACAACAACCCGTCCCTCAAGAGTCG
AGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGA
GCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACATTAC
TATGGTTCGGGGAGTTCCTACTACTACTACGATCTGGACGTCTGGGGCCA
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figure 1A: DNA sequence of 22B5 heavy chain variable region (SEQ ID NO:11)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSG
RNYNNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYYGSGSSYYYY
DLDVWGQGTTVTVSS

Figure 1B: Amino acid sequence of 22B5 heavy chain variable region (SEQ ID NO:7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA
AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAG
CCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGAT
GCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTC
TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTG
CAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCACTTTCGGCGGA
GGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figure 1C: DNA sequence of 22B5 light chain variable region (SEQ ID NO:12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

Figure 1D: Amino acid sequence of 22B5 light chain variable region (SEQ ID NO:8)

CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCAATAAAAACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACCTACT
ACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figure 1E: DNA sequence of 24C7 heavy chain variable region (SEQ ID NO:21)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSNKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAREYWGTYY
YGMDVWGQGTTVTVSS

Figure 1F: Amino acid sequence of 24C7 heavy chain variable region (SEQ ID NO:19)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTACCAACTGGCCGTACACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGA
GATCAAA

Figure 1G: DNA sequence of 24C7 light chain variable region (SEQ ID NO:22)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRTNWPYTFGQGTKLEIK

Figure 1H: Amino acid sequence of 24C7 light chain variable region (SEQ ID NO:20)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCAGTACCTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
ATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGTCCCCCCCCCATCTACT
ACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTC
A

Figure 1I: DNA sequence of 1D9 heavy chain variable region (SEQ ID NO:31)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSTYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARESPPIYYYY
GMDVWGQGTTVTVSS

Figure 1J: Amino acid sequence of 1D9 heavy chain variable region (SEQ ID NO:29)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

Figure 1K: DNA sequence of 1D9 light chain variable region (SEQ ID NO:32)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

Figure 1L: Amino acid sequence of 1D9 light chain variable region (SEQ ID NO:30)

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCC
TGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGCTATGCAC
TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATCAT
TTGATGGAAGCACTAAATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCAT
CTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGGATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA
GCTGAGGACACGGCTCTGTATTACTGTGCGAGAGAATACTGGGGAACCTACT
ACTACGGGACGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA

Figure 1M: DNA sequence of 2D2 heavy chain variable region (SEQ ID NO:41)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISF
DGSTKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTALYYCAREYWGTYYY
GTDVWGQGTTVIVSS

Figure 1N: Amino acid sequence of 2D2 heavy chain variable region (SEQ ID NO:39)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAG
AGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAGCTACTTAGCCTGG
TACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGATGCATCCA
ACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGA
CTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT
GTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGG
AAATCAAA

Figure 1O: DNA sequence of 2D2 light chain variable region (SEQ ID NO:42)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVNSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRA
TGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPRTFGQGTKVEIK

Figure 1P: Amino acid sequence of 2D2 light chain variable region (SEQ ID NO:40)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGP**D**VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP**L**P**E**EK
TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

Figure 1Q: Amino acid sequence of IgG1 heavy chain constant region with S247D, A338L, and I340E mutations in bold and underlined (SEQ ID NO:43)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Figure 1R: Amino acid sequence of IgG1 light chain constant region (SEQ ID NO:44)

V_H

```
      Germline     QLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWG WIRQPPGKGLEWI
22b5 I30S N33S     --------- -------------------------.---------------

      Germline     GSIYYSG STYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
22b5 I30S N33S     -------RN -N-----------------------------------------

      Germline     QYYYGSG SYYNYYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
22b5 I30S N33S     H.------ ...S----DL-------------
```

V_κ

```
      Germline     EIVLTQSPA TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
22b5 I30S N33S     --------- ----------------------------------------

      Germline     ASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGG
22b5 I30S N33S     --------- ----------------------------------------

      Germline     GTKVEIK
22b5 I30S N33S     -------
```

Figure 2

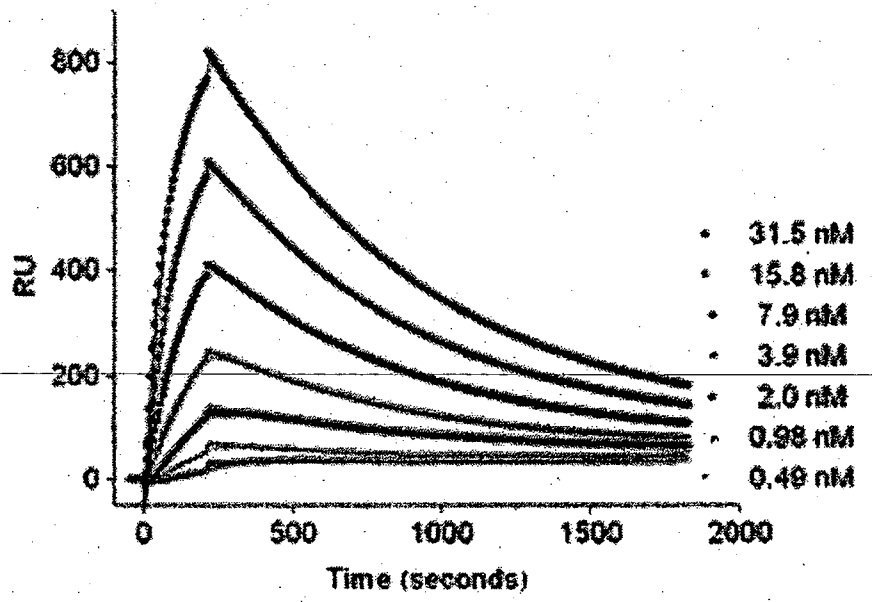

800
600
400
200
0
RU
0
500
1000
1500
2000
Time (seconds)
31.5 nM
15.8 nM
7.9 nM
3.9 nM
2.0 nM
0.98 nM
0.49 nM

Figure 3

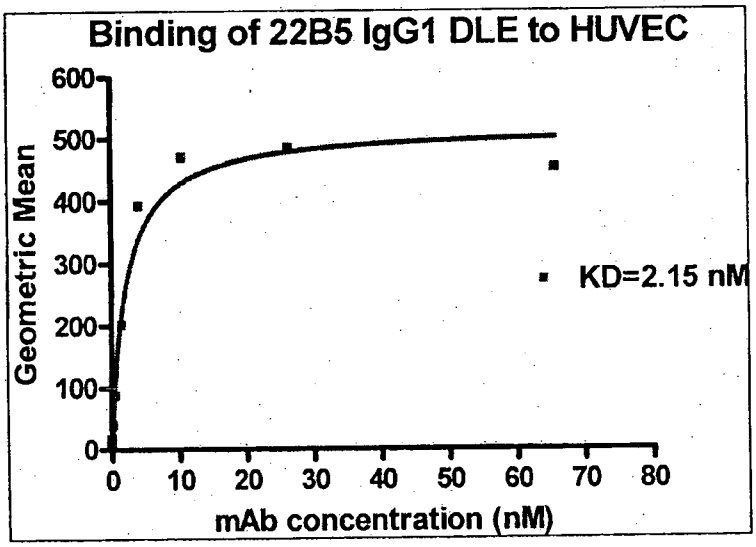

Binding of 22B5 IgG1 DLE to HUVEC
Geometric Mean
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
mAb concentration (nM)
KD=2.15 nM

Figure 4

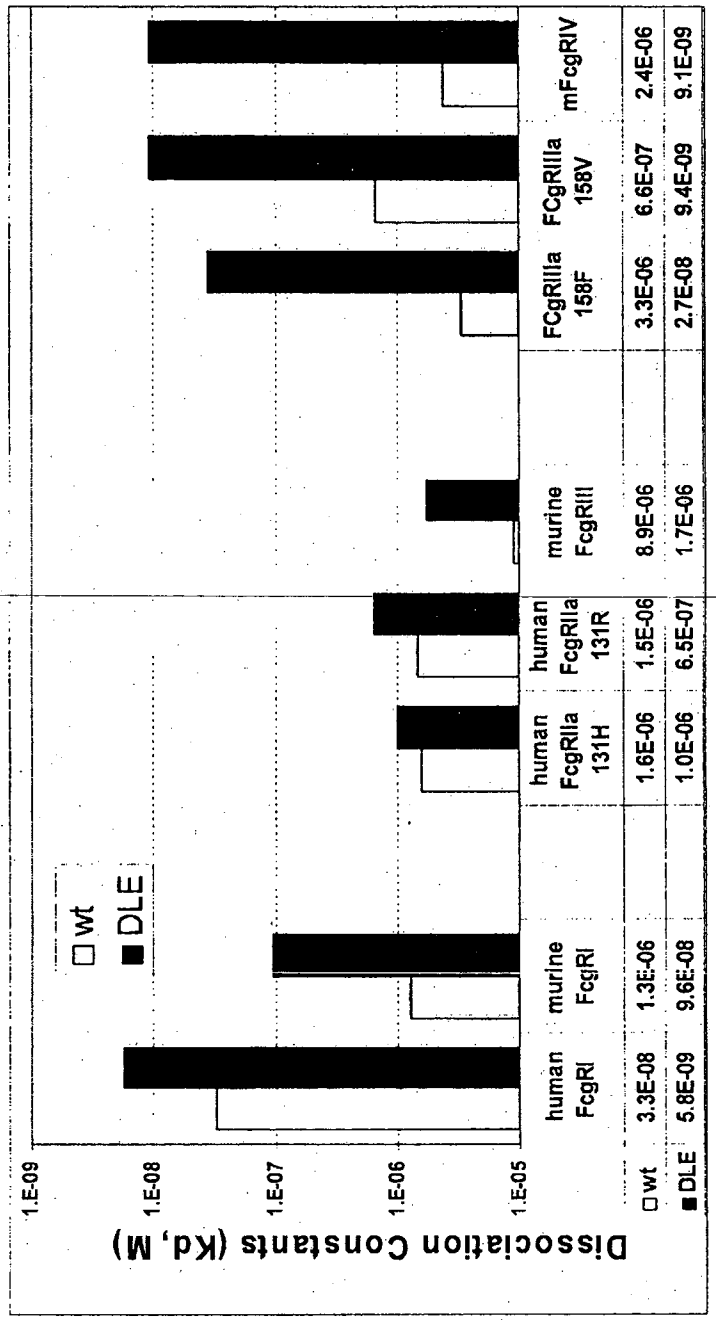
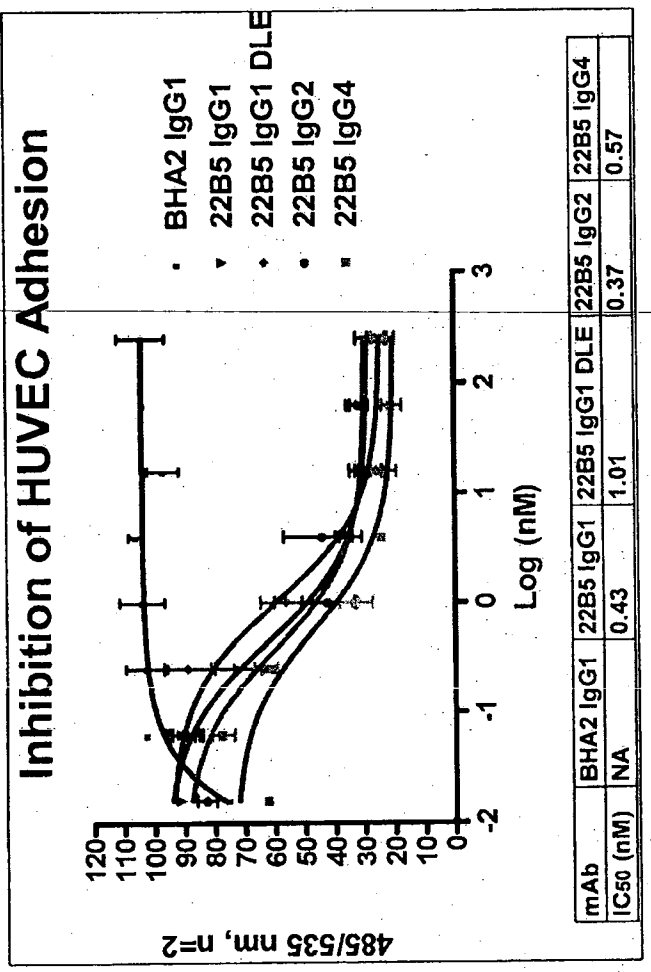

Dissociation Constants (Kd, M)
1.E-09
1.E-08
1.E-07
1.E-06
1.E-05
wt
DLE
human FcgRI
murine FcgRI
human FcgRIIa 131H
human FcgRIIa 131R
murine FcgRIII
FCgRIIIa 158F
FCgRIIIa 158V
mFcgRIV
wt 3.3E-08 1.3E-06 1.6E-06 1.5E-06 8.9E-06 3.3E-06 6.6E-07 2.4E-06
DLE 5.8E-09 9.6E-08 1.0E-06 6.5E-07 1.7E-06 2.7E-08 9.4E-09 9.1E-09

Figure 5



mAb	BHA2 IgG1	22B5 IgG1	22B5 IgG1 DLE	22B5 IgG2	22B5 IgG4
IC_{50} (nM)	NA	0.43	1.01	0.37	0.57

Figure 6

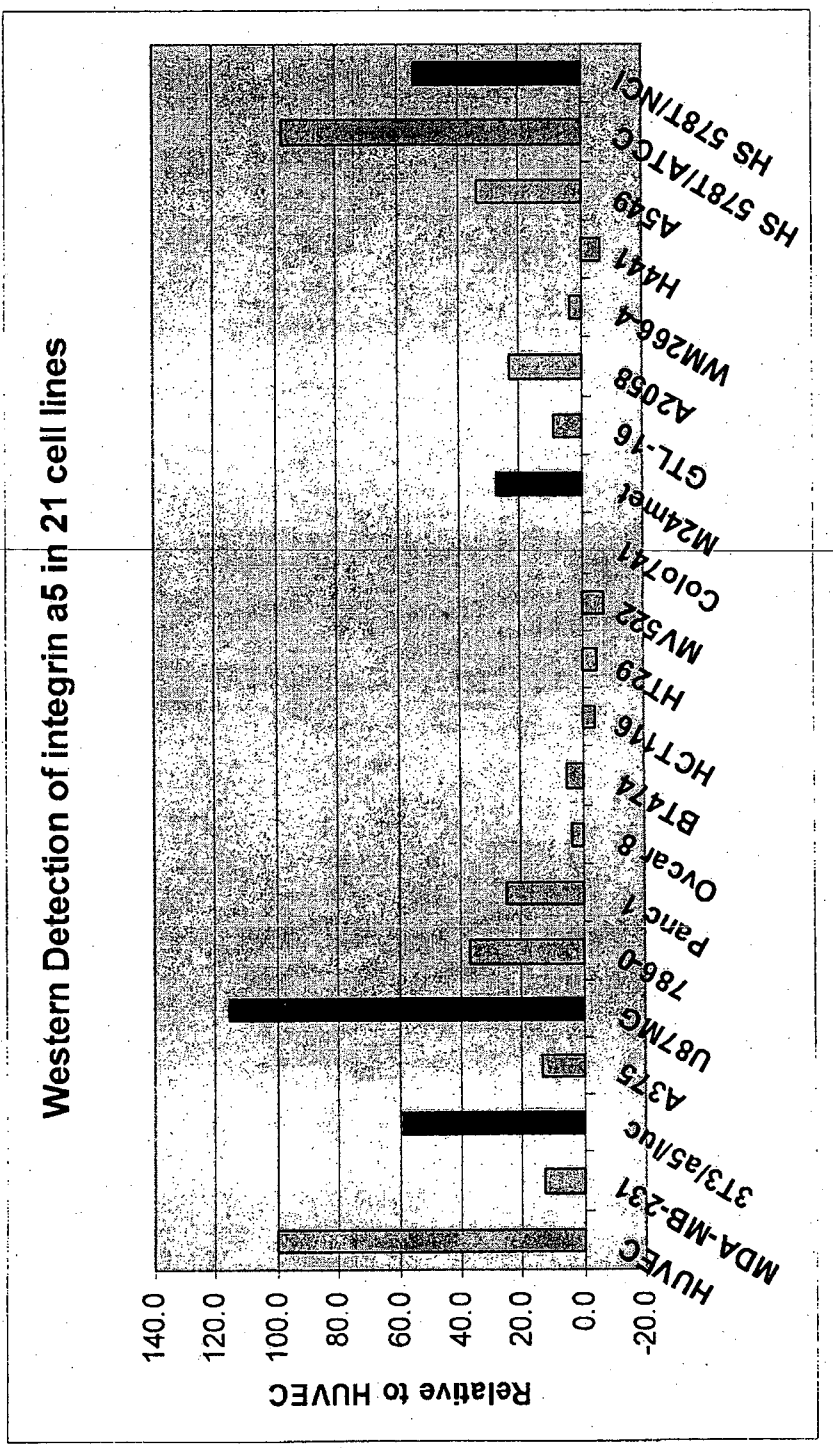
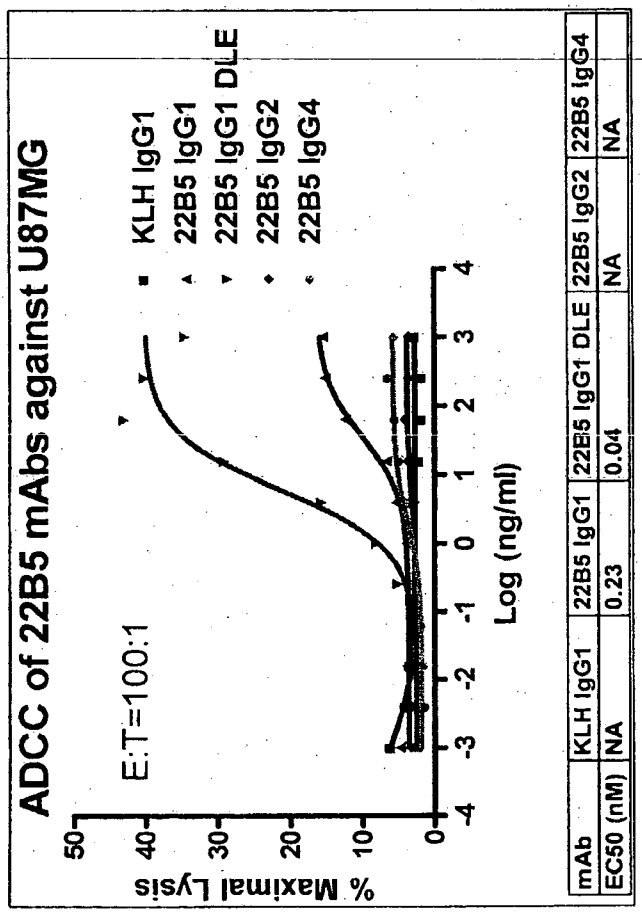

Western Detection of integrin a5 in 21 cell lines
Relative to HUVEC
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-20.0
HUVEC
MDA-MB-231
3T3/a5/luc
A375
U87MG
786-0
Panc 1
OvCar 8
BT474
HCT116
HT29
MV522
Colo741
M24met
GTL-16
A2058
WM266-4
H441
A549
HS 578T/ATGC
HS 578T/NCI

Figure 7



mAb	KLH IgG1	22B5 IgG1	22B5 IgG1 DLE	22B5 IgG2	22B5 IgG4
EC50 (nM)	NA	0.23	0.04	NA	NA

Figure 8A

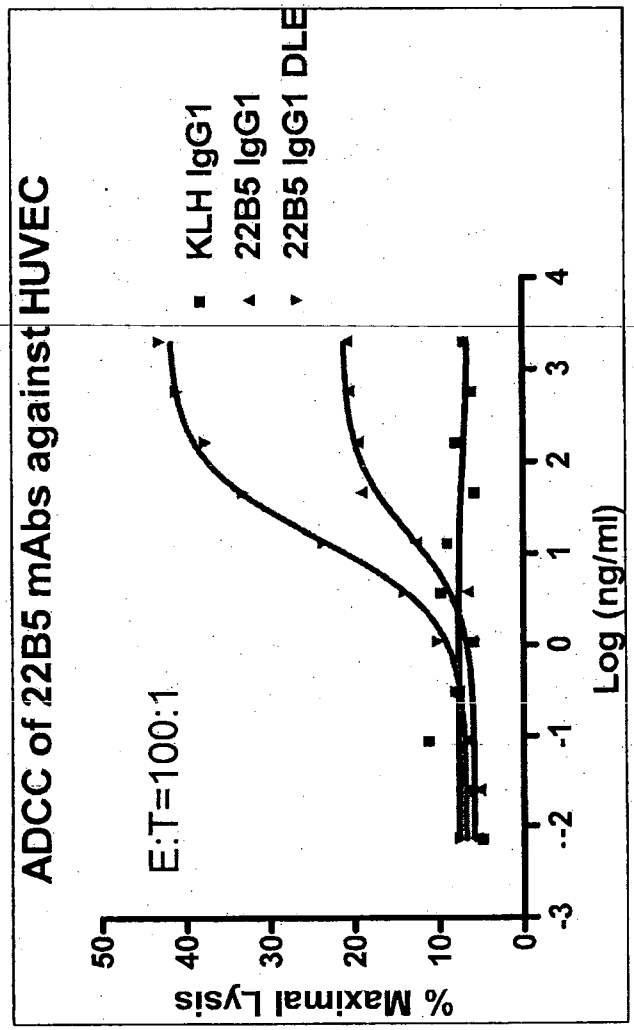

ADCC of 22B5 mAbs against HUVEC
E:T=100:1
KLH IgG1
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
0
10
20
30
40
50
-3
-2
-1
0
1
2
3
4
Log (ng/ml)

Figure 8B

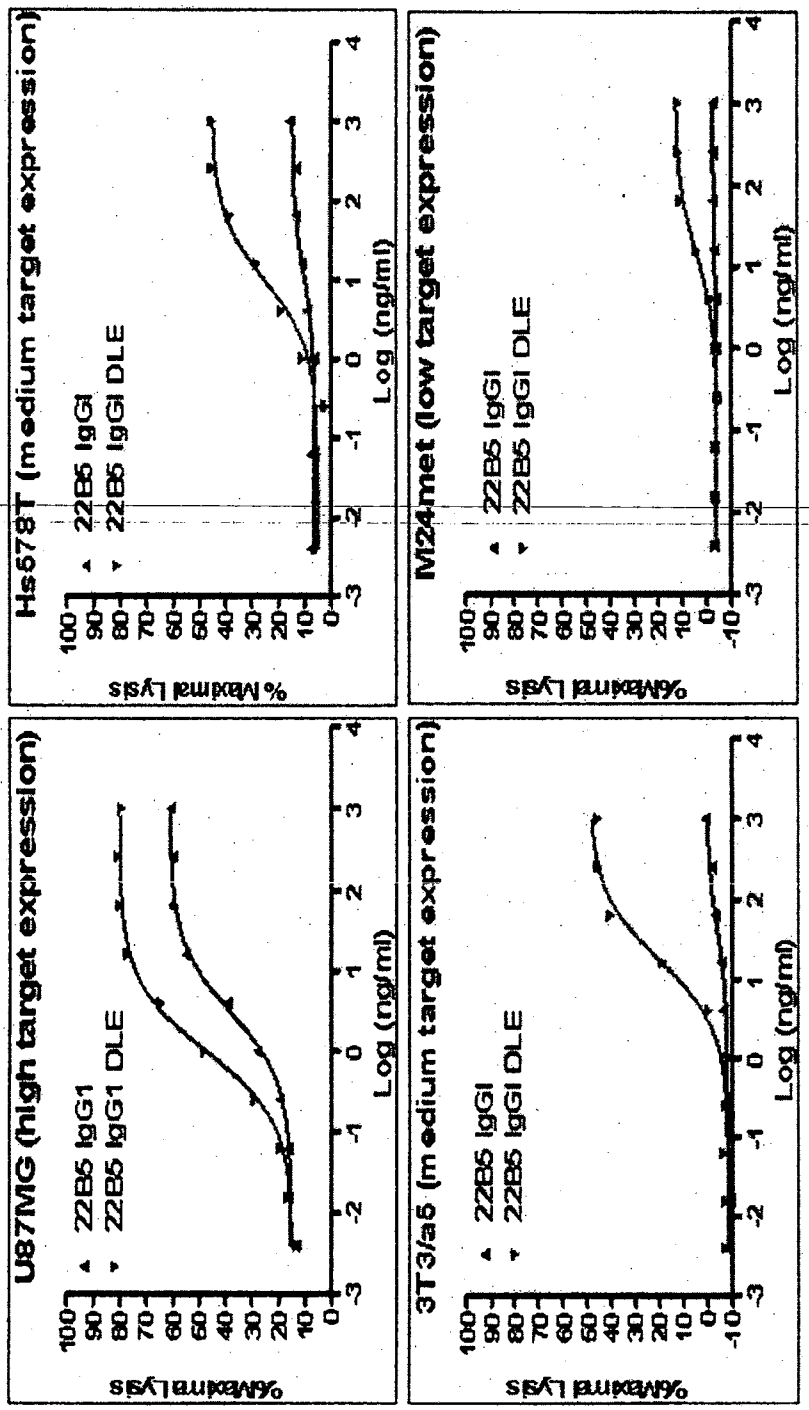

U87MG (high target expression)
Hs578T (medium target expression)
3T3/a5 (medium target expression)
M24met (low target expression)
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
22B5 IgGI
22B5 IgGI DLE
%Maximal Lysis
Log (ng/ml)

Figure 9

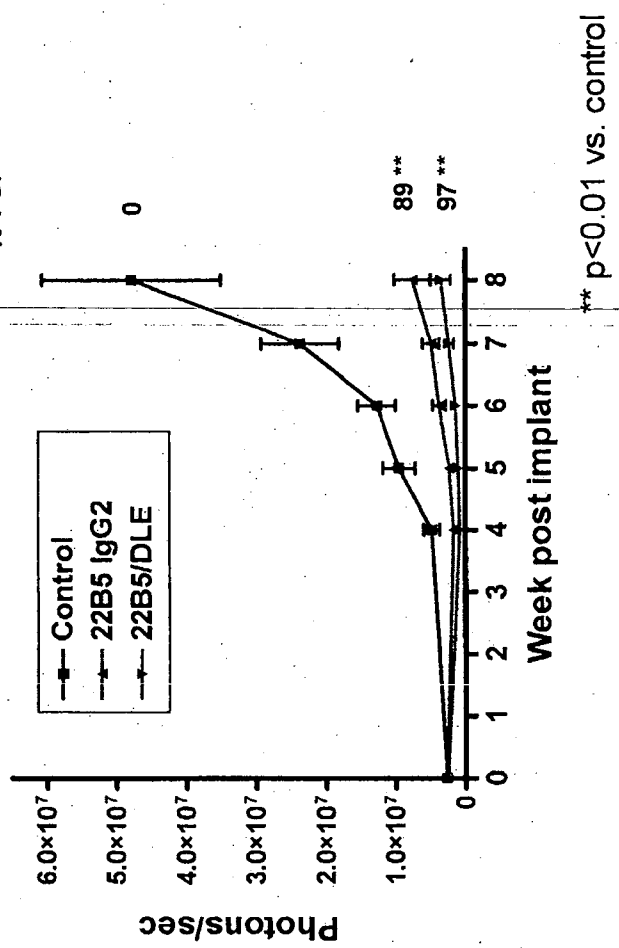

A
Photons/sec
6.0×10^7
5.0×10^7
4.0×10^7
3.0×10^7
2.0×10^7
1.0×10^7
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Week post implant
Control
22B5 IgG2
22B5/DLE
% TGI
0
89 **
97 **
** p<0.01 vs. control

Figure 10A

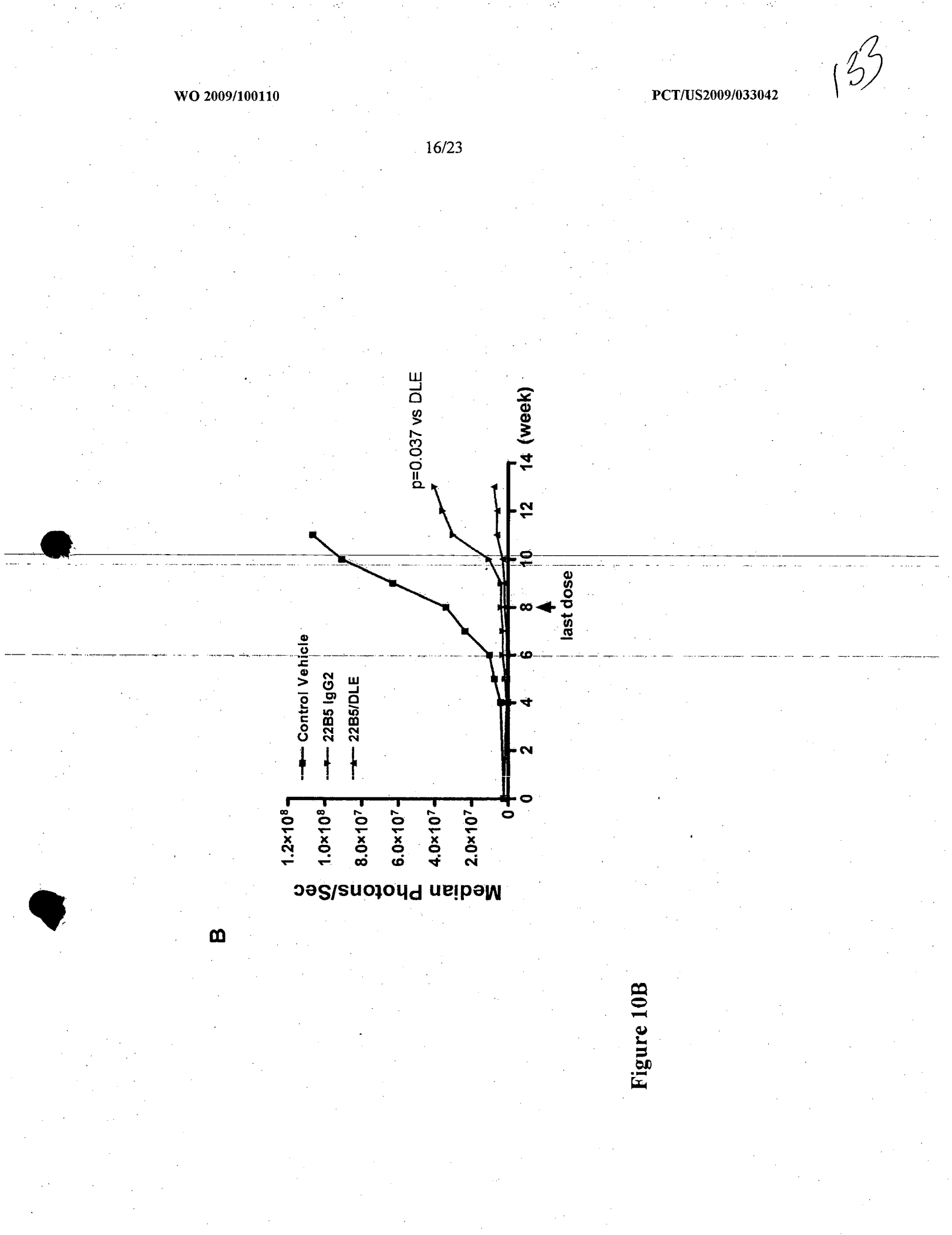
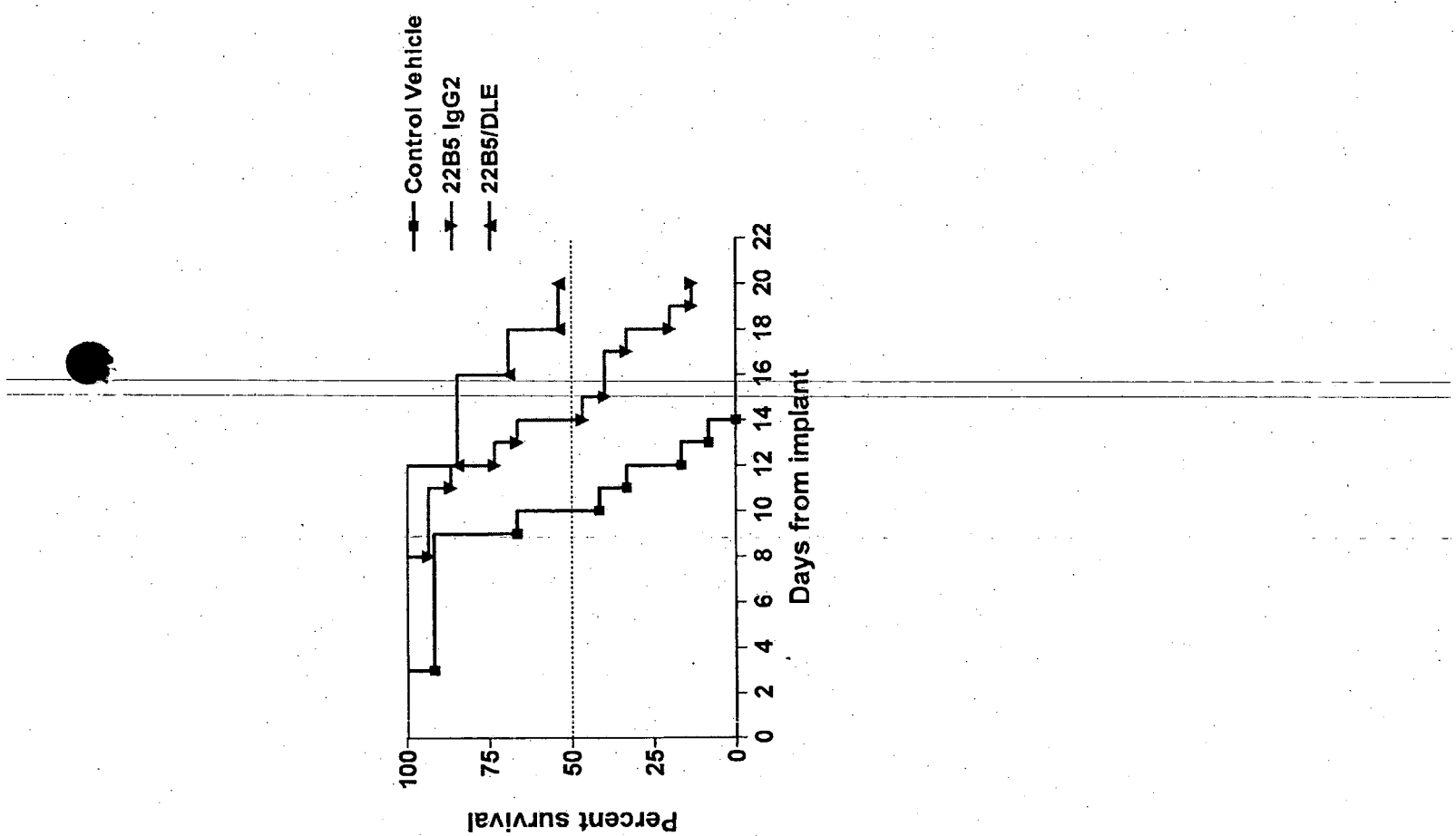
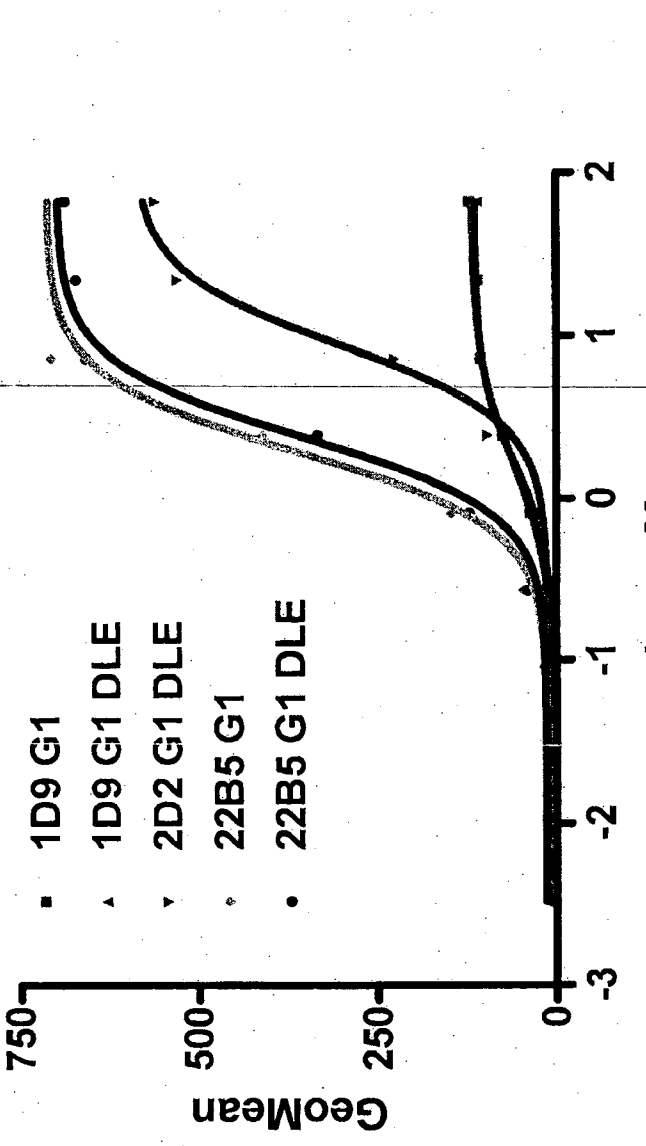

B
Median Photons/Sec
1.2×10^8
1.0×10^8
8.0×10^7
6.0×10^7
4.0×10^7
2.0×10^7
0
Control Vehicle
22B5 IgG2
22B5/DLE
p=0.037 vs DLE
last dose
0
2
4
6
8
10
12
14 (week)

Figure 10B


Control Vehicle
22B5 IgG2
22B5/DLE
Percent survival
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
Days from implant

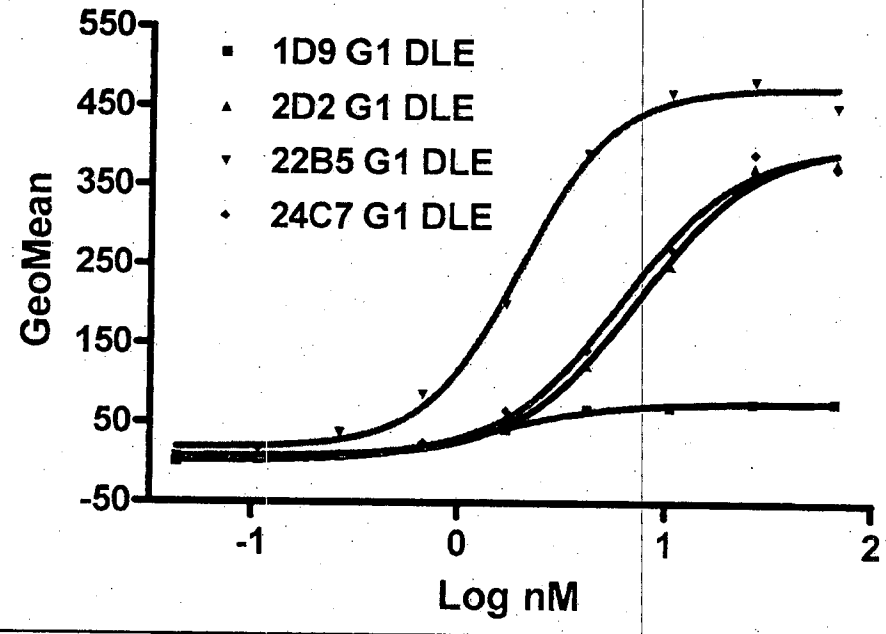
C

Figure 10C



mAb	1D9 G1	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1	22B5 G1 DLE
Kd (nM)	1.69	1.68	8.78	1.95	2.42
R^2	1.00	1.00	0.99	0.99	1.00

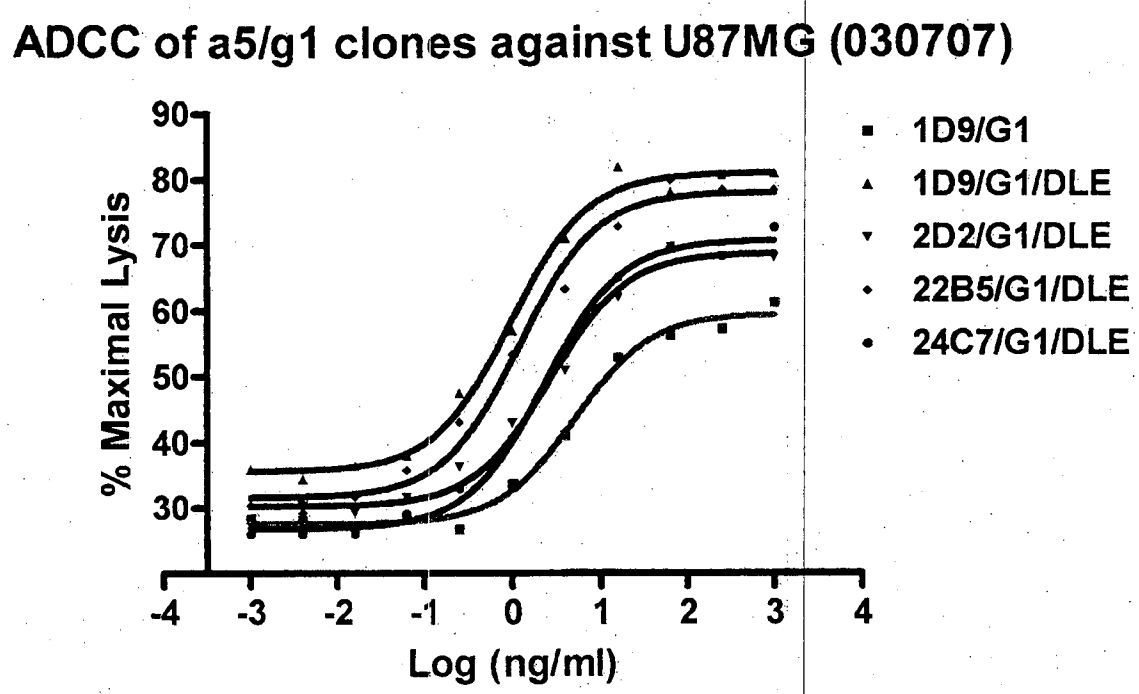
Figure 11A



mAb	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1 DLE	24C7 G1 DLE
Kd (nM)	1.49	7.32	1.99	6.08
R^2	1.00	1.00	1.00	0.99

Note: 24C7 unpurified

Figure 11B



mAb	1D9/G1	1D9/G1/DLE	2D2/G1/DLE	22B5/G1/DLE	24C7/G1/DLE
EC50 (ng/ml)	5.06	0.96	2.66	1.21	2.28
R^2	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00

note: 24C7 unpurified

Figure 12

137

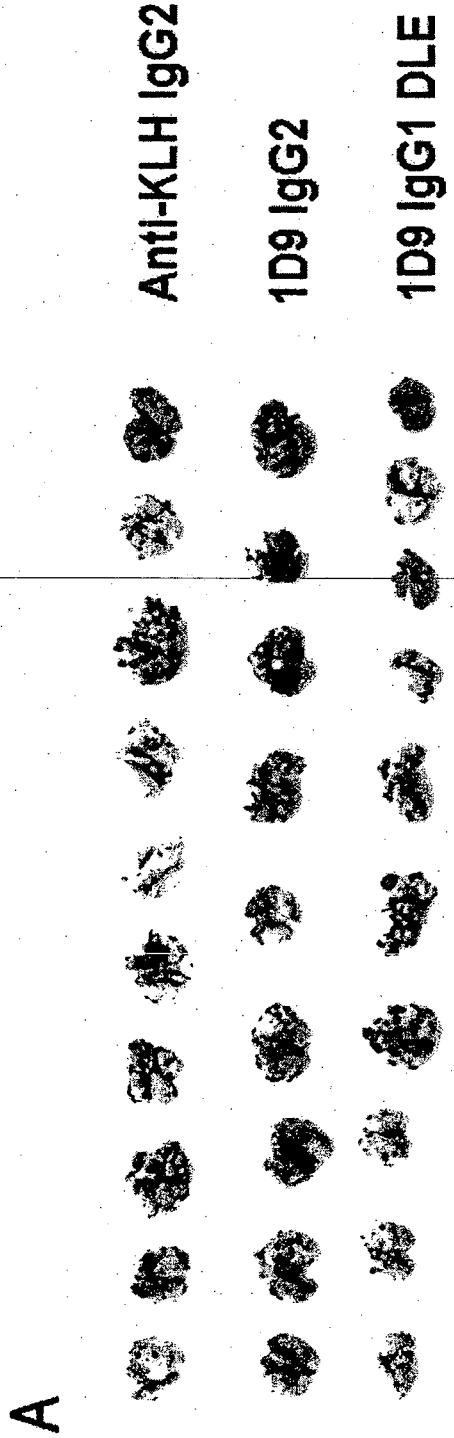


Figure 13 A

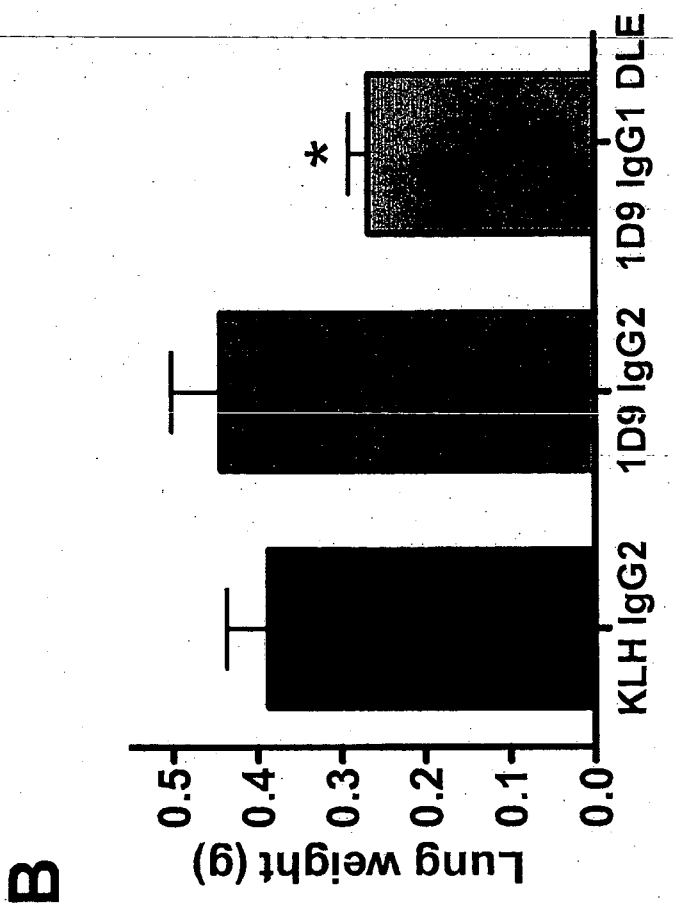


Figure 13 B


C
Number of lung metastases
35
30
25
20
15
10
5
0
*
KLH IgG2
1D9 IgG2
1D9 IgG1 DLI

Figure 13 C

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc and Medarex, Inc.

<120> Alpha-5 Beta-1 Antibodies and Their Uses

<130> PC33646

<140> PCT/US2009/033042
<141> 2009/02/04

<150> US 61/095,429
<151> 2008/09/09

<150> US 61/026,027
<151> 2008/02/05

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly
1 5
11:13 06/05/2009

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu Asp
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 455
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagct actggggctg gatccgccag 120

cccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctact atagtgggag aaactacaac 180

aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240

ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacattac 300

tatggttcgg ggagttccta ctactactac gatctggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
caggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcaa taaaaactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatgt attactgtgc gagagaatac 300

tggggaacct actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 22
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc aactacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt acctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagtcc 300

ccccccatct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 32
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 38
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 39
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
caggtgcaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcac taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gagagaatac 300

tggggaacct actactacgg gacggacgtc tggggccaag ggaccacggt catcgtctcc 360

tca 363

<210> 42
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 43
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

157

P2010/112

ANTICUERPOS ALFA 5-BETA1 Y SUS USOS

Esta solicitud reivindica prioridad sobre la Solicitud Provisional estadounidense No. 61/026.027 presentada el 5 de febrero de 2008, y a la Solicitud Provisional estadounidense No. 61/095.429 presentada el 9 de septiembre de 2008, ambas incorporadas en la presente como referencia en su totalidad.

Campo

La presente divulgación se relaciona con anticuerpos y porciones fijadoras de antígenos de los mismos que se fijan a α5β1. La divulgación también se relaciona con moléculas de ácido nucleico que codifican tales anticuerpos y porciones fijadoras de antígenos, métodos para preparar anticuerpos α5β1 y porciones fijadoras de antígenos, composiciones que comprenden estos anticuerpos y porciones fijadoras de antígenos y métodos para utilizar los anticuerpos, porciones fijadoras de antígenos, y composiciones.

Fundamento

La integrina α5β1 es una proteína de superficie celular heterodimérica que se une a la fibronectina y está involucrada en la unión celular y la angiogénesis. Este heterodímero está compuesto de una subunidad α5 y una subunidad β1. La integrina α5β1 es conocida como el "receptor de fibronectina clásico" que juega roles claves en adhesión, migración, proliferación, diferenciación, y supervivencia de matrices. Aunque varias integrinas se unen a la fibronectina (FN), α5β1 es selectiva para FN puesto que requiere ambas secuencias péptidas sobre la novena (PHSRN) y décima (RGDS) repeticiones tipo III de FN para reconocimiento de ligandos y una interacción óptima. (Danen . *J. Biol. Chem.* 270(37):2161221618 (1995); Redick . *J. Cell Biol.* 149(2):521-527 (2000); Takagi . *EMBOJ.* 22:4607-4615 (2003)).La adhesión celular a FN mediada por integrina puede disparar flujos de calcio, activar tirosina y serina/treonina proteinquinasas y el metabolismo de lípidos de inositol, y regular la actividad de la familia Rho de GTPasas pequeñas que controlan el citoesqueleto de actina y la progresión del ciclo celular.

La expresión de α5β1 se observa en la mayoría de tejidos embriónicos, pero el nivel disminuye después del nacimiento de manera consistente con la diferenciación celular terminal (Muschler & Horwitz *Development* 113(l):327-337 (1991)). En ratones adultos tipo silvestre, la expresión principalmente se presenta en la vasculatura y tejido conectivo, aunque los niveles bajos del receptor están ampliamente distribuidos. La expresión tanto de α5β1 como de FN está

significativamente y coordinadamente aumentada en vasos sanguíneos de tumores humanos y en tejidos estimulados por el factor de crecimiento y la citoquina. Las citoquinas angiogénicas tales como bFGF, VEGF, IL-8, TGF-beta, y TNF- a regulan de manera positiva la expresión α5β1 sobre células endoteliales in-vitro e in-vivo, mientras estas moléculas están expresadas de manera mínima sobre vasos y tejidos humanos normales (Kim *Am. J. Path.* 156(4): 1345-62 (2000); Enaida . *Fukushima J. Med. Sci.* 44(l):43-52 (1998); Klein . *Mol. Biol. Cell* 4(10):973-982 (1993)).

Los altos niveles de expresión α5β1 no están limitados a la vasculatura, puesto que las células tumorales también se observan con frecuencia expresando α5β1 en muchos tipos de cáncer. La hipoxia tumoral se ha asociado con expresión α5β1 tumoral aumentada (Mousa *J. Cell. Biochem.* 74:135-143 (1999)). Las integrinas se consideran importantes en la intravasación tumoral en capilaridades recién formadas y extravasación a sitios distantes, conduciendo a la diseminación tumoral y la enfermedad metastática. Sin embargo, el modelo de expresión de α5β1 es consistente con múltiples roles en la promoción del cáncer, mediante la mediación de actividades celulares tanto estromales como tumorales. Varios estudios clínicos han asociado la regulación positiva de α5β1 sobre células tumorales con progresión de melanoma humano, carcinoma de células escamosas y leucemias de células B (Jin & Varner, Br. J.Cancer 90:561-565(2004); *Histopathology* 24(3):249-256 (1994); Shinohara ., *Am. J. Clin. Pathol.* lll(l):75-88 (1999)).

Resumen

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados, en particular anticuerpos monoclonales humanos, que exhiben unión de alta afinidad a la integrina humana α5β1. Los anticuerpos descritos en la presente divulgación son anticuerpos típicamente humanos, aunque en casos alternativos los anticuerpos pueden ser anticuerpos murinos, anticuerpos quiméricos, o anticuerpos humanizados. En un aspecto, la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, en donde el anticuerpo: (a) se une a la integrina humana α5β1 con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos; y (b) es capaz de inducir una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Por ejemplo, en un caso, el anticuerpo pertenece a una subclase que es capaz de inducir ADCC, tal como IgGl o IgG3. En otro caso, la actividad

ADCC es el resultado de introducir modificaciones de carbohidratos, tales como modelos de glicosilación alterados, en la región Fc en comparación con el modelo de carbohidratos nativos.

En ciertos casos, el anticuerpo se une a la integrina humana α5β1 con una K_D de 5 x 10^{-8} M o menos, 2 x 10^{-8} M o menos, 1 x 10^{-8} M o menos, 5x10^{-9} M o menos, 4x10^{-9} M o menos, 3x10^{-9} M o menos, ó 2.7 x 10^{-9} M o menos.

En un aspecto adicional , la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, en donde el anticuerpo: (a) se une a la integrina humana α5β1 con una K_D de 1x10^{-7} M o menos; y (b) demuestra actividad ADCC aumentada relativa a un anticuerpo comparable. Por ejemplo, en un caso, el anticuerpo con actividad ADCC aumentada comprende al menos una mutación en la región Fc en comparación con la región Fc tipo silvestre, y la actividad ADCC aumentada es relativa al mismo anticuerpo, pero comprendiendo la región Fc tipo silvestre. En ciertos ejemplos, el anticuerpo se une a la integrina humana α5β1 con una K_D de 5 x 10^{-8} M o menos, 2 x 10^{-8} M o menos, 1 x 10^{-8} M o menos, 5x10-^{9} M o menos, 4x10-^{9} M o menos, 3x10^{-9} M o menos, o 2.7 x 10-^{9} M o menos. En ejemplos adicionales, el anticuerpo demuestra actividad ADCC aumentada relativa a un anticuerpo comparable que es al menos 1.1 veces, al menos 1.2 veces, al menos 1.3 veces, al menos 1.5 veces, al menos 2-veces, al menos 3-veces, al menos 5-veces, al menos 10-veces, al menos 20-veces, al menos 30-veces, al menos 40-veces, al menos 50-veces, al menos 100-veces, al menos 200-veces, al menos 500-veces, o al menos 1000-veces en comparación con un anticuerpo comparable, en donde el anticuerpo comparable es el mismo anticuerpo, pero con la región Fc tipo silvestre.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, en donde el anticuerpo: (a) se une a una integrina humana α5β1 con una K_D de 1x10^{-7} M o menos; y (b) comprende al menos una mutación en la región Fc en comparación con la región Fc tipo silvestre. Por ejemplo, en un caso, la subclase del anticuerpo es IgGl y al menos un aminoácido en la región Fc de la subclase IgG1 es mutado. En un ejemplo adicional, la al menos una mutación ocurre en la posición serina 247, alanina 338, o isoleucina 340 en la región Fc de la subclase IgG1. En un ejemplo adicional, la al menos una mutación es seleccionada del grupo que consta de S247D, A338L, y I340E. En aún un ejemplo adicional, el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L, y I340E.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, en donde el anticuerpo compite de manera cruzada o compite por unirse a integrina humana α5β1 con un anticuerpo que comprende: (a) una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 7, o modificaciones conservadoras de la misma; y (b) una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 8, o modificaciones conservadoras de la misma.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada que es el producto de o se deriva desde un gen VH 4-39 humano, en donde el anticuerpo específicamente se une a integrina humana α5β1.

Un aspecto adicional de la presente divulgación es un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena liviana que es el producto de o se deriva desde un gen VK L6 humano, en donde el anticuerpo específicamente se une a integrina humana α5β1.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 1, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 2, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos de la misma comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 3, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 4, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 5, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo

SEQ ID NO: 6, o modificaciones conservadoras del mismo. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 1, o modificaciones conservadoras de la misma;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 2, o modificaciones conservadoras de la misma;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 3, o modificaciones conservadoras de la misma;

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 4, o modificaciones conservadoras de la misma;

(e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 5, o modificaciones conservadoras de la misma; y

(f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 6, o modificaciones conservadoras de la misma.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 7, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO:7. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 8, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO:8. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de

SEQ ID NO: 7, o modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 8, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO: 7, y una región variable de cadena liviana que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO: 8.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 13, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 14, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 15, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 16, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 17, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 18, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 13, o modificaciones conservadoras de la misma;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 14, o modificaciones conservadoras de la misma;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 15, o modificaciones conservadoras de la misma;

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 16, o modificaciones conservadoras de la misma;

(e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 17, o modificaciones conservadoras de la misma; y

(f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 18, o modificaciones conservadoras de la misma.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 19, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 20, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 19, o modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 20, o modificaciones conservadoras de la misma.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 23, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 24, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 25, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo

monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 26, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 27, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 28, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 23, o modificaciones conservadoras de la misma;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 24, o modificaciones conservadoras de la misma;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 25, o modificaciones conservadoras de la misma;

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 26, o modificaciones conservadoras de la misma;

(e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 27, o modificaciones conservadoras de la misma; y

(f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 28, o modificaciones conservadoras de la misma.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 29, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 30, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 29, o

modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 30, o modificaciones conservadoras de la misma.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 33, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 34, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 35, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 36, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 37, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 38, o modificaciones conservadoras de la misma. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 33, o modificaciones conservadoras de la misma;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 34, o modificaciones conservadoras de la misma;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 35, o modificaciones conservadoras de la misma;

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo SEQ ID NO: 36, o modificaciones conservadoras de la misma;

(e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo SEQ ID NO: 37, o modificaciones conservadoras de la misma; y
(f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo SEQ ID NO: 38, o modificaciones conservadoras de la misma.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 39, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 40, o modificaciones conservadoras de la misma. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 39, o modificaciones conservadoras de la misma, y una región variable de cadena liviana comprendiendo la secuencia aminoácida de SE2Q ID NO: 40, o modificaciones conservadoras de la misma.

En un aspecto adicional se proporciona un anticuerpo aislado o porción fijadora de antígenos del mismo que se une al mismo epítopo sobre integrina humana $\alpha 5\beta 1$ como cualquiera de los anticuerpos divulgados en la presente y/o compite por unirse a integrina humana $\alpha 5\beta 1$ con tal anticuerpo.

En una realización, la divulgación proporciona el material depositado en el ATCC como Deposito No. PTA-9377. En otra realización, la divulgación proporciona el material depositado en el ATCC como Deposito No. PTA-9378. En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende la región variable de cadena pesada como se depositó en el ATCC como Depósito No. PTA-9377. En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende la región variable de cadena liviana como se depositó en el ATCC como Depósito No. PTA-9378. En otra realización, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado comprendiendo la región variable de cadena pesada como se depositó en el ATCC como Depósito No. PTA-9377, pero en donde las mutaciones de línea germinal I3OS y N33S han sido hechas en la región VH. En una realización adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones variables de cadena pesada y cadena liviana

como se depositó en el ATCC como Depósitos No. PTA-9377 y PTA-9378, respectivamente, o dicho anticuerpo en donde las mutaciones de línea germinal I30S y N33S han sido hechas en la región VH. En una realización adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada como se depositó en el ATCC como Deposito No. PTA-9377, o comprende dichas CDR1, CDR2, y CDR3 cuando dicha región variable de cadena pesada contiene las mutaciones de línea germinal I30S y N33S. En una realización adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena liviana de la región variable de cadena liviana como se depositó en el ATCC como Depósito No. PTA-9378. En una realización adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo aislado que comprende las regiones CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena liviana y las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2, y CDR3 de las regiones variables de cadena pesada y liviana como se depositó en el ATCC como Depósitos No. PTA-9377 y PTA-9378, respectivamente, o comprende dichas regiones CDR1, CDR2, y CDR3 cuando dicha región variable de cadena pesada contiene las mutaciones de línea germinal I30S y N33S.

Los anticuerpos de la divulgación pueden ser, por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, por ejemplo de una subclase IgGl o IgG4. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab o Fab'2, o anticuerpos de cadena simple. En un caso, la presente divulgación proporciona cualquiera de los anticuerpos como se describió anteriormente, el cual es un anticuerpo humano de longitud completa de la subclase IgGl, en donde al menos un aminoácido en la región Fc de la subclase IgG1 es mutado. En un caso adicional, la al menos una mutación ocurre en la posición serina 247, alanina 338, o isoleucina 340. En un caso adicional, la al menos una mutación es seleccionada del grupo que consta de S247D, A338L, y I340E. En aún un caso adicional, el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L, y I340E.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado comprendiendo una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 9, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena pesada que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO:9. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado comprendiendo una

cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 10, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena liviana que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO: 10. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado comprendiendo una cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 9, o modificaciones conservadoras de la misma, y una cadena liviana como se muestra en SEQ ID NO: 10, o modificaciones conservadoras de la misma. Por ejemplo, el anticuerpo comprende una cadena pesada que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO:9, y una cadena liviana que es al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO: 10.

En algunas realizaciones, la lisina de terminal C de la cadena pesada de cualquiera de los anticuerpos anti-α5β1 de la divulgación como se describió está cortada, por lo tanto no está presente. Por ejemplo, en algunas realizaciones anticuerpos de la presente divulgación comprenden la región pesada constante IgGI como se muestra en SEQ ID NO: 43, pero donde la lisina de terminal C no está presente. En varios casos, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-α5β1 pueden opcionalmente incluir una secuencia señal.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona una composición comprendiendo cualquiera de los anticuerpos, o una porción fijadora de antígenos de la misma, como se describió en la presente, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un inmunoconjugado comprendiendo cualquiera de los anticuerpos, o porción fijadora de antígenos del mismo, como se describió en la presente, enlazado a un agente terapéutico. En un caso, el agente terapéutico es una citotoxina o un isótopo radioactivo. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona una composición comprendiendo cualquiera de los inmunoconjugados descritos en la presente y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La divulgación también proporciona una molécula biespecífica comprendiendo un anticuerpo, o porción fijadora de antígenos del mismo, enlazada a una segunda fracción funcional con una especificidad de unión diferente a aquella de dicho anticuerpo, o porción fijadora de antígenos del mismo.

También se proporcionan composiciones que comprenden un anticuerpo, o porción fijadora de antígenos del mismo, o inmunoconjugado o molécula biespecífica de la divulgación y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos, o porciones fijadoras de antígenos de los mismos, también son contempladas por la divulgación, así como también los vectores de expresión comprendiendo tales ácidos nucleicos y células hospederas comprendiendo tales vectores de expresión. Un aspecto, por ejemplo, es una molécula aislada de ácido nucleico, o un vector de expresión, comprendiendo la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 11, o modificaciones conservadoras de la misma. Un aspecto adicional es una molécula aislada de ácido nucleico, o un vector de expresión, comprendiendo la secuencia como se muestra en SEQ ID NO: 12, o modificaciones conservadoras de la misma. Un aspecto adicional es una molécula aislada de ácido nucleico, o un vector de expresión, comprendiendo la secuencia seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 21, 22, 31, 32, 41, y 42, o modificaciones conservadoras de la misma. La divulgación también proporciona un ratón transgénico comprendiendo transgenes de inmunoglobulina humana de cadena pesada o liviana, en donde el ratón expresa un anticuerpo de la divulgación, así como también hibridomas preparados a partir de tal ratón, en donde el hibridoma produce el anticuerpo de la divulgación.

La divulgación proporciona además una célula hospedera comprendiendo cualquiera de los vectores de expresión descritos en la presente.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-integrina α5β1 el cual comprende expresar el anticuerpo en cualquiera de las células hospederas descritas en la presente y aislar el anticuerpo a partir de la célula hospedera.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método para inhibir el crecimiento de células tumorales expresando integrina α5β1, comprendiendo colocar en contacto las células con un anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo que se una a integrina humana α5β1 con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos y sea capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano. En un caso adicional, el anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo es modificado para aumentar su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. En aún un caso adicional, el aumento se logra mediante mutación de al menos un residuo aminoácido en la región Fc.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un método de inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan integrina α5β1, comprendiendo colocar en contacto las células con cualquiera de los anticuerpos, o porción fijadora de antígenos del mismo, como se describió en la presente, en una cantidad efectiva para inhibir crecimiento de las células tumorales.

En un aspecto adicional, la divulgación proporciona el uso de cualquiera de los anticuerpos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos, como se describió en la presente, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de crecimiento celular anormal. En aún un aspecto adicional, la divulgación proporciona cualquiera de los anticuerpos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos, como se describió en la presente, para utilizar en el tratamiento y/o diagnosis de crecimiento celular anormal. En una realización de este método, el crecimiento celular anormal es cáncer, incluyendo, pero sin limitar a, mesotelioma hepatobiliar (conducto hepático y biliar), un tumor primario o secundario del SNC (sistema nervioso central), un tumor cerebral primario o secundario, cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estomago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de la cerviz, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido suave, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer de riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkins, tumores de la columna vertebral, glioma del tallo cerebral, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los anteriores cánceres.

La divulgación también proporciona métodos para preparar anticuerpos anti-α5β1 de "segunda generación" con base en las secuencias de los anticuerpos anti- α5β1 proporcionados en la presente. Por ejemplo, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-α5β1 comprendiendo: (a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpo de región variable de

cadena pesada comprendiendo una secuencia CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 1,13, 23, o 33, una secuencia CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 2, 14, 24, o 34 y/o una Secuencia CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 3, 15, 25, o 35; y/o (ii) una secuencia de anticuerpo de región variable de cadena liviana comprendiendo una secuencia CDR1 como se muestra en SEQ ID NO: 4, 16, 26, o 36, una secuencia CDR2 como se muestra en SEQ ID NO: 5, 17, 27, o 37 y/o una secuencia CDR3 como se muestra en SEQ ID NO: 6, 18, 28, o 38; (b) alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpo de región variable de cadena liviana para crear al menos una secuencia de anticuerpo alterada; y (c) expresar la secuencia de anticuerpo alterada como una proteína.

Otras características y ventajas de la presente divulgación serán manifiestas a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos lo cual no se debe considerar como limitante. El contenido de todas las referencias, entradas del Genbank, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas en esta especificación están incorporadas expresamente en la presente como referencia.

Breve Descripción de las Ilustraciones

La Figura 1A muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada 22B5 (SEQ ID NO: 11); la Figura 1B muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena pesada 22B5 (SEQ ID NO:7) – las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1C muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena liviana 22B5 (SEQ ID NO: 12); la Figura 1D muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena liviana 22B5 (SEQ ID NO: 8) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1E muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada 24C7 (SEQ ID NO:21); la Figura 1F muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena pesada 24C7 (SEQ ID NO: 19) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1G muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena liviana 24C7 (SEQ ID NO:22); la Figura 1H muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena liviana 24C7 (SEQ ID NO:20) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1I muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada 1D9 (SEQ ID NO:31); la Figura 1J muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena pesada 1D9 (SEQ ID NO:29) - las regiones CDR están subrayadas. La Figura 1K muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena liviana 1D9 (SEQ ID NO:32); Figura 1L muestra la secuencia aminoácida de

la región variable de cadena liviana 1D9 (SEQ ID NO:30) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1M muestra la Secuencia de ADN de la región variable de cadena pesada 2D2 (SEQ ID NO:41); la Figura 1N muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena pesada 2D2 (SEQ ID NO:39) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1O muestra la secuencia de ADN de la región variable de cadena liviana 2D2 (SEQ ID NO:42); La Figura 1P muestra la secuencia aminoácida de la región variable de cadena liviana 2D2 (SEQ ID NO:40) - las regiones CDR están subrayadas; la Figura 1Q muestra la secuencia aminoácida de la región constante de cadena pesada IgGl con mutaciones S247D, A338L, y I340E subrayadas; y la Figura 1R muestra la secuencia aminoácida de la región constante de cadena liviana IgGl.

La Figura 2 muestra la alineación del dominio variable de cadena pesada 22B5 (V_H) con la correspondiente secuencia de línea germinal. También se muestra la alineación del dominio variable de cadena liviana variable 22B5 (V_K) con la correspondiente secuencia de línea germinal. Las regiones CDR están subrayadas, los residuos idénticos están representados por guiones y los puntos indican supresiones.

La Figura 3 muestra una superposición de los sensorgramos obtenidos al inyectar varias concentraciones de dominio extracelular recombinante $\alpha5\beta1$ sobre 22B5/DLE inmovilizado. Estos datos se recolectaron en la presencia de 4.0 mM $CaCl_2$. El orden de las inyecciones fue de concentración baja a alta.

La Figura 4 muestra la unión dependiente de dosis de 22B5/DLE a HUVEC mediante FACS.

La Figura 5 muestra constantes de disociación de equilibrio comparando receptores Fcγ humanos y murinos; "DLE" se refiere a 22B5/DLE.

La Figura 6 muestra los resultados de un ensayo de bloqueo de adherencia celular en células HUVEC. Los resultados indican el nivel de inhibición de adherencia HUVEC a fibronectina para 22B5 y varias variantes de subclase así como también el control negativo (BHA2 IgG1). También se muestran los valores IC_{50} calculados.

La Figura 7 muestra expresión α5 humana a partir de células HUVEC y 20 líneas celulares tumorales medidas por Western Blotting.

La Figura 8 muestra ADCC in vitro inducida por 22B5/DLE comparada con 22B5 IgG1 tipo silvestre. La Figura 8A muestra un ensayo de detección basado en LDH que mide ADCC de células U87MG en presencia de PBMCs humano por 22B5/DLE y 22B5 IgG1 tipo silvestre. La

Figura 8B muestra un ensayo de detección basado en ToxiLight que mide ADCC de HUVECs en la presencia de PBMCs humanos por 22B5/DLE y 22B5 IgG1 tipo silvestre.

La Figura 9 muestra ensayos de detección basados en LDH que indican aumento sustancial de ADCC a partir de 22B5/DLE sobre 22B5 IgG1 tipo silvestre a través de un amplio rango de niveles de expresión de antígenos.

La Figura 10 muestra la actividad de inhibición de 22B5/DLE en el modelo de metástasis experimental A549-Luc. Figura 10A: Volumen de metástasis pulmonar medido por BLI la semana 8 (n=11 para el grupo de control, n=14 para el grupo 22B5 IgG2 y n=12 para el grupo 22B5/DLE). La Figura 10B: Recrecimiento de tumores pulmonares en el grupo 22B5 IgG2 tratado después de detener dosificación. Por comparación, el grupo 22B5/DLE tratado mostró poco recrecimiento. Figura 10C: Diagrama Kaplan-Meier de tasa de supervivencia animal de cada grupo de tratamiento (punto final= BLI 1x10 fotones/segundo), $p< 0.0001$ para grupo de vehículo de control comparando con todos los demás grupos, y $p<0.05$ para comparación entre grupos 22B5/DLE y 22B5 IgG2.

La Figura 11 muestra unión dependiente de dosis de 1D9, 1D9/DLE, 24C7/DLE, 2D2/DLE, 22B5, y 22B5/DLE a HUVEC mediante FACS.

La Figura 12 muestra ADCC in vitro inducida por 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE, y 24C7/DLE.

La Figura 13 muestra eficacia anti-tumoral dependiente de ADCC de 1D9/DLE en un modelo singeneico de melanoma metastático. La Figura 13 A: Apariencia macroscópica de pulmones sometidos a resección de todos los grupos. Figura 13B: Valoración cuantitativa de las cantidades de peso pulmonar (* $p<0.05$, 1D9 IgG1 DLE vs 1D9 IgG2). Figura 13C: Valoración cuantitativa de las cantidades de los números de colonias metastásicas visibles sobre la superficie pulmonar. Análisis estadístico por ANOVA y prueba de comparación múltiple de Bonferroni (* $p<0.05$, 1D9 IgG1 DLE vs 1D9 IgG2; * $p<0.05$, 1D9 IgGl DLE vs anti-KLH IgG2).

Descripción Detallada

La presente divulgación se relaciona con anticuerpos monoclonales aislados, particularmente anticuerpos monoclonales humanos, que se fijan específicamente a $\alpha 5\beta 1$ con una alta afinidad. En ciertos casos, los anticuerpos de la divulgación se derivan a partir de secuencias particulares de líneas germinales de cadenas pesadas y livianas y/o comprenden características

estructurales particulares tales como regiones CDR que comprenden secuencias aminoácidas en particular. La divulgación proporciona anticuerpos aislados, métodos para preparar tales anticuerpos, inmunoconjugados y moléculas biespecíficas que comprenden tales anticuerpos y composiciones farmacéuticas que contienen los anticuerpos, inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la divulgación. La divulgación también se relaciona con métodos de utilización de los anticuerpos, tales como para detectar α5β1, así como también para tratar enfermedades asociadas con la expresión de α5β1, tal como el crecimiento celular anormal (ej., cáncer). Por consiguiente, la divulgación también proporciona métodos de utilización de los anticuerpos anti-α5β1 o porciones fijadoras de antígenos de los mismos para tratar varios tipos de crecimiento celular anormal, tales como el cáncer.

Con el objeto que la presente divulgación pueda ser entendida de manera más fácil, primero se definen ciertos términos. Definiciones adicionales se divulgan a lo largo de toda la Descripción Detallada.

A menos que se defina lo contrario en la presente, los términos científicos y técnicos utilizados en conexión con la presente divulgación tendrán los significados que son comúnmente entendidos por aquellos de habilidad común en el estado de la técnica. Además, a menos que se requiera lo contrario por contexto, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán los singulares. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y técnicas de, cultivos celulares y de tejidos, biología molecular, inmunología, microbiología, genética y química de proteínas y ácidos nucleicos e hibridización descritas en la presente son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en el estado de la técnica.

Los métodos y técnicas de la presente divulgación generalmente se realizan según métodos bien conocidos en el estado de la técnica y como se describió en varias referencias generales y más específicas que son citadas y discutidas a lo largo de toda la presente especificación a menos que se indique lo contrario. Tales referencias incluyen, *ej.,* Sambrook y Russell, *Molecular Cloning, A Laboratory Approach,* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2001) , Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology,* John Wiley & Sons, NY (2002) , y Harlow y Lane *Antibodies: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1990). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación son realizadas según especificaciones del fabricante, como se realizó comúnmente en el estado de la técnica o como se describió en la presente. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con, y los

procedimientos de laboratorio y técnicas de, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica descritos en la presente son aquellos bien conocidos y comúnmente utilizados en el estado de la técnica. Las técnicas estándares se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación, formulación, y distribución farmacéutica, y tratamiento de pacientes.

Como se utilizan en la presente, cada uno de los siguientes términos tiene el significado asociado en éste en esta sección.

Los artículos "un" y "una" se utilizan en la presente para referirse a uno o más de uno (es decir, a al menos uno) del objeto gramatical del articulo. A manera de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Como se utilizan en la presente, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen utilización convencional. Ver *Inmunology—A Synthesis* (Segunda Edición, E. S. Golub y D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991)).

Los términos " α5β1" y "integrina α5β1" se utilizan de manera intercambiable, e incluyen variantes, isoformas y homólogos de especies de α5β1 humano. α5β1 humano nativo, por ejemplo, está compuesto de la subunidad α5 (la cual se deriva a partir de una secuencia precursora que es subsiguientemente cortada en dos cadenas que están unidas por un enlace de disulfuro) (No. de Acceso del Genbank. P08648) y una subunidad β1 (la cual se deriva a partir de una secuencia precursora que es subsiguientemente procesada en una forma madura) (No. de Acceso del Genbank. P05556-1). Se conoce que la subunidad β1 existe como varias isoformas producidas mediante empalme alternativo (ver, ej., No. de Acceso del Genbanks. P05556-2, P05556-3, P05556-4, y P05556-5). Los anticuerpos humanos α5β1 de la divulgación pueden, en ciertos casos, reaccionar de manera cruzada con α5β1 de especies diferentes a la humana. En otros casos, los anticuerpos pueden ser completamente específicos para α5β1 humano y no pueden exhibir especies u otros tipos de reactividad cruzada.

Una "respuesta inmune", como lo entendería alguien con experiencia, incluye, pero no está limitada a, cualquier activación alogénica o específica a antígeno detectable de una célula T helper o respuesta de células T citotóxicas, producción de anticuerpos, activación mediada por células T de reacciones alérgicas, y similares. El término incluye la acción de, por ejemplo, linfocitos, células presentadoras de antígenos, células fagocíticas, granulocitos, y macromoléculas solubles producidas por las anteriores células o el hígado (incluyendo anticuerpos, citoquinas, y

complemento) que resulta en daño selectivo a, destrucción de, o eliminación desde el cuerpo humano de patógenos invasores, células o tejidos infectados con patógenos, células cancerosas, o, en casos de autoinmunidad o inflamación patológica, células o tejidos humanos normales.

Una "ruta de transducción de señales" se refiere a la relación bioquímica entre una variedad de moléculas de transducción de señales que juegan un rol en la transmisión de una señal desde una parte de una célula hasta otra parte de una célula. Como se utiliza en la presente, la frase "receptor de superficie celular" incluye, por ejemplo, moléculas y complejos de moléculas capaces de recibir una señal y la transmisión de tal señal a través de la membrana de plasma de una célula. Un ejemplo de un "receptor de superficie celular" de la presente divulgación es la integrina $\alpha 5\beta 1$.

El término "anticuerpo" como se utiliza en la presente incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento fijador de antígenos (es decir, "porción fijadora de antígenos") o cadenas simples del mismo. Un "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, o una porción fijadora de antígenos de la misma. Cada cadena pesada está comprendida de una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta de de tres dominios, C_H1, C_H2 y C_H3- Cada cadena liviana está compuesta de una región variable de cadena liviana (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de cadena liviana. La región constante de cadena liviana está compuesta de un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L pueden ser además subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), entremezcladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, ordenadas desde de término amino hasta término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospederos, incluyendo varias células del sistema inmune (*ej.*, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema de complemento clásico. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, con la cadena pesada también incluyendo

una región "D" de aproximadamente 10 o más aminoácidos. Ver generalmente, Inmunología General Capitulo. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

El término "porción fijadora de antígenos" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"), como se utiliza en la presente, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad para fijarse específicamente a un antígeno *(ej.,* α5β1). Se ha mostrado que la función fijadora de antígenos de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos fijadores incluidos dentro del término "porción fijadora de antígenos" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consta de los dominios V_L, V_H, C_L y Cm; (ii) un fragmento F(ab')2, un fragmento bivalente comprendiendo dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro sobre la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consta de los dominios V_H y C_H1; (iv) un fragmento Fv que consta de los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al,* (1989) *Nature* 341:544-546), el cual consta de un dominio V_H; y (vi) una región determinante de complementariedad aislada (CDR). Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite ser hechos como una única cadena de proteínas en la cual las regiones V_L y V_H se unen para formar moléculas monovalentes (conocidas como cadena simple Fv (scFv); *ver ej.,* Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426; y Huston (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883;. Tales anticuerpos de cadena simple también están incluidos dentro del término "porción fijadora de antígenos" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpos pueden ser obtenidos utilizando cualquier técnica apropiada, incluyendo técnicas convencionales conocidas por aquellos con experiencia en el estado de la técnica, y los fragmentos se pueden tamizar para utilidad en la misma forma que anticuerpos intactos.

Un "anticuerpo aislado", como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos con diferentes especificidades antigénicas (*ej.,* un anticuerpo aislado que específicamente se une a α5β1 es sustancialmente libre de anticuerpos que específicamente fijan antígenos diferentes a α5β1. Un anticuerpo aislado que específicamente se une a α5β1 puede, sin embargo, tener reactividad cruzada a otros antígenos, tales como moléculas α5β1 desde otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o químicos.

Los términos "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal" como se utilizan en la presente se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpos de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una especificidad y afinidad de unión sencillas para un epítopo particular.

Los términos "anticuerpo humano", o "anticuerpo completamente humano", como se utilizan en la presente, incluyen anticuerpos con regiones variables en los cuales tanto el marco como las regiones CDR se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también es derivada a partir de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. Los anticuerpos humanos de la divulgación o porción fijadora de antígenos de los mismo pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas *(ej.,* mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica a sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo).* Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se utiliza en la presente, no incluye anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas a partir de la línea germinal de otras especies mamíferas, tales como un ratón, hayan sido injertadas sobre secuencias de marco humanas.

Los términos "anticuerpo humano monoclonal" o "anticuerpo monoclonal completamente humano" se refieren a anticuerpos que presentan una especificidad de unión sencilla la cual tiene regiones variables en las cuales tanto las regiones de marco como CDR se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos son producidos por un hibridoma el cual incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, *ej.,* un ratón transgénico, con un genoma comprendiendo un transgen de cadena pesada humana y un transgen de cadena liviana, donde la célula B es fusionada a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo humano recombinante", como se utilizan en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados a partir de un animal *(ej.,* un ratón) que es transgénico o transcromosomal para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados a partir de una célula hospedera transformada para expresar el anticuerpo humano, *ej.,* a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una librería de anticuerpos humanos

recombinantes combinatoriales, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que involucre unión de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las cuales las regiones de marco y CDR se derivan a partir de secuencias de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden estar sometidos a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para secuencias Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias aminoácidas de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, mientras se deriven y estén relacionadas con secuencias VH y VL de líneas germinales humanas, no pueden existir de manera natural dentro del repertorio de líneas germinales de anticuerpos humanos *in vivo*.

Como se utilizan en la presente, "isotipo" o "clase" se refiere a la clase de anticuerpos *(ej.,* IgM o IgG) que es codificada por los genes de regiones constantes de cadena pesada. Los dominios constantes de anticuerpos no están involucrados en unión a antígenos, pero exhiben varias funciones efectoras. Dependiendo de la secuencia aminoácida de la región constante de cadena pesada, un anticuerpo o inmunoglobulina humana dada se puede asignar a una de cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM. Las estructuras y configuraciones tri-dimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas. De las varias clases de inmunoglobulinas humanas, solamente IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, e IgM humanas son conocidas por activar complemento. IgGl y IgG3 humanas son conocidas por mediar ADCC en humanos.

Como se utiliza en la presente, "subclase" se refiere a la especificación adicional dentro de un isotipo del gen de región constante de cadena pesada, tales como, por ejemplo, las subclases IgGl, IgG2, IgG3, o IgG4 dentro del isotipo IgG.

Como se utiliza en la presente, el término "compuesto" o "compuesto farmacéutico" incluye anticuerpos, porciones fijadoras de antígenos de los mismos, inmunoconjugados, y moléculas biespecíficas.

La frases "un anticuerpo que reconoce un antígeno" y "un anticuerpo específico para un antígeno" se utilizan de manera intercambiable en la presente con el término "un anticuerpo el cual se fija específicamente a un antígeno."

El término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o "ADCC" se refiere a una reacción mediada por células en la cual células citotóxicas no específicas (ej. células NK, neutrófilos, macrófagos, etc.) reconocen el anticuerpo fijado sobre una célula diana y subsiguientemente causan lisis de la célula diana. Tales células citotóxicas que median ADCC generalmente expresan receptores Fc (FcR). Las células primarias para mediar ADCC (células NK) expresan FcγRIII, mientras los monocitos expresan FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y/o FcγRIV. La expresión FcR sobre células hematopoyéticas se resume en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol,* 9:457-92 (1991). Para evaluar la actividad ADCC de una molécula, se puede realizar un ensayo ADCC *in vitro*, tal como el que se describe en las Patentes Americanas No. 5,500,362 o 5,821,337. Células efectoras útiles para tales ensayos incluyen células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMC) y células Asesinas Naturales (NK). Alternativamente, o adicionalmente, la actividad ADCC de las moléculas de interés se puede evaluar *in vivo,* ej., en un modelo animal tal como aquel divulgado en Clynes, *Proc. Nail. Acad, Sci.* (USA), 95:652-656 (1998).

Los términos "receptor Fc" o "FcR" se utilizan para describir un receptor que se fija a la región Fc de un anticuerpo donde la región Fc comprende una región de bisagra y los dominios CH2 y CH3 de la cadena pesada. Por ejemplo, el FcR puede ser un FcR humano de secuencia nativa. El FcR pueden ser uno que fija un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII, FcγRIII, y FcγRIV, incluyendo variantes alélicas y alternativamente formas unidas de estos receptores. Los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor activador") y FcγRIIB (un "receptor inhibidor"), el cual tiene secuencias aminoácidas similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor activador FcγRIIA contiene un motivo de activación basado en tirosina inmunoreceptora (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor inhibidor FcγRIIB contiene un motivo de inhibición basado en tirosina inmunoreceptora (ITIM) en su dominio citoplásmico (ver, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.,* 15:203-234 (1997)). Los FcRs son revisados en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.,* 9:45792 (1991); Capel ., *Immunomethods,* 4:25-34 (1994); y de Haas ., *J. Lab. Clin. Med.,* 126:330-41 (1995). Otros FcRs, incluyendo aquellos para ser identificados en el futuro, son incluidos por el término "FcR" en la presente. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, el cual es responsable de la transferencia de IgGs maternos al feto (Guyer , *Immunol,* 117:587 (1976) y Kim , J. Immunol, 24:249 (1994)). El sitio de unión FcR primario sobre

fragmentos de inmunoglobulina Fc reside en la región de bisagra entre los dominios CH1 y CH2. Esta región de bisagra interactúa con el FcRl-3 sobre varios leucocitos y dispara estas células para atacar el blanco (Wines , *J. Immunol.,* 164:5313-5318 (2000)). La región de bisagra incluye, pero no está limitada a, las secuencias descritas en la Patente Americana No. 6,165,476.

El término "capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" se refiere a la capacidad de un agente, tal como un anticuerpo, para demostrar ADCC medida mediante ensayo(s) conocido(s) por aquellos con experiencia en el estado de la técnica. Tal actividad típicamente se caracteriza por la unión de la región Fc con varios FcRs. Sin ser limitados por algún mecanismo particular, aquellos con experiencia en el estado de la técnica reconocerán que la capacidad de un anticuerpo para demostrar ADCC pueden ser, por ejemplo, en virtud de la subclase (tal como IgGl o IgG3), mediante mutaciones introducidas en la región Fc, o en virtud de modificaciones a los modelos de carbohidratos en la región Fc del anticuerpo. Tales modificaciones se describen, por ejemplo, en la Publicación de Patente Americana No. 2007-0092521.

El término "derivados de anticuerpos humanos" se refiere a cualquier forma modificada del anticuerpo humano, *ej.,* un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo.

El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias CDR derivadas a partir de la línea germinal de otras especies mamíferas, tales como un ratón, se han injertado sobre secuencias humanas de marco. Modificaciones adicionales de regiones de marco pueden ser hechas dentro de las secuencias humanas de marco.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a anticuerpos en los cuales las secuencias de regiones variables se derivan a partir de una especie y las secuencias de regiones constantes se derivan a partir de otras especies, tales como un anticuerpo en el cual las secuencias de regiones variables se derivan a partir de un anticuerpo de ratón y las secuencias de regiones constantes se derivan a partir de un anticuerpo humano.

La frase "específicamente fija," como se utiliza en la presente, se refiere a un compuesto, *ej.,* una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, y similares, el cual reconoce y fija una molécula específica, pero sustancialmente no reconoce o fija otras moléculas en una muestra. Por ejemplo, un anticuerpo o un inhibidor peptídico el cual reconoce y fija un ligando cognado *(ej.,* un anticuerpo anti- α5β1 que fija con su antígeno cognado, α5β1) en una muestra, pero sustancialmente no reconoce o fija otras moléculas en la muestra. Por lo tanto, bajo las

condiciones de ensayo designadas, la fracción fijadora específica *(ej.,* un anticuerpo o una porción fijadora de antígenos del mismo) se fija preferiblemente a una molécula diana particular, *ej.,* α5β1, y no se fija en una cantidad significativa a otros componentes presentes en una muestra de prueba. Se pueden utilizar una variedad de formatos de ensayo para seleccionar un anticuerpo que específicamente se fije a una molécula de interés. Por ejemplo, inmunoensayo ELISA de fase sólida, inmunoprecipitación, BIAcore, FACS, y análisis Western blot están entre los muchos ensayos que se pueden utilizar para identificar un anticuerpo que específicamente reacciona con α5β1. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o ruido de fondo y más típicamente más de 10 veces el fondo, aún más específicamente, se dice que un anticuerpo "específicamente fija" un antígeno cuando la constante de disociación de equilibrio (K_D) es < 1 μM, por ejemplo < 100 nM y, además por ejemplo, < 10 nM.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo que "específicamente se une a integrina humana α5β1" se refiere a un anticuerpo que se une a integrina humana α5β1 con una K_D de 1 x 10^{-7} M o menos, 5 x 10^{-8} M o menos, 3 x 10^{-8} M o menos, 1 x 10^{-8} M o menos, o 5 x 10^{-9} M o menos.

El término "k_{on}", como se utiliza en la presente, se refiere a la tasa de encendido, o tasa de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras el término "k_{off}," como se utilizan en la presente, se refiere a la tasa de apagado, o tasa de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término "K_D", como se utiliza en la presente, se refiere a la constante de disociación, la cual se obtiene a partir de la proporción de k_{off} a k_{on} (es decir,. k_{off}/k_{on}) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores K_D para anticuerpos se pueden determinar utilizando métodos bien establecidos en el estado de la técnica. Un método para determinar la K_D de un anticuerpo es utilizando resonancia de plasmones superficiales, típicamente utilizando un sistema biosensor tal como un sistema Biacore®.

Como se utiliza en la presente, el término "afinidad alta" para un anticuerpo IgG se refiere a un anticuerpo con una K_D 1 x 10^{-7} M o menos, 5 x 10^{-8} M o menos, o 5 x 10^{-9} M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo con una K_D de 10^{-6} M o menos, 10^{-7} M o menos, o 10^{-8} M o menos.

El término "competir", como se utiliza en la presente con respecto a un anticuerpo, se refiere a cuando un primer anticuerpo, o una porción fijadora de antígenos del mismo, compite

por unirse con un segundo anticuerpo, o una porción fijadora de antígenos del mismo, donde la unión del primer anticuerpo con su epítopo cognado es detectablemente disminuyó en la presencia del segundo anticuerpo en comparación con la unión del primer anticuerpo en la ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, donde la unión del segundo anticuerpo con su epítopo también es detectablemente disminuida en presencia del primer anticuerpo, puede pero no necesita ser el caso. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la unión de un segundo anticuerpo con su epítopo sin que el segundo anticuerpo inhiba la unión del primer anticuerpo con su respectivo epítopo. Sin embargo, donde cada anticuerpo detectablemente inhibe la unión de los otros anticuerpos con su epítopo o ligando cognado, ya sea en la misma, mayor o menor extensión, se dice que los anticuerpos "compiten de manera cruzada" entre sí por la unión de sus respectivos epítopos. Por ejemplo, los anticuerpos compitiendo de manera cruzada pueden fijarse al epítopo, o parte del epítopo, al cual los anticuerpos como se divulgan en la presente se fijan. El uso tanto de anticuerpos de competencia como de competencia cruzada se contempla por la presente divulgación. Sin importar el mecanismo por el cual tal competencia o competencia cruzada ocurre *(ej.,* impedimento estérico, cambio conformacional, o unión a un epítopo común, o parte del mismo, y similares), alguien con experiencia apreciará, con base en las enseñanzas proporcionadas en la presente, que tales anticuerpos de competencia y/o de competencia cruzada están incluidos y pueden ser útiles para los métodos divulgados en la presente.

El término "epítopo" incluye cualquier determinante proteico capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. Los determinantes epitópicos usualmente constan de agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y usualmente tienen características estructurales tri-dimensionales específicas, así como también características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los últimos, se pierde en presencia de solventes desnaturalizantes.

"Glicoforma" se refiere a una estructura oligosacarida compleja comprendiendo enlaces de varias unidades de carbohidratos. Tales estructuras se describen en, *ej., Essentials of Glycobiology* Varki ., eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1999), el cual también proporciona una reseña de nomenclatura de glicobiologia estándar. Tales glicoformas incluyen, pero no se limitan a, G2, Gl, G0, G-l, y G-2 *(ver, ej.,* Publicación de Patente Internacional No. WO 99/22764).

"Modelo de glicosilación" se define como el modelo de unidades de carbohidratos que están covalentemente unidos a una proteína *(ej.,* la glicoforma) así como también al sitio al cual las glicoformas están covalentemente unidas al esqueleto peptídico de una proteína, más específicamente a una proteína de inmunoglobulina.

Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferentes glicoformas y/o modelos de glicosilación comparados con los demás. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico proporcionados en la presente, o que comprenden las secuencias aminoácidas proporcionadas en la presente son parte de la presente divulgación, sin importar la glicosilación de tales anticuerpos.

Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, *ej.,* mamíferos y no-mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, caballos, vacas, pollos, anfibios, reptiles, *etc.*

Como se utiliza en la presente, "tratar" significa reducir la frecuencia con la cual los síntomas de una enfermedad *(es decir,* crecimiento y/o metástasis tumoral, u otro efecto mediado por los números y/o actividad de células inmunes, y similares) son experimentados por un paciente. El término incluye la administración de los compuestos o agentes de la presente divulgación para prevenir o retardar el comienzo de los síntomas, complicaciones, o indicios bioquímicos de una enfermedad, aliviando los síntomas o deteniendo o inhibiendo el desarrollo adicional de la enfermedad, condición, o trastorno. El tratamiento puede ser profiláctico (para prevenir o retardar el comienzo de la enfermedad, o para prevenir la manifestación de síntomas clínicos o subclínicos de la misma) o supresión terapéutica o alivio de síntomas después de la manifestación de la enfermedad.

Varios aspectos de la divulgación se describen en detalle adicional en las siguientes subsecciones.

Anticuerpos anti-α5β1

Los anticuerpos de la divulgación se caracterizan por características funcionales particulares o propiedades de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se fijan específicamente a α5β1. Preferiblemente, un anticuerpo de la divulgación se fija a α5β1 con alta afinidad, por ejemplo con una K_D de 1×10^{-7} M o menos.

Preferiblemente, el anticuerpo se fija a α5β1 humano con una KD de 5 x 10^{-8} M o menos, 2 x 10^{-8} M o menos, 5x 10^{-9} M o menos, 4x 10^{-9} M o menos, 3 x 10^{-9} M o menos, o 2.7 x 10^{-9} M o menos. Ensayos para evaluar la capacidad de unión de los anticuerpos a α5β1 son conocidos en el estado de la técnica, incluyendo por ejemplo, ELISAs, Western blots, RIAs, y análisis de citometria de flujo. Ensayos apropiados se describen en detalle en los Ejemplos. La cinética de unión *(ej.,* afinidad de unión) de los anticuerpos también se puede evaluar por ensayos conocidos en el estado de la técnica, tales como análisis Biacore.

Los anticuerpos anti-α5β1 de la presente divulgación son también capaces de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Tal funcionalidad se puede lograr, por ejemplo, mediante el uso de una subclase específica (ej. IgGl, IgG2, IgG3), incluyendo mutaciones al dominio Fc que pueden además mejorar el nivel de actividad ADCC de un anticuerpo. Tales mutaciones y métodos para medir ADCC se describen en detalle en los Ejemplos.

Anticuerpo monoclonal 22B5

Un anticuerpo ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo humano monoclonal 22B5, como se describió en los Ejemplos 1 y 2. La secuencia aminoácida V_H de 22B5 se muestra en la Figura IB y es divulgada en SEQ ID NO:7. La secuencia aminoácida V_L de 22B5 se muestra en la Figura ID y es divulgada en SEQ ID NO:8. Como se muestra en Figura IB y Figura 2, la región variable de cadena pesada de 22B5 comprende dos mutaciones hacia la secuencia genética de línea germinal humana. Es decir, 22B5 comprende una mutación desde isoleucina a serina en el residuo aminoácido número 30 (BOS) y una mutación desde asparagina a serina en el residuo aminoácido número 33 (N33S). Como se utiliza en la presente, "22B5" se refiere al anticuerpo en donde dichas mutaciones de líneas germinales de regiones variables de cadena pesada BOS y N33S, han sido realizadas.

Dado que 22B5 puede fijarse a α5β1, las secuencias VH y VL pueden "combinarse" con otros anticuerpos anti-α5β1 para crear moléculas fijadoras anti-α5β1 adicionales de la divulgación. La unión α5β1 de tales anticuerpos "combinados" se puede probar utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en l Ejemplos *(ej.,* ELISAs). En un caso, cuando las cadenas VH y VL son combinadas, una secuencia VH desde un acoplamiento VH/VL particular es reemplazada con una secuencia VH estructuralmente similar. Igualmente, en otro caso una

secuencia VL desde un acoplamiento particular VH/VL es reemplazada con secuencia VL estructuralmente similar.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDR1s, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena liviana de 22B5. La secuencia aminoácida de la VH CDR1 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 1. La secuencia aminoácida de la VH CDR2 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 2. La secuencia aminoácida de la VH CDR3 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 3. La secuencia aminoácida de la VL CDR1 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO 4. La secuencia aminoácida de la VL CDR2 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 5. La secuencia aminoácida de la VL CDR3 de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 6. Las regiones CDR son delineadas utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., . (1991) Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Quinta Edición, Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242).

Dado que 22B5 se fija a α5β1 y que especificidad de unión de antígenos es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3s y las secuencias VL CDR1, CDR2, y CDR3 se pueden "mezclar y comparar" *(es decir,* CDRs a partir de diferentes anticuerpos α5β1 pueden ser mezcladas y comparadas, aunque cada anticuerpo típicamente tendrá una V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y una V_L CDR1, CDR2, y CDR3) para crear moléculas fijadoras anti-α5β1 adicionales de la divulgación. La unión α5β1 de tales anticuerpos "mezclados y comparados" se puede probar utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos *(ej.,* ELISAs, análisis Biacore). En un caso, cuando las secuencias VH CDR son mezcladas y comparadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 desde una secuencia VH particular es reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar. Igualmente, cuando secuencias VL CDR son mezcladas y comparadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VL particular típicamente es reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar. Será fácilmente manifiesto para alguien con experiencia común que las secuencias VH y V_L novedosas se pueden crear al sustituir una o más secuencias de regiones VH y/o V_L CDR con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR divulgadas en la presente.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 1; (b) una región

variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 2; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 3; (d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 4; (e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 5; y/o (f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 6; en donde el anticuerpo específicamente se fija a α5β1, preferiblemente α5β1 humano.

Anticuerpos monoclonales 2D2, 24C7 y 1D9

Otro anticuerpo ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo humano monoclonal 2D2, descrito en los Ejemplos 1 y 8. La secuencia aminoácida V_H de 2D2 se muestra en SEQ ID NO: 39. La secuencia aminoácida V_L de 2D2 se muestra en SEQ ID NO: 40.

Otro anticuerpo ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo humano monoclonal 24C7, descrito en los Ejemplos 1 y 8. La secuencia aminoácida V_H de 24C7 se muestra en SEQ ID NO: 19. La secuencia aminoácida V_L de 24C7 se muestra en SEQ ID NO: 20.

Otro anticuerpo ilustrativo de la divulgación es el anticuerpo humano monoclonal 1D9, descrito en los Ejemplos 1 y 8. La secuencia aminoácida V_H de 1D9 se muestra en SEQ ID NO: 29. La secuencia aminoácida V_L de 1D9 se muestra en SEQ ID NO: 30.

Dado que 2D2, 24C7, y 1D9 pueden fijarse a α5β1, las secuencias V_H y V_L de estos anticuerpos pueden ser "mezcladas y comparadas" con otros anticuerpos anti-α5β1 para crear moléculas fijadoras anti-α5β1 adicionales de la divulgación. La unión α5β1 de tales anticuerpos "mezclados y comparados" se puede probar utilizando los ensayos de unión descrito anteriormente y en los Ejemplos *(ej.,* ELISAs). En un caso, cuando las cadenas V_H y V_L son mezcladas y comparadas, una secuencia V_H a partir de un acoplamiento V_H/V_L es reemplazada con una secuencia VH estructuralmente similar. Igualmente, en otro caso una secuencia V_L desde un acoplamiento V_H/V_L es reemplazada por una secuencia V_L estructuralmente similar.

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que comprenden las CDRls, CDR2s y CDR3s de cadena pesada y cadena liviana de 2D2, 24C7, y 1D9. Las correspondientes secuencias aminoácidas de estas CDRs son indicadas a continuación.

Anticuerpo	**CDR**	SEQ **ID NO:**		**Anticuerpo**	**CDR**	SEQ **ID NO:**
2D2	V_HCDR1	33		24C7	V_LCDR1	16
2D2	V_H CDR2	34		24C7	V_U CDR2	17
2D2	V_H CDR3	35		24C7	V_L CDR3	18
2D2	V_L CDR1	36		1D9	V_H CDR1	23
2D2	V_U CDR2	37		1D9	V_H CDR2	24
2D2	V_L CDR3	38		1D9	V_H CDR3	25
24C7	V_H CDR1	13		1D9	V_L CDR1	26
24C7	V_H CDR2	14		1D9	V_L CDR2	27
24C7	V_H CDR3	15		1D9	V_L CDR3	28

Las regiones CDR son delineadas utilizando el sistema Kabat (Kabat, E. A., . (1991). Secuencias de Proteínas de Interés inmunológico, Quinta Edición, Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242).

Dado que 2D2, 24C7 y 1D9 se fijan a α5β1 y que la especificidad de unión de antígenos es proporcionada principalmente por las regiones CDR1, CDR2, y CDR3, las secuencias VH CDR1, CDR2, y CDR3s y las secuencias V_L CDR1, CDR2, CDR3 pueden ser "mezcladas y comparadas" *(es decir,* CDRs de diferentes anticuerpos α5β1 se pueden mezclar y comparar, aunque cada anticuerpo típicamente tendrá una V_H CDR1, CDR2, y CDR3 y a V_L CDR1, CDR2, y CDR3) para crear moléculas fijadoras anti-α5β1 adicionales de la divulgación. La unión α5β1 de tales anticuerpos "mezclados y comparados" se puede probar utilizando los ensayos de unión descritos anteriormente y en los Ejemplos *(ej.,* ELISAs, análisis Biacore). En un caso, cuando secuencias V_H CDR son mezcladas y comparadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 desde una SECUENCIA V_H es reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar. Igualmente, cuando secuencias VL CDR son mezcladas y comparadas, la secuencia CDR1, CDR2 y/o CDR3 a partir de una secuencia VL particular típicamente es reemplazada con una secuencia CDR estructuralmente similar(s). Será fácilmente manifiesto para alguien con experiencia común que las secuencias V_H y V_L novedosas pueden ser creadas al sustituir una o más secuencias de regiones V_H y/o V_L CDR con secuencias estructuralmente similares a partir de las secuencias CDR divulgadas en la presente.

Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 33; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 34; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 35; (d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 36; (e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 37; y/o (f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 38; en donde el anticuerpo específicamente se une a α5β1, preferiblemente α5β1 humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 13; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 14; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 15; (d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 16; (e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 17; y/o (f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 18; en donde el anticuerpo específicamente se une a α5β1, preferiblemente α5β1 humano.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo comprendiendo: (a) una región variable de cadena pesada CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 23; (b) una región variable de cadena pesada CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 24; (c) una región variable de cadena pesada CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 25; (d) una región variable de cadena liviana CDR1 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 26; (e) una región variable de cadena liviana CDR2 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 27; y/o (f) una región variable de cadena liviana CDR3 comprendiendo la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 28; en donde el anticuerpo específicamente se une a α5β1, preferiblemente α5β1 humano.

Anticuerpos Con Secuencias de Líneas Germinales Particulares

En ciertos aspectos, un anticuerpo de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada a partir de un gen de inmunoglobulina de cadena pesada de línea germinal particular y/o una región variable de cadena liviana a partir de un gen de inmunoglobulina de cadena liviana de línea germinal particular.

Por ejemplo, en un aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada es decir el producto de o derivado a partir de un gen V_H 4-39 humano, en donde el anticuerpo específicamente se fija a α5β1. En otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada es decir el producto de o derivado a partir de un en VH 3-30.3 humano, en donde el anticuerpo específicamente se fija a α5β1. En aún otro aspecto, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena liviana es decir el producto de o derivado a partir de un gen VK L6 humano, en donde el anticuerpo específicamente se fija a α5β1. En aún otro aspecto ilustrativo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, en donde el anticuerpo:

(a) comprende una región variable de cadena pesada es decir el producto de o derivado a partir de aun gen VH 4-39 humano (tal gen codifica la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NO: 7) o un gen 3-30.3 humano (tal gen codifica la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NOs: 19, 29, o 39);

(b) comprende una región variable de cadena liviana es decir el producto de o derivado a partir de un gen VK L6 humano (tal gene codifica la secuencia aminoácida divulgada en SEQ ID NOs: 8, 20, 30, o 40); y

(c) específicamente se fija a α5β1, preferiblemente α5β1 humano.

Un ejemplo de un anticuerpo con VH y V_L de VH 4-39 y VK L6, respectivamente, es 22B5. Ejemplos de anticuerpos con VH y VL de VH 3-30.3 y VK L6, respectivamente, son 24C7, 2D2, y 1D9.

Como se utiliza en la presente, un anticuerpo humano comprende regiones variables de cadena pesada o liviana es decir "el producto de" o "derivado a partir de" una secuencia de línea germinal si las regiones variables del anticuerpo son obtenidas a partir de un sistema que utilice genes de inmunoglobulina de líneas germinales humanas. Tales sistemas incluyen inmunizar un

ratón transgénico que lleva genes de inmunoglobulina humana con el antígeno de interés o tamizar una libraría génica de inmunoglobulina humana de expresión en fago con el antígeno de interés. Un anticuerpo humano es decir "el producto de" o "derivado a partir de" una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana se puede identificar como tal al comparar la secuencia aminoácida del anticuerpo humano con la secuencia aminoácida de inmunoglobulinas de líneas germinales humanas y seleccionar la secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana que está más cerca en la secuencia *(es decir,* mayor porcentaje de identidad) a la secuencia del anticuerpo humano. Un anticuerpo humano es decir "el producto de o "derivado a partir de" una secuencia particular de inmunoglobulina de línea germinal humana puede contener diferencias aminoácidas en comparación con la secuencia de línea germinal, debido a, por ejemplo, mutaciones somáticas de ocurrencia natural o introducción intencional de mutación sitio- dirigida. Sin embargo, un anticuerpo humano seleccionado típicamente es al menos 90% idéntico en secuencia aminoácida a una secuencia aminoácida codificada por un gen de inmunoglobulina de línea germinal humana y contiene residuos aminoácidos que identifican el anticuerpo humano como humano cuando se comparan con las secuencias aminoácidas de inmunoglobulina de línea germinal de otras especies *(ej.,* secuencias de líneas germinales murinas). En ciertos casos, un anticuerpo humano puede ser al menos 95%, o aún al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idéntico en secuencia aminoácida a la secuencia aminoácida codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. En ciertos casos, el anticuerpo humano es idéntico en secuencia aminoácida a la secuencia aminoácida codificada por el gen Ig de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo humano derivado a partir de una secuencia de línea germinal humana particular presentará no más de 10 diferencias aminoácidas desde la secuencia aminoácida codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos casos, el anticuerpo humano puede presentar no más de 5, o aún no más de 4, 3, 2, o 1 diferencia aminoácida a partir de la secuencia aminoácida codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Anticuerpos Homólogos

En aún otro aspecto, un anticuerpo de la divulgación comprende regiones variables de cadena pesada y liviana comprendiendo secuencias aminoácidas que son homólogas a las secuencias aminoácidas de los anticuerpos ilustrativos descritos en la presente, y en donde los

anticuerpos retienen las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti- α5β1 de la divulgación.

Por ejemplo, la divulgación proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena liviana, en donde:

(a) la región variable de cadena pesada comprende una secuencia aminoácida que es al menos 80% homóloga a una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 7, 19, 29, y 39;

(b) la región variable de cadena liviana comprende una secuencia aminoácida que es al menos 80% homóloga a la secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 8, 20, 30, y 40; y el anticuerpo exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(i) el anticuerpo se fija a α5β1 humano con una KD de $1x10^{-7}$ M o menos;

(ii) el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En varios ejemplos, el anticuerpo pueden ser, por ejemplo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

En otros ejemplos, las secuencias aminoácidas VH y/o VL puede ser 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% homólogas a las secuencias divulgada anteriormente. Un anticuerpo con las regiones VH y VL con alta homología *(es decir,* 80% o más) a las regiones VH y VL de las secuencias divulgadas anteriormente, se puede obtener mediante mutagénesis *(ej.,* mutagénesis sitio- dirigidas o mediada por PCR) de las moléculas de ácido nucleico que codifican SEQ ID NOs: 7, 19, 29, 39, 8, 20, 30, y/o 40, seguido por prueba del anticuerpo alterado codificado para función retenida *(es decir,* las propiedades divulgada en (i) y/o (ii) anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente.

Como se utiliza en la presente, el porcentaje de homología entre dos secuencias aminoácidas es equivalente al porcentaje de identidad entre las dos secuencias. La porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias *(es decir,* porcentaje de homología = # de posiciones idénticas/# total de posiciones x 100), tomando en cuenta el número de brechas, y la longitud de cada brecha, la cual necesita ser introducida para alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y determinación de porcentaje de identidad entre dos secuencias se pueden realizar

utilizando un algoritmo matemático, como se describe en los ejemplos no limitantes más adelante.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias aminoácidas se puede determinar utilizando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller *(Comput. Appl. Biosci.,* 4:11-17 (1988)) el cual se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), utilizando una tabla de residuos en peso PAM120, una penalidad de longitud de brecha (*gap length penalty*) de 12 y una penalidad de brecha de 4. Además, el porcentaje de identidad entre dos secuencias aminoácidas se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch *(J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970)) el cual se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en http://www.gcg.com), utilizando cualquiera una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de brecha de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6.

Adicionalmente o alternativamente, las secuencias de proteínas de la presente divulgación se pueden utilizar además como una "secuencia pregunta (*query)*" para realizar una búsqueda en bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden realizar utilizando el programa XBLAST (versión 2.0) de Altschul, (1990). *Mol. Biol.* 215:403-10. Se pueden realizar búsquedas de proteínas BLAST con el programa XBLAST, puntaje = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias aminoácidas homólogas a las moléculas de anticuerpos de la divulgación. Para obtener alineaciones *gapped* para propósitos de comparación, se puede utilizar Gapped BLAST como se describió en Altschul, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402.Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por omisión de los respectivos programas *(ej.,* XBLAST y NBLAST). Ver http://www.ncbi.nlm.nih.gov.

Anticuerpos con Modificaciones Conservadoras

En ciertos casos, un anticuerpo de la divulgación comprende una región variable de cadena pesada comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 y una región variable de cadena liviana comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2 y CDR3, en donde una o más de estas secuencias CDR comprenden secuencias aminoácidas específicas con base en el anticuerpo ilustrativo descrito en la presente *(ej.,* 22B5, 1D9, 24C7, y 2D2), o modificaciones conservadoras de las mismas, y en donde los anticuerpos retienen una o más de las propiedades funcionales deseadas de los anticuerpos anti- α5β1 de la divulgación. Por consiguiente, la divulgación

proporciona un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 y una región variable de cadena liviana comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3, en donde:

(a) la secuencia de región variable de cadena pesada CDR3 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 3, 15, 25, y 35, y modificaciones conservadoras de la misma;

(b) la secuencia de región variable de cadena liviana CDR3 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 6, 18, 28, y 38, y modificaciones conservadoras de la misma; y el anticuerpo exhibe una o más de las siguientes propiedades:

(i) el anticuerpo se fija a $\alpha 5\beta 1$ con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos;

(ii) el anticuerpo es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

En otros casos, la secuencia de región variable de cadena pesada CDR2 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 14, 24, y 34, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia de región variable de cadena liviana CDR2 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 5, 17, 27, y 37, y modificaciones conservadoras de la misma. En otro caso, la secuencia de región variable de cadena pesada CDR1 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 1,13, 23, y 33, y modificaciones conservadoras de la misma; y la secuencia de región variable de cadena liviana CDR1 comprende una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 4, 16, 26, y 36, y modificaciones conservadoras de la misma.

Como se utiliza en la presente, el término "modificación conservadora" se refiere a modificaciones aminoácidas que no afectan o alteran significativamente las características de unión del anticuerpo conteniendo la secuencia aminoácida. Tales modificaciones conservadoras incluyen sustituciones, adiciones y supresiones aminoácidas. Las modificaciones se pueden introducir en un anticuerpo de la divulgación mediante técnicas estándares conocidas en el estado de la técnica, tales como mutagénesis sitio-dirigida y mutagénesis PCR- mediada. La modificación conservadora de una secuencia dada puede incluir aquellas secuencias que son al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99% idénticas a aquella secuencia. Las sustituciones aminoácidas conservadoras son

aquellas en las cuales el residuo aminoácido es reemplazado por un residuo aminoácido con una cadena lateral similar. Las familias de residuos aminoácidos con cadenas laterales similares se han definido en el estado de la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas *(ej.,* lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas *(ej.,* ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas *(ej.,* glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteina, triptofano), cadenas laterales no polares *(ej.,* alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales beta-ramificadas *(ej.,* treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas *(ej.,* tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Así, uno o más residuos aminoácidos dentro de las regiones CDR de un anticuerpo de la divulgación se pueden reemplazar con otros residuos aminoácidos a partir de la misma familia de cadena lateral y el anticuerpo alterado se puede probar para función retenida *(es decir,* las propiedades divulgadas en (i) a (ii) anteriormente) utilizando los ensayos funcionales descritos en la presente. Otro tipo de modificación aminoácida es eliminar pares asparagina-glicina, los cuales forman sitios potenciales de desamidación, al alterar uno o ambos residuos. En otro ejemplo, la lisina de terminal C de la cadena pesada de un anticuerpo α5β1 de la divulgación ha sido cortada, y por lo tanto no está presente. La escisión de la lisina de terminal C puede ser modificada por adelantado, o puede resultar de las condiciones utilizadas para expresar y purificar el anticuerpo. En varios casos, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos α5β1 pueden opcionalmente incluir una secuencia de señal.

Anticuerpos que se Fijan al Mismo Epítopo como los Anticuerpos Ilustrativos anti-α5β1 de la Divulgación

En otro aspecto, la divulgación proporciona anticuerpos que se fijan al mismo epítopo sobre α5β1 humano como cualquiera de los anticuerpos monoclonales α5β1 ilustrativos de la divulgación *(es decir,* anticuerpos que tienen la capacidad de competir de manera cruzada por la unión a α5β1 con cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la divulgación). Por ejemplo, el anticuerpo de referencia para estudios de competencia cruzada puede ser el anticuerpo monoclonal 22B5 (con secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 7 y 8, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 24C7 (con secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 19 y 20, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 1D9 (con secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 29 y 30, respectivamente), o el anticuerpo monoclonal 2D2 (con secuencias V_H y V_L como se muestra en SEQ ID NOs: 39 y 40, respectivamente). Tales

anticuerpos de competencia cruzada se pueden identificar con base en su capacidad para competir de manera cruzada con 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2 en ensayos estándares de unión α5β1. Por ejemplo, se puede utilizar análisis BIAcore, ensayos ELISA o citometría de flujo para demostrar competencia cruzada con los anticuerpos ilustrativos de la presente divulgación. La capacidad de un anticuerpo de prueba para inhibir la unión de, por ejemplo, 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2 a α5β1 humano demuestra que el anticuerpo de prueba puede competir con 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2 por la unión a α5β1 humano y por lo tanto fijarse al mismo epítopo sobre α5β1 humano como 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2. En un caso, el anticuerpo que se fija al mismo epítopo sobre α5β1 humano como 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2 es un anticuerpo humano monoclonal. Tales anticuerpos monoclonales humanos pueden ser preparados y aislados como se describió, por ejemplo, en los Ejemplos.

Anticuerpos Modificados y Modificados Genéticamente

Un anticuerpo, o porción fijadora de antígenos del mismo, de la divulgación además se puede preparar utilizando un anticuerpo con una o más de las secuencias V_H y/o V_L divulgadas en la presente como material de inicio para modificar genéticamente un anticuerpo ya modificado, tal anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas a partir del anticuerpo de inicio. Un anticuerpo puede se modificado genéticamente al modificar uno o más residuos dentro de una o ambos regiones variables *(es decir,* VH y/o VL), por ejemplo dentro de uno o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones de marco. Adicionalmente o alternativamente, un anticuerpo puede ser modificado genéticamente al modificar residuos dentro de las regiones constantes, por ejemplo para alterar las funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de modificación genética de regiones variables que se puede realizar es el injerto CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDRs) de cadena pesada y liviana. Por esta razón, las secuencias aminoácidas dentro de CDRs son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de CDRs. Puesto que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de interacciones anticuerpos-antígenos, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imiten las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias CDR desde el anticuerpo natural específico injertado sobre secuencias de marco desde un anticuerpo diferente con propiedades diferentes (ver, *ej.,* Riechmann, L. . (1998) *Nature* 332:323-327; Junos,

P. (1986) *Nature* 321:522-525; Queen, C.. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033; Patente Americana No. 5,225,539 de Winter, y Patente Americana Nos. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen .)

Por consiguiente, otro aspecto de la divulgación se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado, o porción fijadora de antígenos del mismo, comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 1, 13, 23, y 33, SEQ ID NOs: 2, 14, 24, y 34, y SEQ ID NOs: 3, 15, 25, y 35, respectivamente, y una región variable de cadena liviana comprendiendo las secuencias CDR1, CDR2, y CDR3s comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 4, 16, 26, y 36, SEQ ID NOs: 5, 17, 27, y 37, y SEQ ID NOs: 6, 18, 28, y 38, respectivamente. Así, tales anticuerpos contienen las secuencias VH y VL CDR de los anticuerpos monoclonales 22B5, 24C7, 1D9, y 2D2, aún pueden contener diferentes secuencias de marco a partir de estos anticuerpos.

Tales secuencias de marco se pueden obtener a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de líneas germinales. Por ejemplo, las secuencias de AND de líneas germinales para genes humanos de regiones variables de cadena pesada y liviana se pueden encontrar en la base de datos de secuencias de líneas germinales humanas "VBase" (disponible en la Internet en www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase), así como también en Kabat, E. A., . (1991), Secuencias de Proteínas de Interés inmunológico, Quinta Edición, Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242; Tomlinson, I. M., . (1992), *J. Mol. Biol.* 227:776-798: y Cox, J. P. L. . (1994), *Eur. J. Immunol.* 24:827-836; el contenido de cada una incorporado expresamente en la presente como referencia). Como otro ejemplo, las secuencias de ADN de líneas germinales para genes de regiones variables de cadena pesada y liviana se pueden encontrar en la base de datos Genbank. Por ejemplo, las siguientes secuencias de líneas germinales de cadena pesada encontradas en el ratón HCo7 HuMAb están disponibles en los números de acceso Genbank anexos: 1-69 (NGJXH0109, NT_024637 y BC070333), 3-33 (NG_0010109 y NT_024637) y 3-7 (NG_0010109 y NT_024637). Como otro ejemplo, las siguientes secuencias de líneas germinales de cadena pesada encontradas en el ratón HCo 12 HuMAb son disponibles en los números de acceso Genbank anexos: 1-69 (NG 0010109, NT_024637 y BC070333), 5-51 (NGJXH01Q9 y NTJ)24637), 4-34 (NGJ)010109 y NT 024637), 3-30.3 (X92283), y 3-23 (AJ406678).

Las secuencias de marco para utilizar en los anticuerpos de la divulgación incluyen, pero no se limitan a, aquellas que son estructuralmente similar a las secuencias de marco utilizadas por anticuerpos seleccionados de la divulgación, *ej.*, similares a las secuencias de marco V_H 4-39 y/o la V_H 3-30.3 y/o las secuencias de marco V_K L6 utilizadas por anticuerpos monoclonales ilustrativos de la divulgación. Por ejemplo, las secuencias V_H CDR1, CDR2, y CDR3, y las secuencias V_L CDR1, CDR2, y CDR3, se pueden injertar sobre regiones de marco que tienen la secuencia idéntica como aquella encontradas en el gen de inmunoglobulina de línea germinal a partir de la cual la secuencia de marco se deriva, o las secuencias CDR se pueden injertar sobre regiones de marco que contienen una o más mutaciones comparadas con las secuencias de líneas germinales. Por ejemplo, se ha encontrado que en ciertas instancias es benéfico para mutar residuos dentro de la regiones de marco para mantener o aumentar la capacidad de unión de antígenos del anticuerpo (ver *ej.*, Patentes Americanas No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen*)*.

Otro tipo de modificación de región variable es mutar residuos aminoácidos dentro de las regiones V_H y/o V_L CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar así una o más propiedades de unión *(ej.*, afinidad) del anticuerpo de interés. Mutagénesis sitio- dirigida o mutagénesis mediada por PCR se pueden realizar para introducir las mutaciones e influenciar sobre la unión de anticuerpos, u otra propiedad funcional de interés, se pueden evaluar en ensayos *in vitro* o *in vivo* como se describió en la presente y se proporcionan en los Ejemplos. Típicamente, se introducen modificaciones conservadoras (discutidas anteriormente). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones aminoácidas. Además, típicamente no más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR son alterados.

Por consiguiente, en otra realización, la divulgación proporciona anticuerpos monoclonales aislados anti-a1b5, o porción fijadora de antígenos de los mismos, comprendiendo una región variable de cadena pesada comprendiendo: (a) una región V_H CDR1 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 1,13, 23, y 33 y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NOs: 1,13, 23, o 33; (b) una región V_H CDR2 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 14, 24, y 34, y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NOs: 2, 14, 24, o 34; (c) una

región V_H CDR3 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 3, 15, 25, y 35, y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NOs: 3, 15, 25, o 35; (d) una región V_L CDR1 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 4, 16, 26, y 36, y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NO: 4, 16, 26, o 36; (e) una región V_L CDR2 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 5, 17, 27, y 37, y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NOs: 5, 17, 27, o 37; y (f) una región V_L CDR3 comprendiendo una secuencia aminoácida seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 6, 18, 28, y 38, y una secuencia aminoácida con uno, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, supresiones o adiciones aminoácidas en comparación con SEQ ID NOs: 6, 18, 28, o 38.

Los anticuerpos modificados de la divulgación incluyen aquellos en los cuales las modificaciones han sido hechas a residuos de marco dentro de V_H y/o V_L, *ej.*, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente tales modificaciones de marco son hechas para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es someter a una "mutación restauradora" uno o más residuos de marco a la correspondiente secuencia de línea germinal. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado mutación somática puede contener residuos de marco que difieren de la secuencia de línea germinal de la cual el anticuerpo es derivado. Tales residuos se pueden identificar al comparar las secuencias de marco de anticuerpos con las secuencias de líneas germinales desde las cuales el anticuerpo es derivado. Para retornar las secuencias de regiones de marco a su configuración de línea germinal, las mutaciones somáticas se pueden "retromutar" a la sècuencia de línea germinal mediante, por ejemplo, mutagénesis sitio- dirigida o mutagénesis mediada por PCR.

Otro tipo de modificación de marco involucra mutar uno o más residuos dentro de la región de marco, o aún dentro de una o más regiones CDR, para remover epítopos de células T para reducir así la inmunogenicidad potencial del anticuerpo. Este enfoque también se conoce como "desinmunización" y se describe en detalle adicional en la Publicación de Patente Americana No. 20030153043 por Carr.

Además de las modificaciones hechas dentro de las regiones de marco o CDR, los anticuerpos de la divulgación se pueden modificar para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tales como vida media sérica, unión de complemento, unión de receptores Fc, y/o citotoxicidad celular dependiente de antígenos. Además, un anticuerpo de la divulgación puede ser modificado de manera química *{ej.,* una o más fracciones químicas pueden ser fijadas al anticuerpo) o ser modificado para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Cada uno de estos aspectos es descrito en detalle adicional más adelante. La numeración de residuos en la región Fc es aquella del índice EU de Kabat.

En un caso, la región de bisagra de CHI es modificada tal que el número de residuos de cisteina en la región de bisagra es alterado, *ej.,* aumentado o disminuido. Este enfoque es descrito adicionalmente en la Patente Americana No. 5,677,425 de Bodmer . El número de residuos de cisteina en la región de bisagra de CHI es alterado para, por ejemplo, facilitar el ensamble de las cadenas livianas y pesadas o aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

En otro caso, la región de bisagra Fc de un anticuerpo es mutada para disminuir la vida media biológica del anticuerpo. Más específicamente, una o más mutaciones aminoácidas son introducidas en la región de interfase de dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra Fc tal que el anticuerpo tiene unión deteriorada de *Staphylococcyl* proteína A (SpA) relativa a unión SpA de de dominio de bisagra Fc nativa. Este enfoque es descrito en detalle adicional en la Patente Americana No. 6,165,745 de Ward.

En otro caso, el anticuerpo es modificado para aumentar su vida media biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F, como se describió en la Patente Americana No. 6.277.375 de Ward. Alternativamente, para aumentar la vida media biológica, el anticuerpo se puede alterar dentro de la región CH1 o CL región para contener un epítopo de unión de receptores salvajes tomado a partir de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de un IgG, como se describió en la Patente Americana No. 5,869,046 y 6,121,022 de Presta .

En aún otros casos, la región Fc es alterada al reemplazar al menos un residuo aminoácido por un residuo aminoácido diferente para alterar las funciones efectoras(s) del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 se pueden reemplazar con a residuo aminoácido diferente tal que el

anticuerpo tenga una afinidad alterada para un ligando efector pero retenga la capacidad de unión de antígenos del anticuerpo precursor. El ligando efector al cual se altera la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 de complemento. Este enfoque es descrito en detalle adicional en las Patentes Americanas No. 5,624,821 y 5,648,260, ambas de Winter.

En otro caso, uno o más aminoácidos seleccionados a partir de residuos aminoácidos 329, 331 y 322 se pueden reemplazar por un residuo aminoácido diferente tal que el anticuerpo tenga unión Clq alterada y/o citotoxicidad dependiente de complemento reducida o abolida (CDC). Este enfoque es descrito en detalle adicional en la Patente Americana No. 6,194,551 de Idusogie.

En otro ejemplo, uno o más residuos aminoácidos dentro de las posiciones aminoácidas 231 y 239 son alterados para alterar así la capacidad del anticuerpo para fijar el complemento. Este enfoque es descrito adicionalmente en la Publicación PCT WO 94/29351 de Bodmer.

En aún otro ejemplo, la región Fc es modificada para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o para aumentar la afinidad del anticuerpo para un receptor Feγ al modificar uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Este enfoque es descrito adicionalmente en la Publicación PCT WO 00/42072 de Presta. Además, los sitios de unión sobre IgGl humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn han sido mapeados y se han descrito variantes con unión mejorada (ver Shields, R.L. (2001) J. *Biol. Chem.* 276:6591-6604). Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 fueron mostradas por mejorar la unión a FcRγIII. Adicionalmente, los siguientes mutantes de combinación se mostraron por mejorar la unión FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A. Por ejemplo, el anticuerpo 22B5/DLE descrito en la presente utiliza la subclase IgG1 del isotipo IgG, pero tiene incorporadas las siguientes mutaciones (en comparación con la subclase IgG1 tipo silvestre a través de mutagénesis sitio- dirigida: S247D; A338L; y I340E. De manera similar, como se describió en detalle más adelante, las mutaciones S247D, A338L, y I340E se han introducido en los anticuerpos monoclonales 24C7, 1D9 y 2D2. Como se describió adicionalmente en los Ejemplos, tales mutaciones pueden aumentar la afinidad del anticuerpo con receptores Fcγ y así aumentar sus funciones efectoras. Así, la divulgación

proporciona un anticuerpo que comprende al menos una mutación en la región Fc y tiene respuesta ADCC detectablemente mayor que un anticuerpo de otra manera idéntico que no comprende la al menos una mutación.

En aún otro ejemplo, la glicosilación de un anticuerpo es modificada. Por ejemplo, se puede preparar un anticuerpo aglicosilado *(es decir,* el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación se puede alterar para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo para antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden realizar, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia de anticuerpos. Por ejemplo, se pueden realizar una o más sustituciones aminoácidas que resulten en eliminación de uno o más sitios de glicosilación de marco de regiones variables para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Tal aglicosilación may aumentar la afinidad del anticuerpo para antígenos. Tal enfoque es descrito en detalle adicional en las Patentes Americanas No. 5,714,350 y 6,350,861 de Co .

Adicionalmente o alternativamente, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo de glicosilación alterada, tales como un anticuerpo hipofucosilado con cantidades reducidas de residuos de fucosil o un anticuerpo con estructuras GlcNac bisecadas aumentadas. Tales modelos de glicosilación alterados han sido demostrados para aumentar la capacidad ADCC de los anticuerpos. Tales modificaciones de carbohidratos se pueden realizar, por ejemplo, al expresar el anticuerpo en una célula hospedera con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada han sido descritas en el estado de la técnica y se pueden utilizar como células hospederas en las cuales expresar anticuerpos recombinantes de la divulgación para producir así un anticuerpo con glicosilación alterada. Por ejemplo, las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen del gen de fucosiltransferasa, FUT8 (alpha (1,6) fucosiltransferasa), tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 carecen de fucosa sobre sus carbohidratos. Las líneas celulares Ms704, Ms705, y Ms709 FUT8 fueron creadas por la rotura dirigida del gen FUT8 en células CHO/DG44 utilizando dos vectores de reemplazo (ver Publicación de Patente Americana No. 20040110704 de Yamane y Yamane-Ohnuki . (2004) *Biotechnol Bioeng* 87:614-22). Como otro ejemplo, EP 1,176,195 por Hanai describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente roto, el cual codifica una fucosil transferasa, tal que los anticuerpos expresados en tal línea celular exhiban hipofucosilación reduciendo o eliminando la enzima relacionada con el enlace alfa 1,6. Hanai también describe líneas celulares las cuales tienen una actividad enzimática baja para agregar

fucosa a la N-acetilglucosamina que se fija a la región Fc del anticuerpo o no tiene la actividad enzimática, por ejemplo la línea celular de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). La Publicación PCT WO 03/035835 de Presta describe una línea celular CHO variante, células Lecl3, con capacidad reducida para fijar fucosa a carbohidratos Asn(297)-enlazados, resultando también en hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedera (ver también Shields, R.L. . (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 de Umana describe líneas celulares modificadas para expresar glicosil transferasas modificadoras de glicoproteinas *(ej.,* beta(1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiban estructuras GlcNac bisecadas aumentadas las cuales resultan en actividad ADCC aumentada de los anticuerpos (ver también Umana . (1999) *Nat. Biotech.* 17:176-180). Alternativamente, los residuos de fucosa del anticuerpo pueden ser cortados utilizando una enzima de fucosidasa. Por ejemplo, la alfa-L-fucosidasa de fucosidasa retira los residuos de fucosil desde los anticuerpos (Tarentino, A.L. . (1975) *Biochem.* 14:551623).

Otra modificación de los anticuerpos en la presente que es contemplada por la divulgación es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar, por ejemplo, para aumentar la vida media biológica *(ej.,* suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento del mismo, típicamente se hace reaccionar con glicol de polietileno (PEG), tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG, bajo condiciones en las cuales uno o más grupos PEG resultan fijados al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Típicamente, la pegilación se realiza por medio de una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula PEG reactiva (o un polímero reactivo análogo soluble en agua). Como se utiliza en la presente, el término "glicol de polietileno" tiene el propósito de incluir cualquiera de las formas PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tales como glicol de polimetileno de mono (C1-C10) alcoxilo o ariloxilo o glicol de polietileno-maleimida. En ciertos casos, el anticuerpo a ser pegilado es un anticuerpo aglicosilado. Métodos para pegilar proteínas son conocidos en el estado de la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la divulgación. Ver por ejemplo, EP 0 154 316 de Nishimura . y EP 0 401 384 de Ishikawa.

Métodos de Modificación Genética de Anticuerpos

Como se discutió anteriormente, los anticuerpos anti-α5β1con secuencias VH y VL divulgados en la presente se pueden utilizar para crear nuevos anticuerpos anti-α5β1 mediante la modificación de las secuencias VH y/o VL, o las regiones constantes fijadas a las mismas. Así, en otro aspecto de la divulgación, las características estructurales de un anticuerpo anti-α5β1 de la divulgación, *ej.* 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2 se utilizan para crear anticuerpos anti-α5β1 estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la divulgación, tal como unión a α5β1 humano. Por ejemplo, una o más regiones CDR de 22B5, 24C7, 1D9, o 2D2, o mutaciones de las mismas, se pueden combinar de manera recombinante con regiones de marco conocidas y/o otras CDRs para crear anticuerpos anti- α5β1 adicionales modificados de manera recombinante de la divulgación, como se discutió anteriormente. Otros tipos de modificaciones incluyen aquellas descritas en la sección anterior. El material de inicio para el método de modificación genética es una o más de las secuencias V_H y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado, no es necesario preparar actualmente *(es decir,* expresar como una proteína) un anticuerpo con una o más de las secuencias VH y/o V_L proporcionadas en la presente, o una o más regiones CDR del mismo. Preferiblemente, la información contenida en la(s) secuencia(s) puede ser utilizada como el material de inicio para crear una secuencia de "segunda generación" derivada a partir de la(s) secuencia(s) original y luego la secuencia de "segunda generación" es preparada y expresada como una proteína.

[Por consiguiente, en otro aspecto, la divulgación proporciona un método para preparar un anticuerpo anti-α5β1 comprendiendo:

(a) proporcionar: (i) una secuencia de anticuerpos de región variable de cadena pesada comprendiendo una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 1, 13, 23, y 33, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 2, 14, 24, y 34, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 3, 15, 25, y 35; y/o (ii) una secuencia de anticuerpos de regiones variables de cadena liviana comprendiendo una secuencia CDR1 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 4, 16, 26, y 36, una secuencia CDR2 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 5, 17, 27, y 37, y/o una secuencia CDR3 seleccionada del grupo que consta de SEQ ID NOs: 6, 18, 28, y 38;

(b) alterar al menos un residuo aminoácido dentro de la secuencia de anticuerpos de regiones variables de cadena pesada y/o la secuencia de anticuerpos de regiones variables de cadena liviana para crear al menos una secuencia de anticuerpos alterada; y

(c) expresar la secuencia alterada de anticuerpos como una proteína.

Se pueden utilizar técnicas estándares de biología molecular para preparar y expresar la secuencia de anticuerpos alterados.

Preferiblemente, el anticuerpo codificado por las secuencias de anticuerpos alterados es uno que retenga una, algunas o todas las propiedades funcionales del anticuerpo anti-α5β1 descrito en la presente, cuyas propiedades funcionales incluyen, pero no se limitan a:

(i) fijarse a α5β1 humano con una K_D de 1×10^{-7} M o menos;

(ii) ser capaz de inducir ADCC.

Las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados se pueden evaluar utilizando ensayos estándares disponibles en el estado de la técnica y/o descritos en la presente, tales como aquellos divulgados en los Ejemplos *(ej.,* citometría de flujo, ensayos de unión).

En ciertos aspectos de los métodos de modificación genética de anticuerpos de la divulgación, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente o selectivamente junto con toda o parte de una secuencia codificadora de anticuerpos anti-α5β1 y los anticuerpos anti-α5β1 modificados resultantes se pueden tamizar para actividad fijadora y/o otras propiedades funcionales como se describió en la presente. Métodos de mutación se han descrito en el estado de la técnica. Por ejemplo, la Publicación PCT WO 02/092780 de Short describe métodos para crear y tamizar mutaciones de anticuerpos utilizando mutagénesis de saturación, ensamble de ligación sintética, o una combinación de los mismos. Alternativamente, la Publicación PCT WO 03/074679 de Lazar describe métodos de utilización de métodos de tamizaje computacional para optimizar las propiedades fisioquímicas de los anticuerpos.

Moléculas de ácido nucleico que codifican Anticuerpos de la divulgación

Otro aspecto de la divulgación se refiere a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la divulgación. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico es "aislado" o "hecho sustancialmente puro" cuando se purifica lejos de otros componentes celulares u otros contaminantes, *ej.,* otros ácidos nucleicos o proteínas celulares,

mediante cualquiera de las técnicas apropiadas, incluyendo tratamiento alcalino/SDS, bandeado CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros. *Ver,* F. Ausubel, ed. (1987) Protocolos Actuales en Biología Molecular, Greene Publishing y Wiley Interscience, New York. Un ácido nucleico de la divulgación puede ser, por ejemplo, DNA o ARN y puede o no contener secuencias intrónicas. Típicamente, el ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la divulgación se pueden obtener utilizando cualquiera de las técnicas apropiadas de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (*ej.,* hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portando genes de inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente a continuación), los ADNc's que codifican las cadenas livianas y pesadas del anticuerpo hechos por el hibridoma se puede obtener mediante técnicas de amplificación PCR o clonación de ADNc. Para anticuerpos obtenidos a partir de una librería de genes de inmunoglobulina (*ej.,* utilizando técnicas de expresión en fago), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se puede recuperar desde la librería.

Las moléculas de ácido nucleico de la divulgación incluyen, por ejemplo, aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L del anticuerpo monoclonal 22B5. La Secuencia de ADN que codifica la secuencia V_H de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 11. La Secuencia de ADN que codifica la secuencia V_L de 22B5 se muestra en SEQ ID NO: 12. Otras moléculas ilustrativas de ácido nucleico divulgadas en la presente son aquellas que codifican las secuencias V_H y V_L de los anticuerpos monoclonales 24C7, 1D9, y 2D2. La Secuencia de ADN que codifica la secuencia V_H de 24C7 se muestra en SEQ ID NO: 21. La Secuencia de ADN que codifican la secuencia V_L de 24C7 se muestra en SEQ ID NO: 22. La Secuencia de ADN que codifican la secuencia VH de 1D9 se muestra en SEQ ID NO: 31. La Secuencia de ADN que codifican la secuencia VL de 1D9 se muestra en SEQ ID NO: 32. La Secuencia de ADN que codifican la secuencia VH de 2D2 se muestra en SEQ ID NO: 41. La Secuencia de ADN que codifican la secuencia VL de 2D2 se muestra en SEQ ID NO: 42.

Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L, estos fragmentos de ADN se pueden manipular adicionalmente mediante cualquier técnica apropiada de ADN recombinante, por ejemplo para convertir los genes de regiones variables a genes de cadenas de anticuerpos de longitud completa, a genes de fragmentos Fab o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de AND que codifica V_L- o V_H- está operativamente ligado a otro Fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo

o un enlazador flexible. El término "operativamente enlazado", como se utiliza en este contexto, significa que los dos fragmentos de ADN están unidos tal que las secuencias aminoácidas codificadas por los dos fragmentos de ADN permanezcan sin cambio de marco de lectura.

El ADN aislado que codifica la región VH se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazando operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CHI, CH2 y CH3). Las secuencias de genes humanos de regiones constantes de cadena pesada son conocidas en el estado de la técnica (ver *ej.,* Kabat, E. A., el al. (1991) Secuencias de Proteínas de Interés inmunológico, Quinta Edición, Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242) y Fragmentos de ADN incluyendo estas regiones se puede obtener mediante amplificación PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgGl, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferiblemente es una región constante IgGl o IgG4. La secuencia de región constante IgG l puede ser cualquiera de los diferentes alelos o alotipos conocidos por ocurrir entre diferentes individuos, tales como Gm(l), Gm(2), Gm(3), y Gm(17). Estos alotipos representan sustitución aminoácida de ocurrencia natural en las regiones constantes IgGl. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede estar operativamente ligado a otra molécula de ADN que codifica solamente la región constante CH1 de cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de cadena liviana de longitud completa (así como también un gen de cadena liviana Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena liviana, CL. Las secuencias de genes humanos de regiones constantes de cadena liviana son conocidas en el estado de la técnica (ver *ej.,* Kabat, E. A.,. (1991) Secuencias de Proteínas de Interés inmunológico, Quinta Edición, Departamento Americano de Salud y Servicios Humanos, Publicación NIH No. 91-3242) y los fragmentos de ADN que incluyen estas regiones se pueden obtener mediante amplificación PCR estándar. La región constante de cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H- y V_L son operativamente ligados a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *ej.,* que codifica la secuencia aminoácida $(Gly4 –Serb)_3$, tal que las secuencias VH y VL se pueden expresar como una proteína de cadena simple continua, con las regiones V_L y VH unidas por el enlazador

flexible (ver *ej.,* Bird . (1988) *Science* 242:423-426; Huston . (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty ., (1990) *Nature* 348:552-554).

Producción de Anticuerpos monoclonales de la divulgación

Anticuerpos monoclonales (mAbs) de la presente divulgación puede ser producidos mediante una variedad de técnicas, incluyendo metodología convencional de anticuerpos monoclonales *ej.,* la técnica de hibridización celular somática estándar de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. Otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales también se pueden emplear, *ej.,* transformación oncogénica o viral de linfocitos B.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas es el sistema murino. La producción de hibridomas en el ratón es un procedimiento bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para aislar esplenocitos inmunizados para fusión, son conocidos en el estado de la técnica. Los socios de fusión *(ej.,* células de mieloma murinas) y procedimientos de fusión también son conocidos.

Los anticuerpos quiméricos o humanizados de la presente divulgación se pueden preparar con base en la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado como se describió anteriormente. El ADN que codifica las inmunoglobulinas de cadena pesada y liviana se puede obtener a partir del hibridoma murino de interés y modificar para contener secuencias de inmunoglobulina no-murinas *(ej.,* humanas) utilizando técnicas apropiadas de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas pueden ser enlazadas a regiones humanas constantes utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica (ver *ej.,* Patente Americana No. 4,816,567 de Cabilly). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano utilizando métodos conocidos en el estado de la técnica (ver *ej.,* Patente Americana No. 5,225,539 de Winter, y Patentes Americanas No. 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762 y 6,180,370 de Queen *).*

En algunos casos, los anticuerpos de la divulgación son anticuerpos monoclonales humanos. Tales anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra $\alpha 5\beta 1$ se pueden generar utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos portando partes del sistema humano inmune en cambio del sistema murino. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos en la presente como HuMAb Mouse® y KM Mouse®, respectivamente, y son colectivamente conocidos en la presente como "ratones Ig humanos".

El HuMAb Mouse® (Medarex®, Inc.) contiene minisitios de genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias sin ordenar de inmunoglobulina humana de cadena pesada (μ y γ) y liviana κ, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los sitios de cadena endógena κ y μ (ver *ej.,* Lonberg, (1994) Nature 368(6474): 856-859). Por consiguiente, los ratones exhiben expresión reducida de IgM o κ de ratón , y en respuesta a inmunización, los transgenes humanos introducidos de cadena pesada y liviana experimentan conmutación de clase y mutación somática para generar IgGK monoclonal humano de alta afinida (Lonberg, N. . (1994), *supra;* reseñado en Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13.: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Preparación y uso del HuMAb Ratón®, y las modificaciones genómicas llevadas por tales ratones, se describe adicionalmente en Taylor, L. . (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. *el al.* (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon . (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi . (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. . (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon . (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. . (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. . (1996) *Nature Biotechnology* 14*:* 845-851. Ver además, Patentes Americanas No. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; y 5,770,429; todas de Lonberg y Kay; Patente Americana No. 5,545,807 de Surani *;* Publicaciones PCT No. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962, todas Lonberg y Kay; y Publicación PCT No. WO 01/14424 de Korman.

En otro caso, los anticuerpos humanos de la divulgación pueden cultivarse utilizando un ratón que lleva secuencias de inmunoglobulina humana sobre transgenes y transcromosomas, tales como un ratón que lleva un transgen humano de cadena pesada y un transcromosoma humano de cadena liviana. Tales ratones, citados en la presente como "KM mice™", se describen en detalle en la Publicación PCT WO 02/43478 de Ishida.

Aún además, sistemas animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en el estado de la técnica y se pueden utilizar para cultivar anticuerpos anti-α5β1 de la divulgación. Por ejemplo, un sistema transgénico alternativo conocido como el Xenomouse (Abgenix, Inc.) se puede utilizar; tales ratones se describen en, por ejemplo, Patentes Americanas No. 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584 y 6,162,963 de Kucherlapati .

Además, sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en el estado de la técnica y se pueden utilizar para cultivar anticuerpos anti-α5β1 de la divulgación. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones que portan ambos un transcromosoma humano de cadena pesada y un transcromosoma humano de cadena liviana, conocidos como "ratones TC"; tal ratones se describen en Tomizuka . (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, vacas portando transcromosomas humanos de cadena pesada y liviana se han descrito en el estado de la técnica (Kuroiwa . (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden utilizar para cultivar anticuerpos anti-α5β1 de la divulgación.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar utilizando métodos de expresión en fago para tamizar librerías de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de expresión en fago para aislar anticuerpos humanos son establecidos en el estado de la técnica. Ver por ejemplo: Patentes Americanas No. 5,223,409; 5,403,484; y 5,571,698 de Ladner *:* Patentes Americanas No. 5,427,908 y 5,580,717 de Dower *;* Patentes Americanas No. 5,969,108 y 6,172,197 de McCafferty *;* y Patentes Americanas No. 5,885,793; 6,521,404; 6,544,731; 6,555,313; 6,582,915 y 6,593,081 de Griffiths .

Los anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación también se pueden preparar utilizando ratones SCID en los cuales las células inmunes humanas han sido reconstituidas tal que una respuesta de anticuerpo humano puede ser generada ante inmunización. Tales ratones se describen en, por ejemplo, las Patentes Americanas No. 5,476,996 y 5,698,767 de Wilson.

Inmunización de Ratones Ig Humanos

Cuando se utilizan ratones Ig humanos para cultivar los anticuerpos humanos de la divulgación, tales ratones se pueden inmunizar con una preparación purificada o enriquecida de antígeno α5β1 y/o recombinante α5β1, o una proteína de fusión α5β1, como lo describió Lonberg, N. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859: Fishwild, D. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851; y Publicación PCT WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad a la primera infusión. Por ejemplo, se puede utilizar una preparación purificada o recombinante (5-50 μg) de antígeno α5β1 para inmunizar los ratones Ig humanos intraperitonealmente. Además, se pueden utilizar fragmentos de polipéptidos de las proteínas relevantes, ej., α5 y/o β1, para inmunizar los ratones. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos

se pueden conjugar a una molécula portadora para aumentar su inmunogenicidad. Tales moléculas portadoras son bien conocidas en el estado de la técnica, e incluyen hemocianina extraída del molusco lapa californiana, albúmina de suero bovino, tiroglobulina, toxoide de difteria, y toxoide de tétanos, entre otros.

Procedimientos detallados para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos a α5β1 se describen en el Ejemplo 1 más adelante. La experiencia acumulada con varios antígenos ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente intraperitonealmente (IP) con antígeno en adyuvante completo Freund, seguido por inmunizaciones IP semana de por medio (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto Freund. Sin embargo, adyuvantes diferentes a Freund también son efectivos. Además, las células enteras en ausencia de adyuvante son encontradas como altamente inmunogénicas. La respuesta inmune se puede monitorear sobre el curso del protocolo de inmunización con muestras de plasma obtenidas mediante sangrados retroorbitales. El plasma se puede tamizar mediante ELISA (como se describe más adelante), y ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina anti-α5β1 humana se pueden utilizar para fusiones. Los ratones se pueden reforzar de manera intravenosa con antígeno 3 días antes del sacrificio y retiro del bazo. Se espera que se necesiten realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones son típicamente inmunizados para cada antígeno. Usualmente se utilizan ambas cepas HCo7 y HCol2. Además, tanto el transgen HCo7 como FICol2 se pueden cruzarse juntos en un único ratón y así tener dos transgenes humanos de cadena pesada diferentes (HCo7/HCol2). Alternativamente o adicionalmente, la cepa KM mouse® puede utilizarse, como se describió en el Ejemplo 1.

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos Monoclonales Humanos

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la divulgación, esplenocitos y/o células linfáticas de ratones inmunizados pueden aislarse y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden tamizarse para la producción de anticuerpos específicos a antígenos. Por ejemplo, suspensiones celulares simples de linfocitos esplénicos a partir de ratones inmunizados pueden fusionarse a un sexto del número de células de mieloma murinas no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células son sembradas en placas a aproximadamente 2 x 10^3 en placas de microtítulos de fondo plano, seguido por una

incubación de dos semanas en medio selectivo conteniendo 20% Suero Fetalclone, 18% "653" medio acondicionado, 5% origen (IGEN), 4 mM L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 5mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml penicilina, 50 mg/ml estreptomicina, 50 mg/ml gentamicina y IX HAT (Sigma; la HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, células pueden cultivarse en el medio en el cual la HAT es reemplazada con HT. Luego se pueden tamizar pozos individuales mediante ELISA para anticuerpos monoclonales humanos IgM e IgG. Una vez ocurre el crecimiento extensivo de hibridoma, el medio se puede observar usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden sembrar nuevamente en placas, tamizar nuevamente, y si aún son positivos para IgG humano, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar al menos dos veces mediante dilución limitante. Luego pueden cultivarse subclones estables *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.). IgG eluido se puede revisar mediante electroforesis en gel y cromatografía liquida de alto desempeño para asegurar pureza. La solución buffer se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar mediante OD280 utilizando el coeficiente de extinción 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden ser alicuotados y almacenados a -80°C.

Generación de Transfectomas que Producen Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la divulgación también se pueden producir en un transfectoma celular hospedero utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como es bien conocido en el estado de la técnica (*ej.,* Morrison, S. (1985) Science 229:1202).

Por ejemplo, para expresar los anticuerpos, o fragmentos de anticuerpos de los mismos, DNAs que codifican cadenas livianas o pesadas de longitud parcial o completa, se puede obtener mediante técnicas estándares de biología molecular *(ej.,* amplificación PCR o clonación de ADNc utilizando un hibridoma o fago que exprese el anticuerpo de interés) y los DNAs se pueden insertar en vectores de expresión tal que los genes estén operativamente ligados a secuencias de

control de transcripción y traducción. En este contexto, el término "operativamente enlazado" significa que un gen de anticuerpo está ligado en un vector tal que las secuencias de control de transcripción y traducción dentro del vector cumplen su función de regular la trascripción y traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y secuencias de control de expresión son elegidos para ser compatibles con la célula hospedera de expresión utilizada. El gen de cadena liviana de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en un vector separado, más típicamente, ambos genes son insertados en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpos son insertados en el vector de expresión mediante cualquier método apropiado *(ej.,* ligación de sitios de restricción complementarios sobre el fragmento y vector de genes de anticuerpo, o ligación de extremo despuntado si no hay sitios de restricción presentes). Las regiones variables de cadena pesada y liviana de los anticuerpos descritos en la presente se pueden utilizar para crear genes de anticuerpos de longitud completa de cualquier isotipo y subclase de anticuerpo al insertarlos en vectores de expresión que codifiquen ya regiones constantes de cadena pesada y de cadena liviana del isotipo y subclase deseados tal que el segmento VH esté operativamente ligado al segmento CH dentro del vector y el segmento VK esté operativamente ligado al segmento CL dentro del vector. Adicionalmente o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido señal que facilite secreción de la cadena de anticuerpos desde una célula hospedera. El gen de cadena de anticuerpos se puede clonar en el vector tal que el péptido señal esté enlazado sin cambio de marco de lectura al extremo amino del gen de la cadena de anticuerpos. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo *(es decir,* un péptido señal a partir de una proteína que no sea inmunoglobulina).

Además de los genes de cadena de anticuerpos, los vectores de expresión recombinante de la divulgación típicamente llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadenas de anticuerpos en una célula hospedera. El término "secuencia reguladora" incluye promotores, mejoradores y otros elementos de control de expresión *(ej.,* señales de poliadenilación) que controlan la trascripción o traducción de los genes de cadenas de anticuerpos. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (Tecnología de Expresión de Genes. Métodos en Enzimología 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)). Aquellos con experiencia en el estado de la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de secuencias reguladoras, puede depender de factores tales

como la elección de la célula hospedera a ser transformada, el nivel de expresión de la proteína deseada, *etc.* Secuencias reguladoras preferidas para expresión de células hospederas mamíferas incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteínas en células mamíferas, tales como promotores y/o mejoradores derivados a partir de citomegalovirus (CMV), Virus Simiano40 (SV40), adenovirus, *(ej.,* el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP) y polioma. Alternativamente, se pueden utilizar secuencias reguladoras no virales, tales como el promotor de ubiquitina o promotor de β-globina. Aún adicionalmente, los elementos reguladores compuestos de secuencias de diferentes fuentes, tal como el sistema promotor SR, el cual contiene secuencias desde el promotor temprano SV40 y la repetición terminal larga de virus de leucemia humana de células T tipo 1 (Takebe, Y.. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:466-472).

Además de los genes de cadena de anticuerpos y secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinante de la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células hospederas *(ej.,* orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de células hospederas en las cuales el vector se ha introducido (ver, *ej.,* Patente Americana. No. 4,399,216, 4,634,665 y 5,179,017, todas de por Axel .*).* Por ejemplo, típicamente el gen marcador seleccionable confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, sobre una célula hospedera en la cual el vector se ha introducido. Los genes de marcadores seleccionables incluyen el gen de reductasa de dihidrofolato (DHFR) (para utilizar en células hospederas dhfr- con selección/amplificación de metotrexato) y el gen neo (para selección G418).

Para expresión de la cadenas livianas y pesadas, el vector de expresión que codifica las cadenas pesadas y livianas es transfectado a una célula hospedera mediante cualquiera de las técnicas apropiadas. La diferentes formas del término "transfección" incluyen una amplia variedad de técnicas comúnmente utilizadas para la introducción de ADN exógeno en una célula hospedera procariótica o eucariótica, *ej.,* electroporación, precipitación de fosfato de calcio, transfección DEAE-dextrana y similares. Aunque es posible expresar los anticuerpos de la divulgación ya sea en células hospederas procarióticas o eucarióticas, la expresión de anticuerpos en células eucarióticas, y típicamente células hospederas mamíferas, es más típica.

Las células hospederas mamíferas para expresar los anticuerpos recombinantes de la divulgación incluyen, por ejemplo, células de Ovario de Hamster Chino (CHO) (incluyendo

células dhfr- CHO, descritas en Urlaub y Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220, utilizadas con un marcador seleccionable DHFR, *ej.,* como se describió en R. J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 759:601-621), células de mieloma NS0, células COS células y células Sp2. En particular, para utilizar con mieloma NS0 o células CHO, otro sistema de expresión es el sistema de expresión de genes GS (glutamina sintasa) divulgado en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338,841. Cuando se introducen vectores de expresión recombinante que codifican genes de anticuerpos en las células hospederas mamíferas, los anticuerpos son producidos al cultivar las células hospederas durante un periodo de tiempo suficiente para permitir expresión del anticuerpo en las células hospederas o secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el cual las células hospederas son cultivadas. Los anticuerpos se pueden recuperar desde el medio de cultivo utilizando cualquiera de los métodos de purificación de proteínas apropiados.

Caracterización de Unión de Anticuerpos a Antígeno

Los anticuerpos, o porciones fijadoras de antígenos de los mismos, de la divulgación se pueden probar para unión a α5β1, por ejemplo, mediante ELISA estándar. Brevemente, las placas de microtítulos son recubiertas con α5β1 purificado a 0.25 μg/ml en PBS, y luego bloqueadas con albúmina de suero bovino al 5% en PBS. Diluciones de anticuerpo *(ej.,* diluciones de plasma de ratones α5β1- inmunizados) son agregadas a cada pozo e incubadas durante 1-2 horas a 37°C. Las placas son lavadas con PBS/Tween y luego incubadas con reactivo secundario *(ej.,* para anticuerpos humanos, un reactivo policlonal humano Fc- específico anti-IgG de cabra) conjugado a fosfatasa alcalina durante 1 hora a 37°C. Después de lavar, las placas son desarrolladas con sustrato pNPP (1 mg/ml), y analizadas a OD de 405-650. Preferiblemente, los ratones que desarrollan los títulos más altos serán utilizados para las fusiones.

También se puede utilizar un ensayo ELISA como se describió anteriormente para seleccionar hibridomas que muestren reactividad positiva con inmunógeno α5β1. Los hibridomas que se fijan con gran afinidad a α5β1 son subclonados y caracterizados adicionalmente. Se puede elegir un clon desde cada hibridoma, que retenga la reactividad de las células precursoras (mediante ELISA), para hacer un banco celular de 5 a 10 ampolletas almacenado a -140°C, y para purificación de anticuerpos.

Para purificar anticuerpos anti-α5β1, los hibridomas seleccionados se pueden cultivar en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los

sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de cromatografía de afinidad con proteína A-sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). IgG eluido se puede revisar mediante electroforesis en gel y cromatografía liquida de alto desempeño para asegurar pureza. La solución buffer se puede intercambiar en PBS, y la concentración se puede determinar por OD_{280} utilizando el coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales se pueden alicuotar y almacenar a -80°C.

Además, el epítopo fijado por el anticuerpo se puede caracterizar mediante métodos estándares conocidos en el estado de la técnica. Tales métodos incluyen producir un arreglo de fragmentos peptídicos traslapantes de α5 y/o β1 y evaluar la unión del anticuerpo a los diferentes fragmentos. Alternativamente, mutaciones, *ej.,* mutagénesis por barrido de alanina donde cada aminoácido es reemplazado por un residuo de alanina, se pueden introducir en el péptido α5 y/o β1 y la unión del anticuerpo al péptido mutante se puede comparar con unión del anticuerpo a la proteína tipo silvestre, e identificar así sitios donde las mutaciones afecten la unión. *Ver, ej.,* Cunningham ., (1989) *Science* 244:1081-1085.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales seleccionados anti-α5β1 o porción fijadora de antígenos de los mismos se fijan a epítopos únicos, cada anticuerpo se puede biotinilar utilizando reactivos comercialmente disponibles (Pierce, Rockford, IL). Se pueden realizar estudios de competencia utilizando anticuerpos monoclonales sin rotular y anticuerpos monoclonales biotinilados utilizando placas ELISA recubiertas con α5β1 como se describió anteriormente. La unión mAb biotinilada se puede detectar con una sonda de strep-avidina-fosfatasa alcalina.

Para determinar el isotipo de anticuerpos puros, se pueden realizar ELISAs de isotipos utilizando reactivos específicos para anticuerpos de un isotipo particular. Por ejemplo, para determinar el isotipo de un anticuerpo humano monoclonal, los pozos de placas de microtítulos se pueden recubrir con 1 μg/ml de inmunoglobulina anti-humana durante la noche a 4°C. Después de bloquear con 1% BSA, las placas se hacen reaccionar con 1 μg/ml o menos de anticuerpos monoclonales de prueba o controles de isotipos purificados, a temperatura ambiente durante una a dos horas. Luego los pozos se pueden hacer reaccionar con sondas conjugadas de fosfatasa alcalina específicas para IgG1 o IgM humanas. Las placas son desarrolladas y analizadas como se describió anteriormente.

IgGs humanos anti-α5β1se puede además probar para reactividad con antígeno α5β1 mediante Western blotting. Brevemente, α5β1 se puede preparar y someter a electroforesis en gel

de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio. Después de electroforesis, los antígenos separados son transferidos a membranas de nitrocelulosa, bloqueados con suero de ternero fetal al 10%, y sondeados con los anticuerpos monoclonales a ser probados. La unión de IgG humano se puede detectar utilizando fosfatasa alcalina anti-IgG humano y desarrollada con tabletas de sustrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.).

Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza un anticuerpo anti-α5β1, o un fragmento del mismo, conjugado a una fracción terapéutica, tal como una citotoxina, un fármaco *(ej.,* un inmunosupresor) o una radiotoxina. Tales conjugados son conocidos en la presente como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas son conocidos como "inmunotoxinas." Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial a las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antraceno diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos también incluyen, por ejemplo, antimetabolitos *(ej.,* metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, decarbazina de 5-fluorouracilo), agentes alquilantes *(ej.,* mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalan, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas *(ej.,* daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos *(ej.,* dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), y agentes anti-mitóticos *(ej.,* vincristina y vinblastina).

Otros ejemplos de citotoxinas terapéuticas que se pueden conjugar a un anticuerpo, o porciones fijadoras de antígenos del mismo, de la divulgación incluyen duocarmicinas, calicheamicinas, maitansinas y auristatinas, y derivados de las mismas. Un ejemplo de un conjugado de anticuerpo de calicheamicina es comercialmente disponibles (Mylotarg™; Wyeth-Ayerst).

Las citoxinas se pueden conjugar a anticuerpos de la divulgación o porciones fijadoras de antígenos de los mismos utilizando varias tecnologías de enlazadores. Ejemplos de tipos de

enlazadores que se han utilizado para conjugar una citotoxina a un anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, hidrazonas, tioéteres, ésteres, disulfuros y enlazadores conteniendo péptidos. Se puede elegir un enlazador que sea, por ejemplo, susceptible a escisión por pH bajo dentro del compartimiento lisosomal o susceptible a escisión por proteasas, tal como proteasas preferiblemente expresadas en tejido tumoral tales como catepsinas *(ej.,* catepsinas B, C, D).

Para discusión adicional de tipos de citotoxinas, enlazadores y métodos para conjugar agentes terapéuticos a anticuerpos, ver también Saito, G. . (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. *el al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. y Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. y Springer, C.J. ***(2m)*** *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Los anticuerpos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la presente divulgación también se pueden conjugar a un isótopo radioactivo para generar radiofarmacéuticos citotóxicos, también conocidos como radioinmunoconjugados. Ejemplos de isótopos radioactivos que se pueden conjugar a anticuerpos para utilizar de manera diagnóstica o terapéutica incluyen, pero no se limitan a, yodo^{131}, indio^{111}, itrio^{90} y lutenio^{177}. Métodos para preparar radioinmunoconjugados son establecidos en el estado de la técnica. Ejemplos de radioinmunoconjugados son comercialmente disponibles, incluyendo Zevalin™ (IDEC Pharmaceuticals) y Bexxar™ (Corixa Pharmaceuticals), y se pueden utilizar métodos similares para preparar radioinmunoconjugados utilizando los anticuerpos de la divulgación.

Los conjugados de anticuerpos de la divulgación se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, y la fracción farmacéutica no se considera limitada a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción farmacéutica puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o fragmento activo de la misma, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomona, o toxina de difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferona-γ; o, modificadores de respuesta biológica tales como, por ejemplo, linfocinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), u otros factores de crecimiento.

Se conocen técnicas para conjugar tal fracción terapéutica a anticuerpos, ver, *ej.*, Arnon, *"Monoclonal* Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld *el al.* (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom, "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe *et al,* "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982).

Moléculas biespecíficas

En otro aspecto, la presente divulgación caracteriza moléculas biespecíficas que comprenden un anticuerpo anti-α5β1, o un fragmento del mismo, de la divulgación. Un anticuerpo de la divulgación, o porciones fijadoras de antígenos del mismo, se pueden derivar o enlazar a otra molécula funcional, *ej.,* otro péptido o proteína *(ej.,* otro anticuerpo o ligando para un receptor) para generar una molécula biespecífica que se fije a al menos dos sitios de unión diferentes o moléculas diana. En realidad el anticuerpo de la divulgación se puede derivar o enlazar a más de otra molécula funcional para generar moléculas multiespecíficas que se fijen a más dos sitios de unión diferentes y/o moléculas diana; tales moléculas multiespecíficas también están incluidas por el término "molécula biespecífica" como se utiliza en la presente. Para crear una molécula biespecífica de la divulgación, un anticuerpo de la divulgación se puede enlazar funcionalmente *(ej.,* mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras moléculas de unión, tal como otro anticuerpo, fragmento de anticuerpo, péptido mimético o de unión, tal que resulte una molécula biespecífica.

Por consiguiente, la presente divulgación incluye moléculas biespecíficas comprendiendo al menos una primera especificidad de unión para α5β1 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítopo diana. En un aspecto particular de la divulgación, el segundo epítopo diana es un receptor Fc, *ej.,* FcγRI humano (CD64) o un receptor Feγ humano (CD89). Por lo tanto, la divulgación incluye moléculas biespecíficas capaces de unión a ambos FcγR o FcγR

expresando células efectoras *(ej.,* monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMNs)), y a células diana expresando α5β1. Estas moléculas biespecíficas dirigen células que expresan α5β1 a células efectoras y disparan actividades de células efectoras mediadas por el receptor Fc, tales como fagocitosis de células que expresan α5β1, citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC), liberación de citocinas, o generación del anión superóxido.

En un aspecto de la divulgación en el cual la molécula biespecífica es multiespecífica, la molécula puede además incluir una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-α5β1. En un caso, la tercera especificidad de unión es una porción de factor anti-aumento (EF), *ej.,* una molécula la cual se fija a una proteína de superficie involucrada en actividad citotóxica y aumenta así la respuesta inmune contra la célula diana. La "porción de factor anti-aumento" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se fija a una molécula dada, *ej.,* un antígeno o un receptor, y produce así un aumento del efecto de los determinantes de unión para el receptor Fc o antígeno de células diana. La "porción de factor anti-aumento" puede fijar un receptor Fc o un antígeno de células diana. Alternativamente, la porción de factor anti-aumento puede fijarse a una entidad que sea diferente de la entidad a la cual la primera y segunda especificidades de unión se fijan. Por ejemplo, la porción de factor anti-aumento puede fijar una célula T citotóxica *(ej.* vía CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmune que resulta en una respuesta inmune aumentada contra la célula diana).

En un caso, las moléculas biespecíficas de la divulgación comprenden como una especificidad de unión al menos uno anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, incluyendo, *ej.,* un Fab, Fab', F(ab')2, Fv, o una cadena simple Fv. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena liviana o cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o un constructo de cadena simple como se describió en Ladner Patente Americana No. 4,946,778.

En un caso, la especificidad de unión para un receptor Feγ es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, la unión del cual no es bloqueada por G (IgG) de inmunoglobulina humana. Como se utiliza en la presente, el término "receptor IgG" se refiere a cualquiera de los ochos genes de la cadena γ localizados sobre el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptores solubles o transmembrana los cuales están agrupados en tres clases de receptores Feγ: FcγRI (CD64), Feγ RII(CD32), y FcγRIII (CD 16). En un caso, el receptor Feγ

es un Feγ RI humano de alta afinidad. El FcγRI humano es una molécula 72 kDa, la cual muestra alta afinidad para IgG monomérico (10^8- 10^9 M^{-1}).

La producción y caracterización de ciertos anticuerpos monoclonales anti-Feγ son descritas por Fanger en Publicación PCT WO 88/00052 y en Patente Americana No. 4,954,617. Estos anticuerpos se fijan a un epítopo de FcγRI, FcγRII o FcγRIII en un sitio el cual es distinto del sitio de unión Feγ del receptor y, por lo tanto, su unión no es bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos anti-FcyRI específicos útiles en esta divulgación son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. El hibridoma que produce mAb 32 está disponible en No. de Acceso de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). HB9469. En otros casos el anticuerpo receptor anti-Feγ es una forma humanizada de anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F.. (1995; *J. Inmunol* 155 (10): 4996-5002 y Publicación PCT WO 94/10332. La línea celular que produce el anticuerpo H22 se depositó en el Colección Americana de Cultivos Tipo bajo la designación FIA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En aún otros casos, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se fija a un receptor IgA humano, *ej.,* un receptor Fc-alpha (FcαRI (CD89)), la unión del cual típicamente no es bloqueada por inmunoglobulina humana A (IgA). El término " receptor IgA" incluye el producto génico de un gen α (FcaRI) localizado sobre el cromosoma 19. Este gen es conocido por codificar varias isoformas de transmembrana alternativamente empalmadas de 55 a 110 kDa. FcαRI (CD89) es constitutivamente expresado sobre monocitos/macrófagos, granulocitos eosinofílicos y neutrofílicos, pero no sobre poblaciones celulares no efectoras. FcαRI tiene afinidad de medio (≈5x 10^7 M^{-1}) para ambos IgAl y IgA2, la cual aumenta ante exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. (1996) *Critical Reviews en Immunology* 16:423-440). Cuatro anticuerpos monoclonales FcαRI-específicos, identificados como A3, A59, A62 y A77, los cuales fijan FcαRI fuera del dominio de unión de ligandos IgA, se han descrito (Monteiro, R.C.. (1992) *J. Inmunol.* 148:1764).

FcαRI y FcγRI son receptores disparadores ilustrativos para utilizar en las moléculas biespecíficas de la divulgación puesto que son (1) expresados principalmente sobre células efectoras inmunes, *ej.,* monocitos, PMNs, macrófagos y células dendríticas; (2) expresados a altos niveles *(ej.,* 5,000-100,000 por célula); (3) mediadores de actividades citotóxicas *(ej.,*

ADCC, fagocitosis); (4) median una presentación antigénica mejorada de antígenos, incluyendo auto-antígenos dirigidos sobre ellos.

Mientras se prefieren anticuerpos monoclonales humanos, otros anticuerpos que se pueden emplear en las moléculas biespecíficas de la divulgación son anticuerpos monoclonales murinos, quiméricos y humanizados.

Las moléculas biespecíficas de la presente divulgación se pueden preparar al conjugar las especificidades de unión constituyentes, *ej.,* las especificidades de unión anti-FcR y anti-α5β1, utilizando cualquier método apropiado. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica se puede generar de manera separada y luego conjugar con las demás. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede utilizar una variedad de agentes acopladores o entrecruzadores para conjugación covalente. Ejemplos de agentes entrecruzadores incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), y 4-(N-maleimidometil)-ciclohaxano-l-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC) (ver *ej.,* Karpovsky . (1984)./. *Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA . (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Otros métodos incluyen aquellos descritos en Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan. (1985) *Science* 229:81-83), y Glennie. (1987*) J. Inmunol.* 139:2367-2375). Agentes de conjugación apropiados incluyen SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles en Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, estos se pueden conjugar vía enlace de sulfhidrilo de las regiones de bisagra de terminal C es de las dos cadenas pesadas. En un caso, la región de bisagra es modificada para contener un número impar de residuos de sulfhidrilo, tal como un residuo, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector y expresar y ensamblar en la misma célula hospedera. Este método es particularmente útil donde la molécula biespecífica es un mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')2 o ligando x proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica de la divulgación puede ser una molécula de cadena simple comprendiendo un anticuerpo de cadena simple y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena simple comprendiendo dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas pueden comprender al menos dos moléculas de cadena simple. Métodos para preparar moléculas biespecíficas se describen por ejemplo en la Patente Americana No.

5,260,203; Patente Americana No. 5,455,030; Patente Americana No. 4,881,175; Patente Americana No. 5,132,405; Patente Americana No. 5,091,513; Patente Americana No. 5,476,786; Patente Americana No. 5,013,653; Patente Americana No. 5,258,498; y Patente Americana No. 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar mediante, por ejemplo, ensayo inmunosorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, bioensayo *(ej.,* inhibición de crecimiento), o ensayo Western Blot. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular mediante el empleo de un reactivo rotulado *(ej.,* un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo se pueden detectar utilizando *ej.,* un anticuerpo ligado a enzima o fragmento de anticuerpo el cual reconoce y específicamente se fija a los complejos anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar utilizando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede rotular de manera radioactiva y utilizar en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo, Weintraub, B., Principios de Radioinmunoensayos, Séptima Capacitación sobre Técnicas de Ensayo de Radioligandos, La Sociedad Endocrina, March, 1986). El isotopo radioactivo se puede detectar mediante un medio tal como el uso de un contador γ o un contador de centelleo o mediante autoradiografía.

Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición, *ej.,* una composición farmacéutica, conteniendo uno o una combinación de anticuerpos monoclonales, o porciones fijadoras de antígenos de los mismos, de la presente divulgación, formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden incluir uno o una combinación de anticuerpos (*ej.,* dos o más), o inmunoconjugados o moléculas biespecíficas de la divulgación. Por ejemplo, una composición farmacéutica de la divulgación puede comprender una combinación de anticuerpos (o inmunoconjugados o biespecíficos) que se fijan a diferentes epítopos sobre el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación también se pueden administrar en terapia de combinación, *es decir,* combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un anticuerpo anti-$\alpha 5\beta 1$ de la presente divulgación combinado con al

menos otro agente anti-inflamatorio o inmunosupresor. Ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden utilizar en terapia de combinación se describen en detalle más adelante en la sección sobre usos de los anticuerpos de la divulgación.

Como se utiliza en la presente, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y anti-mitóticos, agentes isotónicos y retardantes de absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Típicamente, el vehículo es apropiado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral o epidermal *(ej.,* mediante inyección o infusión). Dependiendo de la ruta de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, porción fijadora de antígenos del mismo, inmunoconjugado, o molécula biespecífica, se pueden recubrir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que puedan inactivar el compuesto.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente divulgación pueden estar presentes en una forma neutral (incluyendo formas switteriónicas) o como una especie cargada de manera positiva o negativa. En algunos casos, los anticuerpos pueden agruparse para formar un complejo junto con un contraión para formar una sal farmacéuticamente aceptable. Así, los compuestos farmacéuticos de la divulgación pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto precursor (ej. anticuerpo) y no imparte efectos toxicológicos indeseados (ver *ej.,* Berge, S.M., . (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Por ejemplo, el término "sal farmacéuticamente aceptable" incluye un complejo que comprende uno o más anticuerpos y uno o más contraiones, donde los contraiones se derivan a partir de bases y ácidos inorgánicos y orgánicos.

Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de básica. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobrómico, hidroyódico, fósforo y similares, así como también a partir de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanoicos fenilo- sustituidos, ácidos hidroxi-alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de básica incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como también sales derivadas de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-

dibenziletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y similares.

Además, las bases inorgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen iones metálicos. Iones metálicos incluyen, pero no se limitan a, sales metálicas apropiadas, sales metálicas alcalinotérreas y otros iones metálicos fisiológicamente apropiados. Sales derivadas a partir de bases inorgánicas incluyen sales de aluminio, amonio, calcio, cobalto, níquel, molibdeno, vanadio, manganeso, cromio, selenio, estaño, cobre, feéricas, ferrosas, de litio, magnesio, sales mangánicas, manganosas, de potasio, rubidio, sodio, y zinc, y en sus valencias usuales.

Sales de adición ácida farmacéuticamente aceptables de los anticuerpos de la presente divulgación se pueden preparar a partir de los siguientes ácidos, incluyendo, sin limitar a, ácido fórmico, acético, acetamidobenzóico, adípico, ascórbico, bórico, propiónico, benzóico, canfórico, carbónico, ciclámico, dehidrocólico, malónico, edético, etillsulfúrico, fendizóico, metafosfórico, succínico, glicólico, glucónico, láctico, málico, tartárico, tánnico, cítrico, nítrico, ascórbico, glucurónico, maleico, fólico, fumárico, propiónico, pirúvico, aspártico, glutámico, benzoico, clorhídrico, hidrobrómico, hidroyódico, lisina, isocítrico, trifluoroacético, pamóico, propiónico, antranílico, mesílico, orótico, oxálico, oxalacético, oléico, esteárico, salicílico, aminosalicílico, silicato, p-hidroxibenzóico, nicotínico, fenilacético, mandélico, embónico, sulfónico, metanosulfónico, fosfórico, fosfónico, etanosulfónico, etanodisulfónico, amonio, benzenosulfónico, pantoténico, naftalensulfónico, toluensulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, sulfanílico, sulfúrico, nítrico, nitroso, éster monometílico del ácido sulfúrico, ciclohexilaminosulfónico, p-hidroxibutírico, glicina, glicilglicina, glutámico, cacodilato, diaminohexanoico, camforsulfónico, glucónico, tiociánico, oxoglutárico, 5-fosfato de piridoxal, clorofenoxiacético, undecanóico, N-acetil-L-aspártico, galactárico y galacturónico.

Bases orgánicas farmacéuticamente aceptables incluyen trimetilamina, dietilamina, N, N'-dibenziletilendiamina, cloroprocaina, colina, dibenzilamina, dietanolamina, etilendiamina, meglumina (N-metilglucamina), procaina, aminas cíclicas, cationes de amonio cuaternarios, arginina, betaina, cafeína, clemizol, 2-etilaminoetanol, 2-dietilaminoetanol, 2-dimetilaminoetanol, etanodiamina, butilamina, etanolamina, etilendiamina, N-etilmorfolina, N-etilpiperidina, etilglucamina, glucamina, glucosamina, histidina, hidrabamina, imidazol, isopropilamina, metilglucamina, morfolina, piperazina, piridina, piridoxina, neodimio, piperidina, resinas de poliamina, procaina, purinas, teobromina, trietilamina, tripropilamina, trietanolamina,

trometamina, metilamina, taurina, colato, 6-amino-2-metil-2-heptanol, 2-amino-2-metil-l,3-propanodiol, 2-amino-2-metil-l-propanol, ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanoicos fenilo- sustituidos, ácidos hidroxi- alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, estronio, tricina, hidrazina, fenilciclohexilamina, ácido 2- (N-morfolino)etanosulfónico, bis(2- hidroxietil)amino- tris(hidroximetil)metano, ácido *N*- (2-acetamido)- 2- aminoetanosulfónico, ácido 1,4- piperazinadietanosulfónico, ácido 3- morfolino-2- hidroxipropanosulfónico, 1,3-bis[tris(hidroximetil)metilamino]propano, ácido 4- morfolinopropanosulfónico, ácido 4- (2-hidroxietil)piperazina- 1- etanosulfónico, ácido 2- [(2- hidroxi- 1,1-bis(hidroximetil)etil)amino]etanosulfónico, ácido N,N- bis(2- hidroxietil)- 2-aminoetanosulfónico, ácido 4- (N- morfolino)butanosulfónico, ácido *3- (N,N- bis[2-* hidroxietil]amino)- 2- hidroxipropanosulfónico, ácido 2- hidroxi- 3-[tris(hidroximetil)metilamino]- l- propanosulfónico, 4- (2- hidroxietil)piperazina- 1- (ácido 2-hidroxipropanosulfónico), dihidrato de piperazina- l,4- bis(ácido 2- hidroxipropanosulfónico), ácido 4- (2- hidroxietil)- l- piperazinapropanosulfónico, N,N- bis(2- hidroxietil)glicina, N- (2-hidroxietil)piperazina- N'- (ácido 4- butanosulfónico), ácido N- [tris(hidroximetil)metil]- 3-aminopropanosulfónico, ácido N- tris(hidroximetil)metil- 4- aminobutanosulfónico, ácido N- (l ,l- dimetil- 2- hidroxietil)- 3- amino- 2- hidroxipropanosulfónico, ácido 2-(ciclohexilamino)etanosulfónico, ácido 3- (ciclohexilamino)- 2- hidroxi-1-propanosulfónico, ácido 3- (ciclohexilamino)- 1- propanosulfónico, ácido *N*-(2-acetamido)iminodiacético, ácido 4-(ciclohexilamino)-l-butanosulfónico, *N*-[tris(hidroximetil)metil]glicina, 2-amino-2-(hidroximetil)-l,3-propanodiol, y trometamol.

Una composición farmacéutica de la divulgación también puede incluir un anti-oxidante farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloruro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos apropiados que se pueden emplear en las composiciones farmacéuticas de la divulgación incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, glicol de propileno, glicol de polietileno, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en la caso de dispersiones, y mediante el uso de surfactantes.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como preservativos, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. La prevención de presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, *supra,* como mediante la inclusión de varios agentes antibacterianos y anti-mitóticos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir en las composiciones, agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser producida por la inclusión de agentes los cuales retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en el estado de la técnica. Excepto en lo que respecta a cualquier medio convencional o agente incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones farmacéuticas de la divulgación. Compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Típicamente las composiciones deben ser estériles y estables bajo las condiciones de modificación genética y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada apropiada para alta concentración farmacológica. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión conteniendo, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, glicol de propileno, y glicol de polietileno liquido, y similares), y mezclas apropiadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en la caso de dispersión y mediante el uso de

surfactantes. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede producir al incluir en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Se pueden preparar soluciones estériles inyectables mediante incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por microfiltración de esterilización. Generalmente, las dispersiones son preparadas mediante la incorporación del compuesto activo en un vehiculo estéril que contiene un medio básico de dispersión y los otros ingredientes requeridos a partir de aquellos enumerados anteriormente. En la caso de polvos estériles para la preparación de soluciones estériles inyectables, los métodos de preparación incluyen, pero no se limitan a, secado al vacío y secado por congelamiento (liofilización) que proporcione un polvo del ingrediente activo mas cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma de dosificación simple variará dependiendo del sujeto tratado, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será aquella cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico. Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad estará en el rango entre 0.01 % y 99% aproximadamente de ingrediente activo, preferiblemente entre 0.1 % y 70% aproximadamente, más preferiblemente entre 1% y 30% aproximadamente de ingrediente activo en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los regímenes de dosificación son ajustados para proporcionar la respuesta óptima deseada *(ej.,* una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como según las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma unitaria de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. Forma unitaria de dosificación como se utiliza en la presente se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos a ser tratados; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto

activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas unitarias de dosificación de la divulgación son dictadas por y dependen directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular a ser logrado, y (b) las limitaciones inherentes al arte de la preparación de tal compuesto activo para el tratamiento de sensibilidad en individuos.

Para administración del anticuerpo, la dosificación está en el rango entre aproximadamente 0.0001 y 100 mg/kg, y más usualmente entre 0.01 y 5 mg/kg, del peso corporal del huésped. Por ejemplo las dosificaciones puede ser 0.3 mg/kg de peso corporal, 1 mg/kg de peso corporal, 3 mg/kg de peso corporal, 5 mg/kg de peso corporal o 10 mg/kg de peso corporal o dentro del rango de 1 a 10 mg/kg. Un régimen de tratamiento de ejemplo acarrea administración una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, una vez por mes, una vez cada 3 meses o una vez cada tres a 6 meses. Los regímenes de dosificación para un anticuerpo anti-α5β1 o porciones fijadoras de antígenos del mismo de la divulgación incluyen, por ejemplo, 1 mg/kg de peso corporal o 3 mg/kg de peso corporal vía administración intravenosa, con el anticuerpo proporcionado utilizando uno de los siguientes esquemas de dosificación: (i) cada cuatro semanas durante seis dosificaciones, luego cada tres meses; (ii) cada tres semanas; (iii) 3 mg/kg de peso corporal una vez seguido por 1 mg/kg de peso corporal cada tres semanas.

En algunos métodos, dos o más anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades de unión son administrados de manera simultánea, en cuyo caso la dosificación de cada anticuerpo administrado está dentro de los rangos indicados. Usualmente el anticuerpo es administrado en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosificaciones simples pueden ser, por ejemplo, semanalmente, mensualmente, cada tres meses o anualmente. Los intervalos también pueden ser irregulares como se indicó al medir los niveles sanguíneos de anticuerpo al antígeno diana en el paciente. En algunos métodos, la dosificación es ajustada para lograr una concentración de anticuerpos en plasma de aproximadamente 1 a 1000 μg/ml y en algunos métodos aproximadamente 25 a 300 μg/ml.

Alternativamente, el anticuerpo se puede administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere administración menos frecuente. La dosificación y frecuencia varia dependiendo de la vida media del anticuerpo en el paciente. En general, anticuerpos

humanos muestran la vía media más larga, seguidos por anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos no humanos. La dosificación y frecuencia de administración puede variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, una dosificación relativamente baja es administrada a intervalos relativamente ocasionales durante un periodo de tiempo largo. Algunos pacientes necesitan recibir tratamiento por el resto de sus vidas. En aplicaciones terapéuticas, algunas veces se requiere una dosificación relativamente alta a intervalos relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad es reducida o terminada, y preferiblemente hasta que el paciente muestra alivio parcial o completo de síntomas de la enfermedad. Luego al paciente se puede administrar un régimen profiláctico.

Los niveles actuales de dosificación del ingrediente activo en las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particulares, la cual no sea tóxica para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleada, o el éster, sal o amida de las mismas, la ruta de administración, la tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historia médica del paciente tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" de un anticuerpo anti-α5β1 de la divulgación preferiblemente resulta en una disminución en la severidad de los síntomas de la enfermedad, un aumento en frecuencia y duración de periodos libres de síntomas de la enfermedad, o una prevención de deterioro o discapacidad debido al pacedimiento de la enfermedad. Por ejemplo, para el tratamiento de tumores α5β-positivos, una "dosificación terapéuticamente efectiva" preferiblemente inhibe crecimiento celular o crecimiento tumoral en al menos aproximadamente 20%, más preferiblemente al menos aproximadamente 40%, aún más preferiblemente al menos aproximadamente 60%, y aún más preferiblemente al menos aproximadamente 80% con relación a sujetos sin tratar. La capacidad de un compuesto para inhibir crecimiento tumoral se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición se puede

evaluar al examinar la capacidad del compuesto para inhibir tal inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el medico con experiencia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede disminuir tamaño del tumor, o de otra manera aliviar los síntomas en un sujeto. Alguien con experiencia común en el estado de la técnica podría determinar tales cantidades con base en factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto, y la composición o ruta de administración particulares seleccionadas.

Una composición de la presente divulgación se puede administrar vía una o más rutas de administración utilizando uno o más de una variedad de métodos conocidos en el estado de la técnica. Como lo apreciará alguien con experiencia en el estado de la técnica, la ruta y/o modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. Las rutas de administración para anticuerpos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación incluyen rutas de administración intravenosa, intramuscular, intradermal, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras rutas de administración parenterales, por ejemplo mediante inyección o infusión. La frase "administración parenteral" como se utiliza en la presente se refiere a modos de administración diferentes a administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradermal, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subracnoide, intraespinal, epidural e intraesternal.

Alternativamente, un anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo de la divulgación se puede administrar vía una ruta no parenteral, tal como una ruta de administración tópica, epidermal o mucosal, por ejemplo, de manera intranasal, oral, vaginal, rectal, sublingual o tópica.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protejan el compuesto contra liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de distribución microencapsulada. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles tales como etileno vinil acetato, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o generalmente son conocidos por aquellos con experiencia en el estado de la técnica. Ver, *ej., Sustained y Controlled Release Drug Delibery Systems,* J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, una composición terapéutica de la divulgación se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tales como los dispositivos divulgados en las Patentes Americanas No. 5,399,163; 5,383,851; 5,312,335; 5,064,413; 4,941,880; 4,790,824; o 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente divulgación incluyen: la Patente Americana No. 4,487,603, la cual divulga un bomba de micro-infusión implantable para dispersar medicamento a una tasa controlada; la Patente Americana No. 4,486,194, el cual divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la Patente Americana No. 4,447,233, la cual divulga una bomba de infusión de medicamento para entregar medicación a una tasa de infusión precisa; la Patente Americana No. 4,447,224, la cual divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para distribución farmacológica continua; Patente Americana No. 4,439,196, la cual divulga un sistema osmótico de entrega de fármacos con compartimientos multi-cámara; y la Patente Americana No. 4,475,196, la cual divulga un sistema osmótico de entrega de fármacos. Muchos otros de estos implantes, sistemas de entrega, y módulos son conocidos por aquellos con experiencia en el estado de la técnica.

En ciertos casos, los anticuerpos monoclonales humanos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación se pueden formular para asegurar distribución apropiada *in vivo.* Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofóbicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la divulgación crucen la BBB (si se desea), éstos se pueden formular, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de producción liposómica, ver, *ej.,* Patentes Americanas 4,522,811; 5,374,548; y 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones las cuales son selectivamente transportadas en células u órganos específicos, mejorando así la distribución farmacológica dirigida *(ver, ej.,* V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Fracciones diana de ejemplo incluyen folato o bioestaño (ver, *ej.,* Patente Americana 5,416,016 de Low); manosidos (Umezawa, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticuerpos (P.G. Bloeman. (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); receptor surfactante de proteína A (Briscoe. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134); pi20 (Schreier (1994),/. *Biol. Chem.* 269:9090); ver también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994; *Inmunomethods* 4:273.

Usos y Métodos de la divulgación

Los anticuerpos, particularmente los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente divulgación tienen numerosas actividades diagnósticas y terapéuticas *in vitro* y *in vivo* que involucran la diagnosis y tratamiento de trastornos mediados por α5β1. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, *in vitro* o *ex vivo,* o a sujetos humanos, *ej., in vivo,* para tratar, prevenir y diagnosticar una variedad de trastornos. Como se utiliza en la presente, el término "sujeto" incluye animales humanos y no humanos. animales no humanos incluyen todos los vertebrados, *ej.,* mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, gatos, vacas, caballos, pollos, anfibios, y reptiles. Sujetos preferidos incluyen pacientes humanos con trastornos mediado por actividad α5β1. Los métodos son particularmente apropiados para tratar pacientes humanos que tienen un trastorno asociado con expresión aberrante de α5β1. Cuando los anticuerpos α5β1 se administran junto con otro agente, los dos se pueden administrar en cualquier orden o de manera simultanea.

Dada la unión específica de los anticuerpos de la divulgación para α5β1, los anticuerpos de la divulgación se pueden utilizar para detectar específicamente expresión α5β1 sobre la superficie de células y, además, se pueden utilizar para purificar α5β1 vía purificación de inmunoafinidad.

Además, dada la expresión de α5β1 sobre varias células tumorales (ver, ej. Ejemplo 6, Figura 7), y su participación en angiogénesis, los anticuerpos humanos, composiciones de anticuerpos y métodos de la presente divulgación se pueden utilizar para tratar un sujeto con crecimiento celular anormal, *ej.,* un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales expresando α5β1 incluyendo, por ejemplo, mesotelioma hepatobiliar (conducto hepático y biliar), un tumor primario o secundario del SNC (sistema nervioso central), un tumor cerebral primario o secundario, cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanona cutáneo o intraocular, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estomago, gastrointestinal (gástrico, colorectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de la cerviz, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la paraglándula tiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido suave, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer

testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores de la columna vertebral, glioma del tallo cerebral, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de los anteriores cánceres.

En un caso, los anticuerpos (ej., anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecífico y biespecíficas y composiciones) o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación se pueden utilizar para detectar niveles de α5β1, o niveles de células las cuales contienen α5β1 sobre su superficie de membrana, luego tales niveles se pueden enlazar a ciertos síntomas de la enfermedad. Alternativamente, los anticuerpos se pueden utilizar para inhibir o bloquear la función α5β1 la cual, a su vez, se puede ligar a la prevención o alivio de ciertos síntomas de la enfermedad, implicando así a α5β1 como un mediador de la enfermedad. Esto se puede lograr al colocar en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-α5β1 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y α5β1. Cualquiera de los complejos formados entre el anticuerpo y α5β1 son detectados y comparados en la muestra y el control.

En otro caso, los anticuerpos *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación se pueden inicialmene probar para actividad fijadora asociada con uso terapéutico o diagnóstico *in vitro.* Por ejemplo, las composiciones de la divulgación se pueden probar utilizando los ensayos citométricos de flujo descritos en los Ejemplos más adelante.

Los anticuerpos *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas, inmunoconjugados y composiciones) o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación tienen utilidad adicional en terapia y diagnosis de enfermedades relacionadas con α5β1. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos, las moléculas multiespecíficas o biespecíficas y los inmunoconjugados se pueden utilizar para producir *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento de y/o eliminar una célula expresando α5β1; para mediar fagocitosis o ADCC de una célula expresando α5β1 en presencia de células efectoras humanas, o para bloquear la unión de ligandos α5β1 a α5β1.

En un caso particular, los anticuerpos *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y composiciones) o porciones fijadoras de antígenos de los mismos se utilizan *in vivo* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con α5β1. Ejemplos de enfermedades relacionadas con α5β1 incluyen, entre otros, crecimiento celular anormal, tales como cáncer. En una realización, el crecimiento celular anormal es cáncer, incluyendo, pero sin limitar a, mesotelioma hepatobiliar (conducto hepático y biliar), un tumor primario o secundario del SNC (sistema nervioso central), un tumor cerebral primario o secundario, cáncer pulmonar (NSCLC y SCLC), cáncer óseo, cáncer pancreático, cáncer de piel, cáncer de cabeza o cuello, melanona cutáneo o intraocular, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estomago, cáncer gastrointestinal (gástrico, colorectal, y duodenal), cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, carcinoma del endometrio, carcinoma de la cerviz, carcinoma de la vagina, carcinoma de la vulva, Enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer de intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la paraglándula tiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido suave, cáncer de la uretra, cáncer del pene, cáncer de próstata, cáncer testicular, leucemia crónica o aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas linfocíticos, cáncer de la vejiga, cáncer del riñón o uretra, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasmas del sistema nervioso central (CNS), linfoma primario del SNC, linfoma no Hodgkin, tumores de la columna vertebral, glioma del tallo cerebral, adenoma pituitario, cáncer adrenocortical, cáncer de la vesícula biliar, mieloma múltiple, colangiocarcinoma, fibrosarcoma, neuroblastoma, retinoblastoma, o una combinación de uno o más de la anteriores cánceres.

Rutas de administración apropiadas de las composiciones de anticuerpos (*ej.,* anticuerpos monoclonales humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación *in vivo* y *in vitro* son bien conocidas en el estado de la técnica y se pueden seleccionar por aquellos con experiencia común. Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos se pueden administrar mediante inyección *(ej.,* intravenosa o subcutánea). Las dosificaciones apropiadas de las moléculas utilizadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y la concentración y/o formulación de la composición de anticuerpo.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos humanos anti-α5β1 o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación se pueden co-administrar con uno u otros agentes terapéuticos, *ej.,* un agente citotóxico, un agente radiotóxico o un agente inmunosupresivo. El anticuerpo se puede enlazar al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado desde el agente. En el último caso (administración separada), el anticuerpo se puede administrar antes, después de o concurrentemente con el agente o se puede co-administrar con otras terapias conocidas, *ej.,* una terapia anti-cáncer, *ej.,* radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes anti-neoplásicos tales como doxorubicina (adriamicina), cisplatino, sulfato de bleomicina, carmustina, clorambucilo, e hidroxiurea de ciclofosfamida los cuales, por si mismos, solamente son efectivos a niveles que son tóxicos o subtóxicos a un paciente. El cisplatino se puede administrar de manera intravenosa como una dosis de 100 mg una vez cada cuatro semanas y la adriamicina es administrada de manera intravenosa como una dosis de 60 a 75 mg/ml una vez cada 21 días. La co-administración de los anticuerpos humanos anti-α5β1, o fragmentos fijadores de antígenos de los mismos, de la presente divulgación con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anti-cáncer los cuales operan a través de diferentes mecanismos los cuales proporcionan un efecto citotóxico a células tumorales humanas. Tal co-administración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio en la antigenicidad de las células tumorales lo cual las haría no reactivas con el anticuerpo.

Células efectoras específicas de diana, *ej.,* células efectoras enlazadas a composiciones *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también se pueden utilizar como agentes terapéuticos. Las células efectoras para dirigir a una diana específica pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrofilos o monocitos. Otras células incluyen eosinofilos, células asesinas naturales y otras células portadoras de receptores IgG- o IgA. Si se desea, las células efectoras se pueden obtener a partir del sujeto a ser tratado. Las células efectoras específicas de diana se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede estar en el orden de 10^8 a 10^9 pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener localización en la célula diana, *ej.,* una célula tumoral expresando α5β1, y para efectuar muerte celular mediante, *ej.,* fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de diana se puede realizar en conjunto con otras técnicas para remoción de células diana. Por ejemplo, la terapia anti-tumoral que utiliza las composiciones *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación y/o células efectoras armadas con estas composiciones se pueden utilizar en conjunto con quimioterapia. Adicionalmente, se puede utilizar inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas diferentes hacia rechazo de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-α5β1 enlazados a anti-Fc-gamma RI o anti-CD3 se pueden utilizar en conjunto con agentes de unión específicos a receptores IgG- o IgA

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la divulgación también se pueden utilizar para modular niveles FcγR o FcγR sobre células efectoras, tal como mediante *capping* y eliminación de receptores sobre la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también se pueden utilizar para este propósito.

Las composiciones *(ej.,* anticuerpos humanos, humanizados, o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la divulgación las cuales tienen sitios de unión de complemento, tales como porciones a partir de IgG1, -2, o -3 o IgM los cuales fijan el complemento, también se pueden utilizar en la presencia de complemento. En un caso, el tratamiento *ex vivo* de una población de células comprendiendo células diana con un agente de unión de la divulgación y células efectoras apropiadas se puede complementar con la adición de complemento o suero conteniendo complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la divulgación puede ser mejorada por unión de proteínas de complemento. En otro caso las células diana recubiertas con las composiciones *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también pueden exponerse a lisis por el complemento. En aún otro caso, las composiciones de la divulgación no activan complemento.

Las composiciones *(ej.,* anticuerpos humanos, humanizados, o quiméricos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas y inmunoconjugados) de la divulgación también se pueden administrar junto con complemento. Por consiguiente, dentro del alcance de la divulgación están las composiciones que comprenden anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones tienen la ventaja que el complemento está localizado muy cerca de los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas. Alternativamente, los anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas o

biespecíficas de la divulgación y el complemento o suero se puede administrar de manera separada.

También dentro del alcance de la presente divulgación están los kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la divulgación *(ej.,* anticuerpos humanos, moléculas biespecíficas o multiespecíficas, o inmunoconjugados) e instrucciones para utilizar. El kit puede además contener uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresivo, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos humanos adicionales o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de la divulgación *(ej.,* un anticuerpo humano con una actividad complementaria el cual se fija a un epítopo en el antígeno α5β1 distinto del primer anticuerpo humano).

Por consiguiente, a los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la divulgación se puede adicionalmente administrar (antes, de manera simultanea, o después de la administración de un anticuerpo humano de la divulgación) otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, el cual mejora o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos humanos.

En otros casos, el sujeto se puede tratar adicionalmente con un agente que module, *ej.,* mejore o inhiba, la expresión o actividad de receptores Feγ o Feγ, por ejemplo, tratando el sujeto con un citoquina. Las citoquinas para administración durante tratamiento con la molécula multiespecífica incluyen factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferona-γ (IFN-γ), y factor de necrosis tumoral (TNF).

Las composiciones (ej., anticuerpos humanos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la divulgación también se pueden utilizar para identificar aquellas células que expresen FcγR o α5β1, por ejemplo para rotular tales células. Para tal uso, el agente de unión se puede enlazar a una molécula que pueda ser detectada. Así, la divulgación proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vitro* células que expresan receptores Fc, tales como FcγR, o α5β1. El rótulo detectable puede ser, ej., un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima.

En un caso particular, la divulgación proporciona métodos para detectar la presencia de un antígeno α5β1 en una muestra, o midiendo la cantidad de antígeno α5β1, comprendiendo colocar en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo monoclonal humano, o una porción fijadora de antígenos del mismo, el cual específicamente se fija a un α5β1, bajo

condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y α5β1. Luego se detecta la formación de un complejo, en donde una formación de complejo diferente entre la muestra comparada con la muestra de control indica la presencia de antígeno α5β1 en la muestra.

En otros casos, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno mediado por α5β1 en un sujeto, *ej.,* crecimiento celular anormal tal como cáncer, mediante administración al sujeto de los anticuerpos humanos o porciones fijadoras de antígenos de los mismos descritos anteriormente. Tales anticuerpos y derivados de los mismos se utilizan para inhibir actividades inducidas por α5β1 asociadas con ciertos trastornos, *ej.,* angiogénesis, proliferación, y diferenciación. Por colocar en contacto el anticuerpo con α5β1 *{ej.,* administrando el anticuerpo a un sujeto), se inhibe la capacidad de α5β1 para inducir tales actividades y, por lo tanto, el trastorno asociado es tratado. La composición de anticuerpo se puede administrar sola o junto con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico el cual actúa en conjunto con o de manera sinergística con la composición de anticuerpo para tratar o prevenir la enfermedad mediada por α5β1.

En aún otro caso, los inmunoconjugados de la divulgación se pueden utilizar para dirigir compuestos *(ej.,* agentes terapéuticos, rótulos, citotoxinas, radiotoxinas inmunosupresoras, etc.) a células que tienen receptores de superficie celular α5β1 enlazando tales compuestos al anticuerpo. Así, la divulgación también proporciona métodos para localizar *ex vivo* o *in vivo* células que expresan α5β1 (*ej.,* con un rótulo detectable, tal como un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un co-factor de enzima). Alternativamente, los inmunoconjugados se pueden utilizar para eliminar células que tengan receptores de superficie celular α5β1 al dirigir las citotoxinas o radiotoxinas a α5β1.

La presente divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos los cuales no se deben entender como una limitante adicional. Los contenidos de todas las figuras y todas las referencias, patentes y solicitudes de patentes publicadas citadas a lo largo de esta divulgación son expresamente incorporados como referencia en su totalidad.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Generación de un Hibridoma que Produce Anticuerpo Anti-α5β1

Anticuerpos ilustrativos según la divulgación se prepararon, seleccionaron y probaron como sigue:

Inmunización y generación de hibridomas:

Los siguientes inmunógenos fueron utilizados para la generación de hibridomas: proteína-Fc de la integrina-α5 humana recombinante purificada; integrina-α5-His (R&D Systems, pedido especial); células NIH3T3 células transfectadas para expresar α5 humana; una línea celular Jurkat, una línea celular U-937 (ATCC Cat No CRL-1593) y una línea celular K-562 (ATCC Cat No CCL-243) las cuales expresan naturalmente integrina humana α5β1.

La proteína-Fc de la integrina-α5 humana recombinante purificada es un constructo quimérico del dominio extracelular de la integrina humana α5 (aminoácidos 42-995) fusionado a un dominio Fc de rata que fue clonado en el vector pSecTag2 y expresado utilizando el sistema 293-FreeStille (Invitrogen). Las células NIH3T3, transfectadas para expresar α5 humano, fueron producidas como sigue. El ADNc de la integrina humana α5 de longitud completa (Invitrogen, Cat. No. FL1002, clon 10:3629647) se clonó a partir del clon MGC de integrina humana α5 de longitud completa (Invitrogen) y subclonó a un vector de expresión de retrovirus (pBabe). Las partículas de virus fueron generadas y utilizadas para infectar células NIH3T3 (ATCC Cat No. CRL-1658). Se agregó puromicina para seleccionar clones celulares estables positivos. Se realizaron análisis Western Blot y FACS de expresión de proteína humana α5 para escoger los clones celulares estables de alta expresión.

Se prepararon anticuerpos monoclonales completamente humanos para integrina humana α5β1 utilizando la cepa de ratón transgénico de Ig humano Hco7/Hcol2 así como también la cepa transcromosomal/transgenica humana, KM (Medarex, Inc.). Estas cepas todas expresan anticuerpos completamente humanos que son indistinguibles de los anticuerpos aislados desde humanos. En estas cepas de ratón, el gen de cadena liviana kappa murina endógena ha sido homozigóticamente interrumpido como se describió en Chen . (1993) EMBO J. 12:811-820 y el gen de cadena pesada murina endógena ha sido homozigóticamente interrumpido como se describió en el Ejemplo 1 de la Publicación PCT WO 01/09187. Cada una de estas cepas de ratón lleva un transgen de cadena liviana kappa humano, KCo5, como se describió en Fishwild . (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. La cepa HCo7 lleva el transgen humano de cadena pesada HCo7 como se describió en las Patentes Americanas No. 5,545,806, 5,625,825, y 5,545,807. La cepa HCol2 lleva el transgen humano de cadena pesada HCol2 como se describió en el Ejemplo 2

de la Publicación PCT WO 01/09187. La cepa HCo7/ HCol2 lleva ambos transgenes de cadena pesada HCo7 y HCo12. La cepa KM lleva un mini-cromosoma humano como se describe en Ishida, (2002*), Cloning and Stem Cells*, 4: 91-102.

Para generar anticuerpos monoclonales completamente humanos a α5β1, ratones PIuMab de cepas Hco7/Hcol2 y KM fueron inmunizados con proteína Fc de la integrina-α5 humana recombinante o integrina-α5-His, células NIH3T3, transfectados para expresar α5 humano, y línea celular Jurkat, línea celular U-937 y línea celular K-562 las cuales expresan de manera natural α5β1 humano. Los esquemas generales de inmunización para ratones HuMab se describen en Lonberg, N. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, D. . (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 y Publicación PCT WO 98/24884. Los ratones tuvieron 6-16 semanas de edad en el momento de la primera infusión de antígeno. Una preparación recombinante purificada de proteína-Fc de la integrina humana-α5 o integrina-α5-antígeno his (15-20 μg), una preparación de células NIH3T3 transfectadas o células Jurkat, células U-937, y células K-562 (1 x 10^7 células) se utilizó para inmunizar los ratones HuMab intraperitonealmente (IP) y subcutáneamente (Sc).

Ratones transgénicos fueron inmunizados con antígeno en adyuvante Ribi intraperitonealmente y subcutáneamente en intervalos de 1-4 semanas (hasta un total de 16 inmunizaciones). La respuesta inmune fue monitoreada en sangre tomada mediante sangrados retro orbitales. El suero fue tamizado por FACS (como se describió más adelante), y los ratones con suficientes títulos de inmunoglobulina humana anti- α5β1fueron utilizados para las fusiones. Los ratones fueron reforzados de manera intravenosa con antígeno 3 y 2 días antes del sacrificio y retiro del bazo y/o ganglios linfáticos. Típicamente, se realizaron 10-20 fusiones para cada antígeno. Un total de 60 ratones Hco7/Hcol2 y KM fueron inmunizados. Varias docenas de ratones fueron inmunizados para cada antígeno.

Selección de Ratones HuMab que Producen Anticuerpos anti-α5β1:

Para seleccionar Ratones HuMab que producen anticuerpos que fijan α5β1, se tamizaron sueros de ratones inmunizados mediante citometría de flujo (FACS) para unión a una línea celular que expresa α5β1 humano de longitud completa, y no a una línea celular de control que no expresa α5β1. Brevemente, células NIH3T3 expresando α5 fueron incubadas con suero de ratones inmunizados diluido a 1:20. Las células fueron lavadas y la unión de anticuerpos

específicos fue detectada con IgG Ab anti humano rotulado con FITC. Los análisis de citrometría de flujo fueron realizados sobre un instrumento de citrometría de flujo FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA). Los ratones que desarrollaron los títulos más altos de anticuerpos anti- α5β1 fueron utilizados para fusiones. Las fusiones se realizaron como se describe más adelante y los sobrenadantes de hibridoma fueron probados para actividad anti-α5β1 por FACS.

Generación de Hibridomas que Producen Anticuerpos monoclonales humanos a α5β1:

Los esplenocitos de ratón y/o linfocitos de ganglio linfático, aislados a partir de ratones HuMab, fueron fusionados utilizando electrofusión (fusión E, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) a la línea celular de mieloma de ratón, Sp2/0 (ATCC, CRL-1581, Manassas, VA), utilizando los protocolos recomendados por el fabricante. Brevemente, suspensiones celulares simples de linfocitos de ganglios esplénicos y/o linfáticos desde ratones inmunizados fueron fusionadas a igual número de células de mieloma murinas no secretoras de Sp2/0 utilizando fusión E. Las células fueron sembradas a aproximadamente $2x10^4$ esplenocitos/pozo en placas de microtítulos de fondo plano, e incubadas durante 10 a 14 días en medio selectivo conteniendo suero bovino fetal al 10%, medio acondicionado P388D1 al 10% (ATCC, CRL-TIB-63), 3 a 5% (IGEN) en DMEM (Medianch, Herndon, VA, Cat.No, CRL 10013), con glucosa alta, L-glutamina y piruvato de sodio), 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml gentamicina y 1 x HAT (Sigma, Cat. No. CRL -P-7185). Después de 1 a 2 semanas, las células fueron cultivadas en medio en el cual el HAT fue reemplazado con HT. Aproximadamente 10 a 14 días después de sembrar las células, los sobrenadantes de pozos individuales fueron tamizados primero para analizar si contenían anticuerpos humanos gamma, kappa. Los sobrenadantes que fueron registrados positivos para gamma, kappa humanas luego fueron subsiguientemente tamizados mediante FACS (descrito anteriormente) para anti-α5β1 humano.

Anticuerpos Monoclonales IgG:

Los hibridomas secretores de anticuerpos fueron transferidos a placas de 24 pozos, tamizados nuevamente y, si se confirmaron positivos para anticuerpos monoclonales humanos IgG anti-α5β1, fueron subclonados al menos dos veces mediante dilución limitante. Luego los subclones estables fueron cultivados *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo tisular para caracterización adicional. Los procedimientos descritos

anteriormente se utilizaron para producir varios anticuerpos monoclonales anti-α5β1, incluyendo anticuerpos designados como "22B5", "24C7", "1D9", y "2D2", los cuales se describen en la presente.

Ejemplo 2: Caracterización estructural de Anticuerpo monoclonal humano 22B5

Las secuencias ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo monoclonal 22B5 fueron obtenidas a partir del hibridoma 22B5 utilizando técnicas PCR estándares y fueron secuenciadas utilizando técnicas estándares de secuenciamiento de ADN.

Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena pesada de 22B5 son mostradas en las Figuras 1A y IB y en SEQ ID NO: 11 y 7, respectivamente. Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena liviana de 22B5 son mostradas en las Figuras 1C y ID y en SEQ ID NO: 12 y 8, respectivamente.

La subclase de la molécula original 22B5 fue IgG4. La subclase IgG fue conmutada a IgG1 para proporcionar unión FcγR y funciones efectoras, tales como ADCC. Se introdujeron tres mutaciones en la región constante IgGl (S247D, A338L, y I340E) mediante mutagénesis sitio- dirigida para aumentar adicionalmente la unión a FcγRs y actividad de la función efectora. 22B5 con la subclase IgG1 y conteniendo estas tres mutaciones se conoce como "22B5/DLE" o "22B5 IgGl DLE". Dos mutaciones del dominio variable de cadena pesada fueron retornadas a la línea germinal para minimizar inmunogenicidad (BOS y N33S). No se encontraron mutaciones en la secuencia variable de cadena liviana. La cadena pesada de 22B5/DLE se muestra como SEQ ID NO: 9, mientras la cadena liviana de 22B5/DLE se muestra como SEQ ID NO: 10.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 22B5 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada 22B5 utiliza un segmento VH a partir de la línea germinal humana VH 4-39, un segmento D a partir de la línea germinal humana 3-10, y un segmento JH a partir de línea germinal humana JH 6b. La alineación de la secuencia 22B5 V_H con la secuencia de línea germinal VH 4-39 se muestra en Figura 2. Análisis adicional de la secuencia 22B5 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en Figura IB, y en SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena liviana 22B5 con las secuencias de cadena liviana de inmunoglobulina humana de línea germinal conocidas demostró que la cadena liviana 22B5 utiliza un segmento V_L a partir de línea germinal humana VK L6 y un segmento JK a partir de línea germinal humana JK 4. La alineación de la secuencia 22B5 VL con la secuencia VK L6 de línea germinal se muestra en Figura 2. Análisis adicional de la secuencia 22B5 V_L utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena liviana como se muestra en Figura ID, y en SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente.

Ejemplo 3: Caracterización de Especificidad de unión y Cinética de unión del Anticuerpo monoclonal humano 22B5

En este ejemplo, se examinó la afinidad de unión y cinética de unión del anticuerpo humano anti-α5β1 22B5 con las mutaciones IgGl DLE (22B5/DLE) mediante análisis Biacore. También se examine la especificidad de unión mediante citometría de flujo (FACS).

Afinidad y Cinética de Unión

La cinética de unión y afinidad nominal de 22B5/DLE al dominio extracelular de α5β1 se determinó utilizando análisis Biacore (Biacore AB, Uppsala, Sweden). Para realizar análisis cinéticos BIAcore, el anticuerpo 22B5/DLE fue inmovilizado sobre un chip biosensor y varias concentraciones de dominio extracelular α5β1 recombinante humano se hicieron fluir a través de la superficie a 25.0°C (ver Figura 3). Los datos de unión fueron ajustados globalmente a un modelo de unión uno a uno con línea base móvil. 22B5/DLE se fija reversiblemente a α5β1. La constante de unión (KD) para el dominio extracelular α5β1 recombinante humano estuvo en el rango entre 2.7 y 4.1 nM. La KD fue mayor cuando se midió en ausencia de cationes divalentes, consistente con activación de la integrina dependiente de cationes. Los parámetros de unión cinética estuvieron en el rango entre 3.4×10^{-5} y 4.5×10^{-5} $M^{-1}S^{-1}$ para la tasa de encendido y entre 1.2×10^{-3} y 1.4×10^{-3} s^{-1} para la tasa de apagado (ver Figura 3 y Tabla 1).

Para obtener una medición de afinidad nominal, se inmovilizó dominio extracelular α5β1 recombinante humano sobre un chip biosensor y se hicieron fluir varias concentraciones de 22B5/DLE a través de la superficie a 25.0°C. Un valor de afinidad nominal fue estimado como 0.05 pM en 20 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % P20 con 4.0 mM $MgCl_2$.

Tabla 1: Resumen de Datos de Unión y Cinéticos Obtenidos a Partir de Estudios BIAcore

Afinidad de 22B5/DLE para α5β1 (Biacore)	
K_D ($CaCl_2$)	2.7 nM
K_D ($MgCl_2$)	4.1 nM
Tasa de encendido (k_{on}) ($CaCl_2$)	4.5×10^{-5} $M^{-1}s^{-1}$
Tasa de encendido (k_{on}) ($MgCl_2$)	3.4 xlO-5 $M^{-1}s^{-1}$
Tasa de apagado (k_{off}) ($CaCl_2$)	$1.2 \times 10^{-3}s^{-1}$
Tasa de apagado (k_{off}) (MgCF)	$1.4 \times 10^{-3}s^{-1}$
Afinidad de 22B5/DLE para α5β1 (K_D, Biacore)	0.05 pM

$CaCl_2$ se refiere a condiciones buffer de 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20 con 4.0 mM $CaCl_2$; $MgCl_2$ se refiere a condiciones buffer de 10 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005% P20 con 4.0 mM $MgCl_2$.

Afinidad celular para determinación α5β1 por FACS

El anticuerpo 22B5/DLE fue probado para su afinidad de unión a integrina de superficie celular α5 utilizando un ensayo FACS, empleando integrina humana endógena α5β1 que expresa células (HUVEC). Brevemente, las células fueron separadas utilizando tripsina-EDTA y lavadas con PBS frío. Después de ser alicuotadas en placas de 96 pozos, las células fueron bloqueadas por suero e incubadas con diferentes concentraciones de mAb específico durante 1 hora a 4°C. Subsiguientemente, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario κ anti-humano conjugado con el fluoroforo R-PE y analizado utilizando un citometro de flujo FACSCalibur. 10,000 eventos fueron recolectados para cada muestra sin aplicar ninguna selección de poblaciones. Para determinación de K_D, la media geométrica de cada histograma de muestra fue calculada e ilustrada como una función de la concentración de mAb. La K_D fue calculada después de ajustar a un modelo de equilibrio de dos estados. 22B5/DLE se fija a α5β1 endógeno con K_D de 2.15 nM (n=4) en HUVEC (ver Figura 4).

Ejemplo 4: Afinidad para Receptores Feγ mediante Biacore

La capacidad de 22B5/DLE, el cual contiene las mutaciones triples IgGl DLE (como se discutió anteriormente en el Ejemplo 2), para mejorar la unión a FcγRs se evaluó en un experimento de unión Biacore. Las afinidades de unión FcγR de 22B5/DLE se compararon con la afinidad de unión de IgGl tipo silvestre. Las tres clases de FcγRs probados fueron: 1) el receptor FcγRI de alta afinidad; 2) las dos variantes polimórficas del receptor de baja afinidad FcγRIIa/131H y FcγRIIa/131R; y 3) las dos variantes polimórficas del receptor de afinidad medio, FcγRIIIa/158F y FcγRIIIa /158V. Los resultados (mostrados en la Figura 5, y resumidos en la Tabla 2) muestran un aumento aproximado de 6 veces para el receptor de alta afinidad FcyRI. Se observe un aumento de 122- y 70-veces para unión al receptor de afinidad medio FcyRIII/158F y 158V, respectivamente. La comparación de afinidad de unión de 22B5/DLE y IgGl tipo silvestre también se evaluó contra los receptores Fey. El mayor aumento en unión fue con el mFcγRIV, seguido por mFcγRI, y mFcγRIII (ver Figura 5).

Tabla 2: Unión Biacore aFcγRs (KD, Veces del mejoramiento sobre IgGl tipo silvestre)

FcγR	KD **(veces del mejoramiento sobre IgG1 tipo silvestre)**
FcγRI humano	5.8 nM (6 X)
FcγRIIa/131H humano	1000 nM(1.6X)
FcγRIIa/131R humano	650 nM (2.3 X)
FcγRIII/158F humano	27nM(122 X)
FcγRIII/158V humano	9.4 nM (70 X)
FcγRI murino	96 nM(14X)
FcγRIII murino	1700 nM (5 X)
FcγRIV murino	9.1 nM (260 X)

Ejemplo 5: Actividad funcional celular de 22B5/DLE

Bloqueo de Adhesión Celular

Se probó la capacidad de 22B5/DLE para interrumpir adhesión celular mediada por integrina α5β1. Los ensayos de adhesión celular se realizaron mediante pre-incubación de células HUVEC con un anticuerpo (variantes de las subclases 22B5/DLE, 22B5 IgGl, IgG2 y IgG4, o un

mAb de control negativo (BHA2 IgGl)) y subsiguientemente sembradas en placas recubiertas con fibronectina (FN) o colágeno. Las células HUVEC (15.000) fueron mezcladas con anticuerpo en buffer de adhesión (solución salina amortiguada con Hepes conteniendo glucosa y albúmina de suero bovino) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Las células se agregaron a los pozos de placas de 96-pozos recubiertas con fibronectina o colágeno, y se dejaron adherir a la placa durante una hora a 37°C / 5% CO_2. Las células no adherentes fueron removidas lavando cada pozo tres veces. Se midió la cantidad de células adherentes restantes en cada pozo. Las células adherentes se expusieron a lisis mediante la adición de un buffer conteniendo el tinte CyQUANT GR y se midió la fluorescencia a Ex/Em: 485/535 nm con un lector de placas. Como se puede observar en la Figura 6, mAbs de la integrina α5β1 bloqueador de función selectivamente inhibió la adhesión HUVEC a fibronectina, pero no a colágeno (control negativo). Como se muestra en la Figura 6, el IC50 para 22B5/DLE y su variantes de subclase (IgGl tipo silvestre, IgGl DLE, IgG2, y IgG4) fueron similares en este ensayo de una hora. Estos datos demuestran que la unión del anticuerpo con α5 y/o α5β1 inhibe la unión de la integrina con fibronectina. Estos datos además indican que el anticuerpo fija α5β1 cuando se expresa sobre la superficie de las células. Es decir, el epítopo reconocido por el anticuerpo está disponible cuando las cadenas α5 y β1 son asociadas y el epítopo es disponible para unión cuando la integrina es expresada sobre la superficie celular.

Ejemplo 6: Funciones efectoras ADCC In-vitro

Las actividades de funciones efectoras fueron evaluadas a través de ensayos ADCC en la presencia de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMCs) contra células diana α5β1-positivas utilizando métodos estándares. Se midieron los niveles de expresión de la integrina α5 a través de un rango de líneas celulares mediante análisis Western blot, como sigue. Las células fueron expuestas a lisis en Buffer de Lisis RIPA (Upstate) conteniendo proteasa (Roche) e inhibidores de fosfatasa (Calbiochem). Los lisados (3 μg de proteína total cada uno) fueron sometidos a electroforesis sobre gel SDS-PAGE e inmunotransferidos con anticuerpos α5 anti-integrina. Las bandas inmunoreactivas se identificaron y analizaron mediante el Sistema de Imágenes Infrarrojas de LI-COR Bioscience. Un ejemplo del rango de expresión se muestra en la Figura 7.

Para medir ADCC, se aislaron células efectoras (PBMCs) utilizando centrifugación gradiente Ficoll desde muestras del Banco de Sangre de San Diego, según métodos estándares.

Diez mil células diana (HUVEC o líneas tumorales) fueron pre-incubadas con anticuerpo en medio de crecimiento a temperatura ambiente durante 20 minutos, luego se agregó un millón de PBMCs humanas (E:T=100:1), y la mezcla se incubó a 37°C/5% CO_2 durante 4 horas. La lisis celular mediada por ADCC fue medida utilizando detección de liberación de deshidrogenasa de lactato (LDH) (Roche) o el Kit ToxiLight BioAssay (Cambrex), siguiendo protocolos estándares.

22B5/DLE se fija a tumor o integrina α5β1 endotelial expresada y promueve ADCC (hasta 80% de lisis de células diana) con un EC_{50} de 0.04 nM comparado con 0.23 nM para peso molecular de IgGl 22B5. Estos datos indican que la mutación DLE aumentó la actividad ADCC en comparación con IgGl tipo silvestre. No se observó ADCC para 22B5 IgG2 o 22B5 IgG4 en el ensayo de cuatro horas. KLH IgGl se utilizó como un aAb de control negativo. Los ejemplos de ADCC en HUVEC y una línea tumoral representativa (U87MG) son mostrados en la Figura 8 (representativos de ambos métodos de detección).

La citotoxicidad celular inducida por 22B5/DLE y el peso molecular de IgGl 22B5 se correlacionan con el nivel de expresión de α5β1 mediante la línea celular, como se muestra según los datos proporcionados en la Figura 9. Las células con expresión más alta de α5β1 (panel A, U87MG) demostró el nivel más alto de citotoxicidad celular, mientras las líneas celulares con expresión media (Figura 9, Hs578T y 3T3, α5) demostraron citotoxicidad intermedia. Notablemente, 22B5/DLE aumentó los efectos de ADCC en células M24met, las cuales expresaron bajo nivel de α5β1 (ejemplos en el panel inferior de la Figura 9). Estos datos demuestran que ADCC es mediado, al menos en parte, por unión de anticuerpos con α5β1 expresado por la célula.

Ejemplo 7: Eficacia Anti-metastática In vivo

Además de sus actividades de pro-proliferación, pro-migración y pro-supervivencia en células endoteliales y tumorales, la integrina α5β1 también está implicada en metástasis tumoral al promover extravasación y migración de células tumorales hacia órganos distantes. El siguiente estudio apuntó para demostrar la eficacia anti-metastática de 22B5/DLE en un modelo preclínico.

Inhibición de Metástasis Experimental A549-Luc al Pulmón

A549-Luc es una línea celular humana de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) transfectada con el gen de luciferasa. Cuando se implanta de manera intravenosa, esta

se localiza preferiblemente en el pulmón, la cual se puede medir mediante visualización por bioluminiscencia (BLI). En este estudio, las células A549-Luc se inyectaron ($3x10^6$ por animal) vía la vena de la cola en ratones SCID BALB/c que recibieron una pre-dosis del anticuerpo relevante dos días antes de la inyección. Después del implante, los animales se dosificaron una vez por semana hasta la semana 8. La bioluminiscencia de animales individuales se midió una vez por semana hasta la semana 20.

22B5/DLE exhibió eficacia de metástasis anti-tumoral superior con un TGI (inhibición de crecimiento tumoral) de 97% en la semana 8 (semana final de dosificación), la cual es estadísticamente significativa ($p<0.01$) comparada con el grupo de control. La dosificación con 22B5 IgG2, la cual se esperó que no mediara ADCC en este modelo, también logró un TGI significativo de 89% en la semana 8 (Figura 10A). Los valores p de la comparación entre 22B5/DLE y 22B5 IgG2 en las semanas 5, 6, 7, y 8 fueron 0.07, 0.03, 0.08 y 0.17, respectivamente. Todos los tratamientos fueron detenidos después de la semana 8 mientras el monitoreo diario por signos fisiológicos adversos y mediciones semanales por BLI de los animales, continuaron.

Los tumores en el grupo tratado con 22B5/DLE permanecieron suprimidos en la semana 13, mientras aquellos en el grupo tratado con 22B5 IgG2 comenzaron a crecer rápidamente aproximadamente 2 semanas después de concluir la dosificación (Figura 10B). El punto final del estudio se consideró alcanzado cuando BLI tumoral alcanzó 1x10 fotones/segundo, en cuyo tiempo los ratones fueron sacrificados. La grafica Ka plan-Mecer (Figura 10C) muestra que 22B5/DLE extendió significativamente el tiempo de supervivencia medio de los animales a 20 semanas en comparación con 14 semanas para animales tratados con 22B5 IgG2 y 10 semanas para el grupo de control.

Estos datos demuestran que en este modelo, el efecto anti-tumoral de 22B5 no es exclusivamente mediado por ADCC. Es decir, 22B5-lgG2 inhibió crecimiento/invasión tumoral aún cuando IgG2 humano no es conocido por mediar las funciones efectoras, incluyendo citotoxicidad celular, y aún los efectos anti-tumorales mediados por el anticuerpo. Además, los datos demostraron que el crecimiento tumoral permaneció suprimido después de detener la administración de 22B5-IgGl-DLE. Estos datos muestran que bloquear la unión de $\alpha5\beta1$ FN media un efecto anti-tumoral (22B5-IgG2) el cual además es aumentado por ADCC (22B5-IgGl/DLE).

Ejemplo 8: Caracterización estructural de Anticuerpos monoclonales humanos 24C7, ID9, y 2D2

Las secuencias de ADNc que codifican las regiones variables de cadena pesada y liviana de los anticuerpos monoclonales 24C7, 1D9, y 2D2 fueron obtenidas a partir de los hibridomas 24C7, 1D9, y 2D2 (respectivamente) utilizando técnicas PCR estándares y fueron secuenciadas utilizando técnicas estándares de secuenciamiento de ADN.

Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena pesada de 24C7 son mostradas en las Figuras IE y SI y en SEQ ID NO: 21 y 19, respectivamente. Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena liviana de 24C7 son mostradas en las Figuras IG y 1H y en SEQ ID NO: 22 y 20, respectivamente.

Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena pesada de 1D9 son mostradas en Figuras II y 1J y en SEQ ID NO: 31 y 29, respectivamente. Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena liviana de 1D9 son mostradas en Figuras IK y 1L y en SEQ ID NO: 32 y 30, respectivamente.

Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena pesada de 2D2 son mostradas en Figuras 1M y EN y en SEQ ID NO: 41 y 39, respectivamente. Las secuencias nucleotidas y aminoácidas de la región variable de cadena liviana de 1D9 son mostradas en Figuras 10 y IP y en SEQ ID NO: 42 y 40, respectivamente.

La subclase de las moléculas originales 24C7, 1D9, y 2D2 fue IgGl. Para la subclase IgG1, se introdujeron tres mutaciones en la región constante IgGl (S247D, A338L, y I340E) mediante mutagénesis sitio- dirigida para aumentar adicionalmente la unión a FcγRs y la actividad de la función efectora. Así, 24C7 con la subclase IgG1 y conteniendo estas tres mutaciones se conoce como "24C7/DLE" o "24C7 IgGl DLE". De manera similar, anticuerpos análogos con estas tres mutaciones son conocidos en la presente como "1D9/DLE" o "1D9 IgGl DLE", y "2D2/DLE" o "2D2 IgGl DLE". De manera similar, los anticuerpos con las dos mutaciones S247D y I340E son conocidos en la presente como mutantes "DE", ej. "24C7/DE", o "24C7 IgGl DE". Designaciones similares para cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente y con cualquiera de las una, dos, o tres mutaciones mencionadas anteriormente, son conocidas en una forma similar. Por ejemplo, "1D9/DE" se refiere al anticuerpo 1D9 como se describió en la presente, con una subclase IgGl con las siguientes mutaciones en la región Fc -

S247D y I340E. De manera similar, "2D2/L" se refiere al anticuerpo 2D2 como se describió en la presente, con un isotipo IgGl y conteniendo la mutación A338L, y así sucesivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 24C7 con las secuencias conocidas de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada 24C7 utiliza un segmento VH a partir de la línea germinal humana VH 3-30.3, un segmento D a partir de la línea germinal humana 7-27, y un segmento JH a partir de la línea germinal humana JH 6b. El análisis de la secuencia 24C7 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones CDR1, CDR2 y CD3 de cadena pesada como se muestra en la Figura IF, y en SEQ ID NOs: 13, 14 y 15, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena liviana 24C7 con las secuencias conocidas de cadena liviana de inmunoglobulina humana de línea germinal demostró que la cadena liviana 24C7 utiliza un segmento VL a partir de línea germinal humana VK L6 y un segmento JK a partir de línea germinal humana JK 2. El análisis de la secuencia 24C7 VL utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de regiones de cadena liviana CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en Figura 1H, y en SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 1D9 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada 1D9 utiliza un segmento VH a partir de la línea germinal humana V_H 3-30.3, y un segmento JH a partir de línea germinal humana JH 6b. Al segmento D no se podría asignar un gen de línea germinal debido a las mutaciones extensas. El análisis de la secuencia 1D9 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en Figura 1 J, y en SEQ ID NO: 23, 24 y 25, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena liviana 1D9 con las secuencias conocidas de cadena liviana de inmunoglobulina humana de línea germinal demostró que la cadena liviana 1D9 utiliza un segmento VL a partir de línea germinal humana VK L6 y un segmento JK a partir de línea germinal humana JK 1. El análisis de la secuencia 1D9 VL utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de regiones de cadena liviana CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en Figura 1L, y en SEQ ID NO: 26, 27 y 28, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena pesada 2D2 con las secuencias de cadena pesada de inmunoglobulina de línea germinal humana demostró que la cadena pesada 2D2 utiliza un segmento VH a partir de línea germinal humana VH 3-30.3, un segmento D a partir de la línea germinal humana 7-27, y un segmento JH a partir de línea germinal humana JH 6b. El análisis de la secuencia 2D2 VH utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones de cadena pesada CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en la Figura 1N, y en SEQ ID NO: 33, 34 y 35, respectivamente.

La comparación de la secuencia de inmunoglobulina de cadena liviana 2D2 con las secuencias conocidas de cadena liviana de inmunoglobulina humana de línea germinal demostró que la cadena liviana 2D2 utiliza un segmento VL a partir de la línea germinal humana VK L6 y un segmento JK a partir de línea germinal humana JK 3. El análisis de la secuencia 2D2 VL utilizando el sistema Kabat de determinación de regiones CDR llevó a la delineación de las regiones de cadena liviana CDR1, CDR2 y CD3 como se muestra en Figura IP, y en SEQ ID NO: 36, 37 y 38, respectivamente. Una tabla que muestra la utilización de genes para los anticuerpos monoclonales 22B5, 2D2, 24C7, y 1D9 se muestra más adelante como la Tabla 3.

Tabla 3: utilización de genes

	Cadena pesada			Cadena liviana	
Anticuerpo	**VH**	**D**	**JH**	**VK**	**JK**
22B5	4-39	3-10	JH 6b	VkL6	JK 4
2D2	3-30.3	7-27	JH 6b	Vk L6	JK 3
24C7	3-30.3	7-27	JH6b	Vk L6	JK 2
1D9	3-30.3	No determinada	JH 6b	Vk L6	JK 1

Ejemplo 9: Caracterización de Especificidad de unión y Cinética de unión de Anticuerpos Monoclonales humanos 22B5, 24C7, 1D9, y 2D2

En este ejemplo, se examinó la especificidad de unión de los anticuerpos humanos anti-α5β1 22B5, 24C7, 1D9, y 2D2 de la subclase IgGl - con y sin las mutaciones IgGl DLE (es decir "22B5 Gl DLE", "22B5 Gl". "1D9 Gl DLE", "1D9 Gl" etc.) mediante citometría de flujo utilizando separación celular activada por fluorescencia (FACS).

Afinidad celular para Determinación α5β1 por FACS

Los anticuerpos 22B5/DLE, 24C7/DLE, 1D9/DLE, y 2D2/DLE fueron probados para su afinidad de unión a integrina α5 de superficie celular utilizando un ensayo FACS, empleando células que expresan integrina α5β1 humana endógena (HUVEC). Brevemente, las células fueron separadas utilizando tripsina-EDTA y lavadas con PBS fría. Después de alicuotar en placas de 96 pozos, las células fueron bloqueadas por suero e incubadas con diferentes concentraciones de mAb específico durante 1 hora a 4°C. Subsiguientemente, las células fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario κ anti-humano conjugado con el fluoroforo R-PE y analizado utilizando un citometro de flujo FACSCalibur. 10.000 eventos fueron recolectados para cada muestra sin aplicar ninguna selección de poblaciones. Para determinación K_D, la media geométrica de cada histograma de muestra fue calculada e ilustrada como una función de la concentración de mAb. La KD fue calculada después de ajustar a un modelo de equilibrio de dos estados. Los resultados se muestran en las Figuras 11A y 1 IB.

Ejemplo 10: Función efectora ADCC *In vitro* de Anticuerpos monoclonales humanos 22B5, 24C7, ID9, y 2D2

Las actividades de funciones efectoras fueron evaluadas a través ensayos de citotoxicidad mediados por células dependientes de anticuerpos (ADCC) como se describió anteriormente en el Ejemplo 6. Los valores EC_{50} para promover ADCC (hasta 80% de lisis de células diana) en una línea tumoral representativa (U87MG) son mostrados en la Figura 12 para los anticuerpos 1D9, 1D9/DLE, 2D2/DLE, 22B5/DLE, y 24C7/DLE.

Ejemplo 11: Eficacia anti-tumoral *In vivo* dependiente de ADCC en un modelo singenéico de melanona metastático

Para demostrar una respuesta específica a ADCC, el anticuerpo monoclonal humano 1D9/DLE (el cual se fija a α5β1 humano y murino pero no neutraliza funcionalmente α5β1) fue probado en un modelo de inhibición de crecimiento tumoral (TGI) en ratones singénicos con células efectoras inmunes intactas. Específicamente, la actividad anti-tumoral mediada por ADCC fue evaluada en un modelo de ratón singenéico en el cual las células de melanoma murino B16F10 expresaron α5β1. La línea de melanoma de ratón B16F10 que expresa integrina

α5 es altamente metastática y principalmente coloniza el pulmón una vez inyectada intravenosamente. Las células tumorales fueron inyectadas intravenosamente en ratones C57BL/6 de competencia inmunes. Las células B16F10 (2×10^3 por animal) fueron inyectadas vía la vena de la cola en ratones C57BL/6 huéspedes singenéicos pre-dosificados con anticuerpos (10 mg/kg, n=10 por grupo) 1 día antes de la inyección. Los animales fueron dosificados subcutáneamente con anticuerpo una vez a la semana para un total de 3 semanas. La animales fueron sacrificados y los pulmones fueron sometidos a resección el día 21.

Como se muestra por los resultados en la Figura 13, el anticuerpo 1D9/DLE produjo eficacia anti-tumoral *in vivo* significativa indicando que una respuesta ADCC sola es suficiente para producir TGI. Para delinear el impacto específico de ADCC en el modelo, los animales fueron tratados con 1D9 IgG2 (no conocido por mediar ADCC) y 1D9 IgGl DLE (isotipo IgGl con aumento de Fc en virtud de las mutaciones DLE). Se observó mayor eficacia anti-tumoral con 1D9 IgGl DLE que con 1D9 IgG2. Puesto que los pares de isotipos tienen secuencias aminoácidas idénticas en el dominio de unión de antígenos y actividades *in vitro*, los datos muestran que ADCC aumentó como resultado de mutaciones DLE responsables de la eficacia superior de 1D9 IgGl DLE.

Información de depósito

Los solicitantes han depositado las regiones variables de cadena pesada y liviana del anticuerpo designado como 22B5 en la presente con la Colección de Cultivos Tipo Americano (ATCC) Manassas, VA 20110-2209 U.S.A. La región 22B5 VH fue depositada en Julio 16, 2008, y se asignó el Número de Depósito ATCC PTA-9377. La región 22B5 VL fue depositada en Julio 16, 2008, y le fue asignada el Número de Deposito ATCC PTA-9377. Estos depósitos fueron hechos bajo las provisiones del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para la Propósito de Procedimiento de Patentes y las Regulaciones bajo el mismo (Tratado de Budapest). Estos depósitos serán mantenidos sin restricción en el depositario ATCC durante un periodo de 30 años, o 5 años después de la solicitud más reciente, o durante la vida efectiva de la patente, cualquiera que sea mayor, y serán reemplazados si los depósitos se vuelven no viables durante ese periodo. La disponibilidad de los materiales depositados no se considera como una licencia para practicar cualquier aspecto de la presente divulgación en contravención de los derechos otorgados bajo la autoridad de cualquier

gobierno según sus leyes de patentes. La anterior especificación escrita se considera suficiente para permitir a alguien con experiencia en el estado de la técnica practicar todos los aspectos de la presente divulgación. La presente divulgación no esta limitada en alcance por los materiales depositados puesto que la realización depositada tiene la intención de ser una ilustración simple de ciertos aspectos de la divulgación y cualquiera de los constructos que son funcionalmente equivalentes están dentro del alcance de esta divulgación. El depósito de material en la presente no constituye una admisión que la descripción escrita en la presente sea inadeacuada para permitir la práctica de cualquier aspecto de la divulgación, incluyendo el mejor modo del mismo, ni se debe considerar como limitante del alcance de las reivindicaciones a las ilustraciones específicas que representa. En realidad, varias modificaciones de la divulgación además de aquellas mostradas y descritas en la presente serán manifiestas para aquellos con experiencia en el estado de la técnica a partir de la anterior descripción y caerán dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

RESUMEN DE LISTADO DE SECUENCIAS (a.a. = aminoácido; n.a. = ácido nucleico)

SEQ ID NO:	SECUENCIA	SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	V_HCDR1 a.a. 22B5	23	V_HCDR1 a.a. 1D9
2	V_H CDR2 a.a. 22B5	24	VH CDR2 a.a. 1D9
3	V_H CDR3 a.a. 22B5	25	VH CDR3 a.a. 1D9
4	V_L CDR1 a.a. 22B5	26	V_LCDR1 a.a. 1D9
5	V_L CDR2 a.a. 22B5	27	V_L CDR2 a.a. 1D9
6	V_L CDR3 a.a. 22B5	28	V_L CDR3 a.a. 1D9
7	V_H a.a. 22B5	29	V_H a.a. 1D9
8	V_La.a. 22B5	30	V_La.a. 1D9
9	Heavy a.a. 22B5/DLE	31	V_H n.a. 1D9
10	Light a.a. 22B5	32	V,.n.a. 1D9
11	V_H n.a. 22B5		
12	V_L n.a. 22B5	33	V_H CDR1 a.a. 2D2
		34	V_H CDR2 a.a. 2D2
13	V_H CDR1 a.a. 24C7	35	V_H CDR3 a.a. 2D2
14	V_H CDR2 a.a. 24C7		
15	V_H CDR3 a.a. 24C7	36	V_LCDR1 a.a. 2D2
		37	V_L CDR2 a.a. 2D2
16	V_L CDR1 a.a. 24C7	38	V_L CDR3 a.a. 2D2
17	V_L CDR2 a.a. 24C7		
18	V,. CDR3 a.a. 24C7	39	V_H a.a. 2D2
		40	V_L a.a. 2D2
19	V_H a.a. 24C7	41	V_H n.a. 2D2
20	V,. a.a. 24C7	42	V_L n.a. 2D2

21	V_H n.a. 24C7	1 43	IgGl a.a. regiones constantes de cadena pesada con mutaciones A247D, A338L, y I340E
22	V_L n.a. 24C7	44	IgGl a.a. región constante de cadena liviana

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo monoclonal aislado, o una porción fijadora de antígenos del mismo, el cual:

(a) se fija a integrina humana α5β1 con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos; y

(b) es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

2. El anticuerpo de la reivindicación 1, el cual es un anticuerpo humano de longitud completa de la subclase IgGl.

3. El anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo o porción fijadora de antígenos se fija a integrina humana α5β1 con una K_D de $5 x10^{-8}$ M o menos.

4. Un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo que se fija a integrina humana α5β1 con una K_D de $1x10^{-7}$ M o menos y comprende una región variable de cadena pesada que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ IDNO:7.

5. El anticuerpo o porción fijadora de antígenos del mismo de la reivindicación 4 el cual comprende además una región variable de cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ ID NO:8.

6. Un anticuerpo monoclonal aislado o porción fijadora de antígenos del mismo el cual comprende:

(a) una región variable de cadena pesada CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 1;

(b) una región variable de cadena pesada CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 2;

(c) una región variable de cadena pesada CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 3;

(d) una región variable de cadena liviana CDR1 que comprende la SEQ ID NO: 4;

(e) una región variable de cadena liviana CDR2 que comprende la SEQ ID NO: 5; y

(f) una región variable de cadena liviana CDR3 que comprende la SEQ ID NO: 6.

7. El anticuerpo o porción fijadora de antígenos de la reivindicación 6, el cual comprende:

(a) una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 7; y

(b) una región variable de cadena liviana que comprende la secuencia aminoácida de SEQ ID NO: 8.

8. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo humano de longitud completa IgGl, y en donde al menos un aminoácido en la región Fc de dicho anticuerpo es mutado, y además, en donde dicho anticuerpo exhibe mayor ADCC que un anticuerpo idéntico en donde dicho, al menos un aminoácido, no es mutado.

9. El anticuerpo de la reivindicación 8, en donde la, al menos una mutación, ocurre en la posición aminoácida serina 247, alanina 338, o isoleucina 340.

10. El anticuerpo de la reivindicación 9, donde la, al menos una mutación, es seleccionada del grupo que consta de serina 247 al ácido aspártico (S247D), alanina 338 a leucina (A338L), e isoleucina 340 al ácido glutámico (I340E).

11. El anticuerpo de la reivindicación 10, en donde el anticuerpo comprende las mutaciones S247D, A338L, e I340E.

12. El anticuerpo de la reivindicación 6 donde dicho anticuerpo comprende una secuencia aminoácida de cadena pesada que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ ID NO: 9.

13. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia aminoácida de cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ ID NO: 10.

14. El anticuerpo de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo comprende una secuencia aminoácida de cadena pesada que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ ID NO: 9 y una secuencia aminoácida de cadena liviana que es al menos 90% idéntica a la secuencia aminoácida divulgada en la SEQ ID NO: 10.

15. Una composición que comprende el anticuerpo o porción fijadora de antígenos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

16. Una molécula aislada de ácido nucleico que codifica la cadena pesada y/o liviana de cualquiera de los anticuerpos, o porciones fijadoras de antígenos de los mismos de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

17. Un vector de expresión el cual comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 16.

18. Una célula hospedera la cual comprende el vector de expresión de la reivindicación 17.

19. Un método para preparar un anticuerpo anti- α5β1 o porción fijadora de antígenos del mismo, el cual comprende expresar el anticuerpo o porción fijadora de antígenos en la célula hospedera de la reivindicación 18.

20. Un método de inhibir el crecimiento de células tumorales que expresan integrina α5β1, el cual comprende colocar en contacto las células con el anticuerpo, o porción fijadora de antígenos del mismo, de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en una cantidad efectiva para inhibir el crecimiento de las células tumorales.

CAGCTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAG
ACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGGCTCCATCAGCAGTAGTA
GCTACTGGGGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG
ATTGGGAGTATCTACTATAGTGGGAGAAACTACAACAACCCGTCCCTCA
AGAGTCGAGTCACCATATCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCT
GAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCAGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAGACATTACTATGGTTCGGGGAGTTCCTACTACTACTACGATCTGGAC
GTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura 1A: Secuencia de ADN de región variable de cadena pesada 22B5 (SEQ ID NO: 11)

QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYWGWIRQPPGKGLEWIGSI
YYSGRNYNNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHYYGS
GSSYYYY DLD V WGOGTTVT V S S

Figura IB: Secuencia aminoácida de región variable de cadena pesada 22B5 (SEQ ID NO:7)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACT
TAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCTCAC
TTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA

Figura 1C: Secuencia de ADN de región variable de cadena liviana 22B5 (SEQ ID NO:12)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASOSVSSYLAWYOQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKV
EIK

Figura ID: Secuencia aminoácida de región variable de cadena liviana 22B5 (SEQ ID NO:8)

CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG

GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGTTAT
GCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATTTGATGGAAGCAATAAAAACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT
GCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTATGTATTACTGTGC
GAGAGAATACTGGGGAACCTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGGCCA
AGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura IE: Secuencia de ADN de región variable de cadena pesada 24C7 (SEQ ID NO:21)

QVQLVESGGGVVQPGRSLPvLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWV
AVISFDGSNKNYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARE
YWGTILY YGMDV WGQGTT VT V S S

Figura SI: Secuencia aminoácida de 24C7 región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 19)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAACTACT
TAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTACCAACTGGCCGTACAC
TTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

Figura IG: Secuencia de ADN de región variable de cadena liviana 24C7 (SEQ ID NO:22)

EIVLTOSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQORTNWPYTFGQGTK
LEIK

Figura 1H: Secuencia aminoácida de región variable de cadena liviana 24C7 (SEQ ID NO:20)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCCCTTCAGTACCTAT

GCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATATGATGGAAGCAATAAATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCT
GCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC
GAGAGAGTCCCCCCCCATCTACTACTACTACGGTATGGACGTCTGGGG
CCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA

Figura II: Secuencia de ADN de región variable de cadena pesada 1D9 (SEQ ID NO:31)

QVOLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFPFSTILAMHWVRQAPGKGLEWV
AVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE
SPPIYYYY GMDVWGQGTTVTVSS

Figura 1J: Secuencia aminoácida de región variable de cadena pesada 1D9 (SEQ ID NO:29)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCTACT
TAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGAC
GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Figura IK: Secuencia de ADN de región variable de cadena liviana 1D9 (SEQ ID NO:32)

EIVLTOSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCOORSNWPRTFGQGTKV
EIK

Figura 1L: Secuencia aminoácida de 1D9 región variable de cadena liviana (SEQ ID NO:30)

CAGGTGCAACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG
GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAGCTAT

GCTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG
GCAGTTATATCATTTGATGGAAGCACTAAATACTACGCAGACTCCGTGA
AGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGGATC
TGCAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCTCTGTATTACTGTG
CGAGAGAATACTGGGGAACCTACTACTACGGGACGGACGTCTGGGGCC
AAGGGACCACGGTCATCGTCTCCTCA

Figura 1M: Secuencia de ADN de región variable de cadena pesada 2D2 (SEQ ID NO:41)

QVOLVESGGGVVQPGRSLPvLSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEVW
AVISFDGSTKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLDLQMNSLRAEDTALYYCARE
YWGTILYYGTDVWGQGTTVIVSS

Figura EN: Secuencia aminoácida de 2D2 región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:39)

GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG
AAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAACAGCTACT
TAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCT
ATGATGCATCCAACAGGGCCACTGGCATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCA
GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTG
AAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGCGTAGCAACTGGCCTCGGAC
GTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA

Figura l0: Secuencia de ADN de 2D2 región variable de cadena liviana (SEQ ID NO:42)

EIVLTOSPATLSLSPGERATLSCRASOSVNSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDAS
NRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCOORSNWPRTFGQGTKV
EIK

Figura IP: Secuencia aminoácida de región variable de cadena liviana 2D2 (SEQ ID NO:40)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTILICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
DKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP

EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTILRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Figura 1Q: Secuencia aminoácida de región constante de cadena pesada IgGl con mutaciones S247D, A338L, y I340E en negrilla y subrayadas (SEQ ID NO:43)
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTILSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC

Figura 1R: Secuencia aminoácida de región constante de cadena liviana IgGl (SEQ ID NO:44)

V_H

```
     Germline     QLQLQESGP GLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWG WIRQPPGKGLEWI
22b5 I30S N33S    --------- ------------------------.---------------

     Germline     GSIYYSG STYYNPSLKS RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR
22b5 I30S N33S    -------RN -N-------------------------------------

     Germline     QYYYGSG SYYNYYYYYGMDV WGQGTTVTVSS
22b5 I30S N33S    H.------ ...S----DL-------------
```

V_κ

```
     Germline     EIVLTQSPA TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYD
22b5 I30S N33S    --------- ----------------------------------------

     Germline     ASNRATGIP ARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGG
22b5 I30S N33S    --------- ----------------------------------------

     Germline     GTKVEIK
22b5 I30S N33S    -------
```

Figure 2

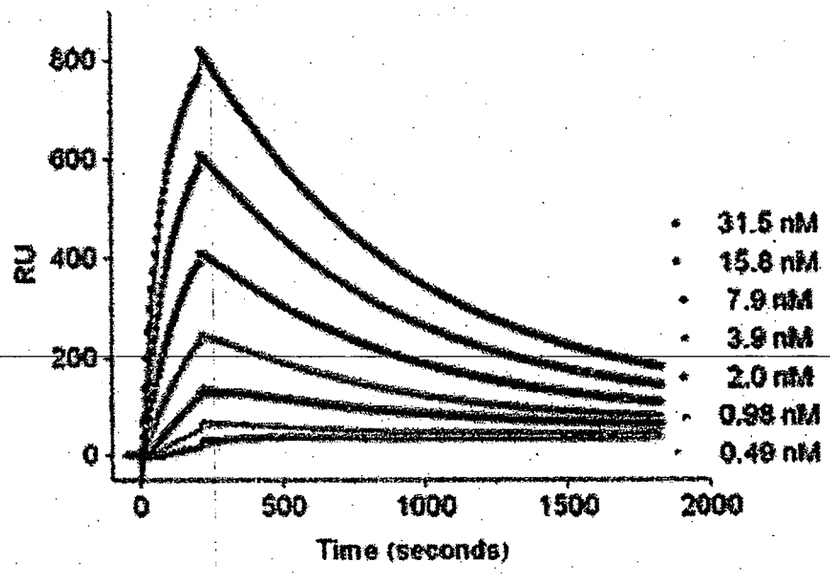

800
600
400
200
0
RU
0
500
1000
1500
2000
Time (seconds)
31.5 nM
15.8 nM
7.9 nM
3.9 nM
2.0 nM
0.98 nM
0.49 nM

Figure 3

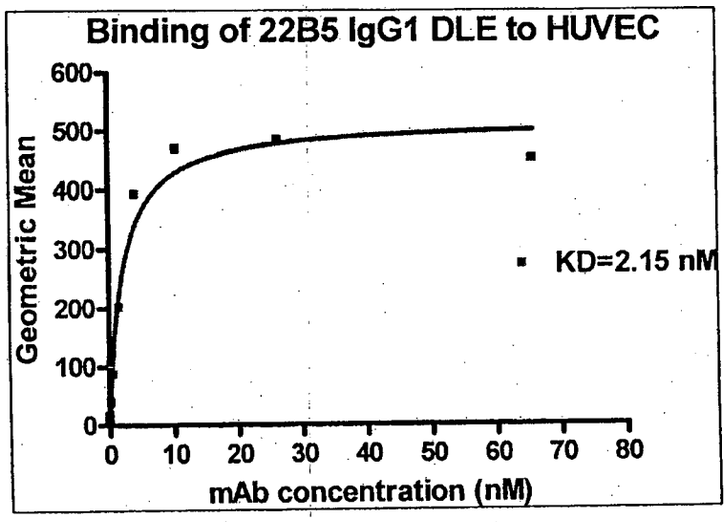

Binding of 22B5 IgG1 DLE to HUVEC
Geometric Mean
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
mAb concentration (nM)
KD=2.15 nM

Figure 4

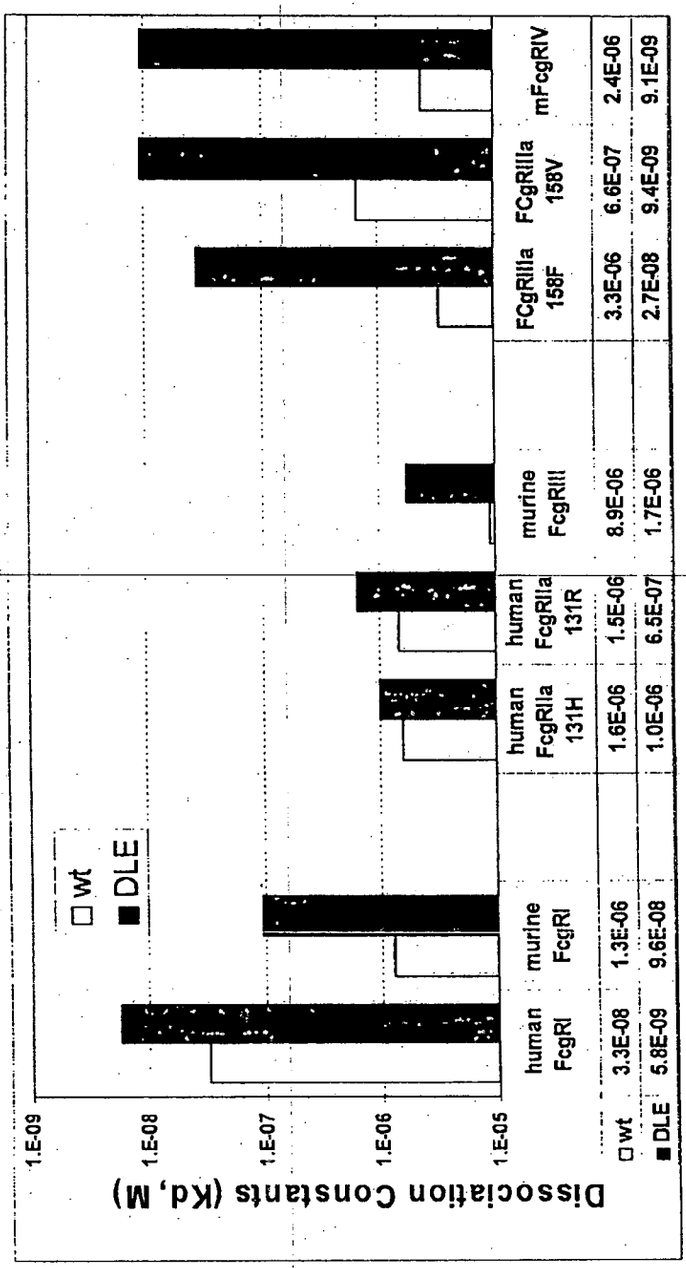
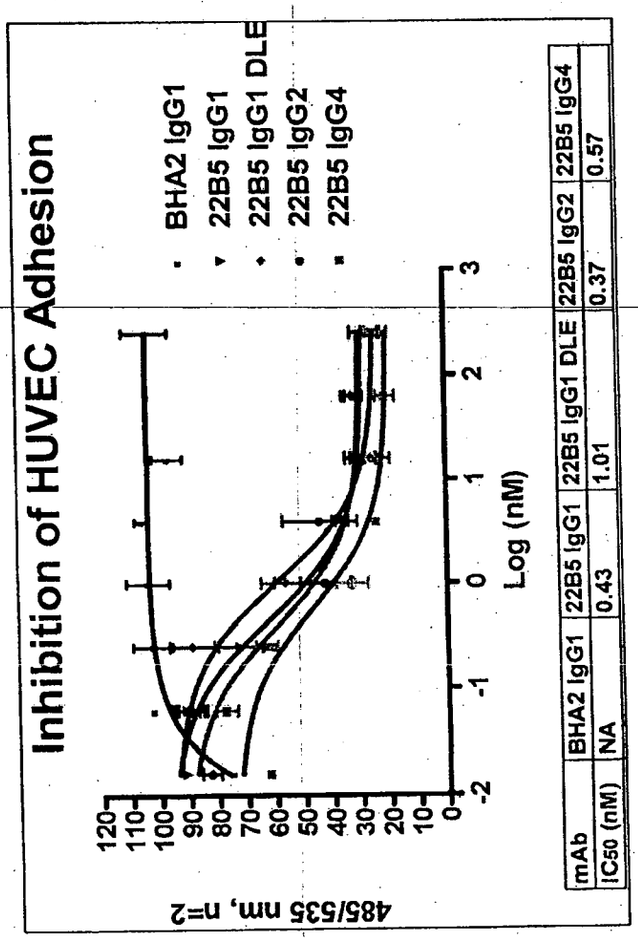

Dissociation Constants (Kd, M)
1.E-09
1.E-08
1.E-07
1.E-06
1.E-05
wt
DLE
human FcgRI
murine FcgRI
human FcgRIIa 131H
human FcgRIIa 131R
murine FcgRIII
FCgRIIIa 158F
FCgRIIIa 158V
mFcgRIV
wt 3.3E-08 1.3E-06 1.6E-06 1.5E-06 8.9E-06 3.3E-06 6.6E-07 2.4E-06
DLE 5.8E-09 9.6E-08 1.0E-06 6.5E-07 1.7E-06 2.7E-08 9.4E-09 9.1E-09

Figure 5



mAb	BHA2 IgG1	22B5 IgG1	22B5 IgG1 DLE	22B5 IgG2	22B5 IgG4
IC50 (nM)	NA	0.43	1.01	0.37	0.57

Figure 6

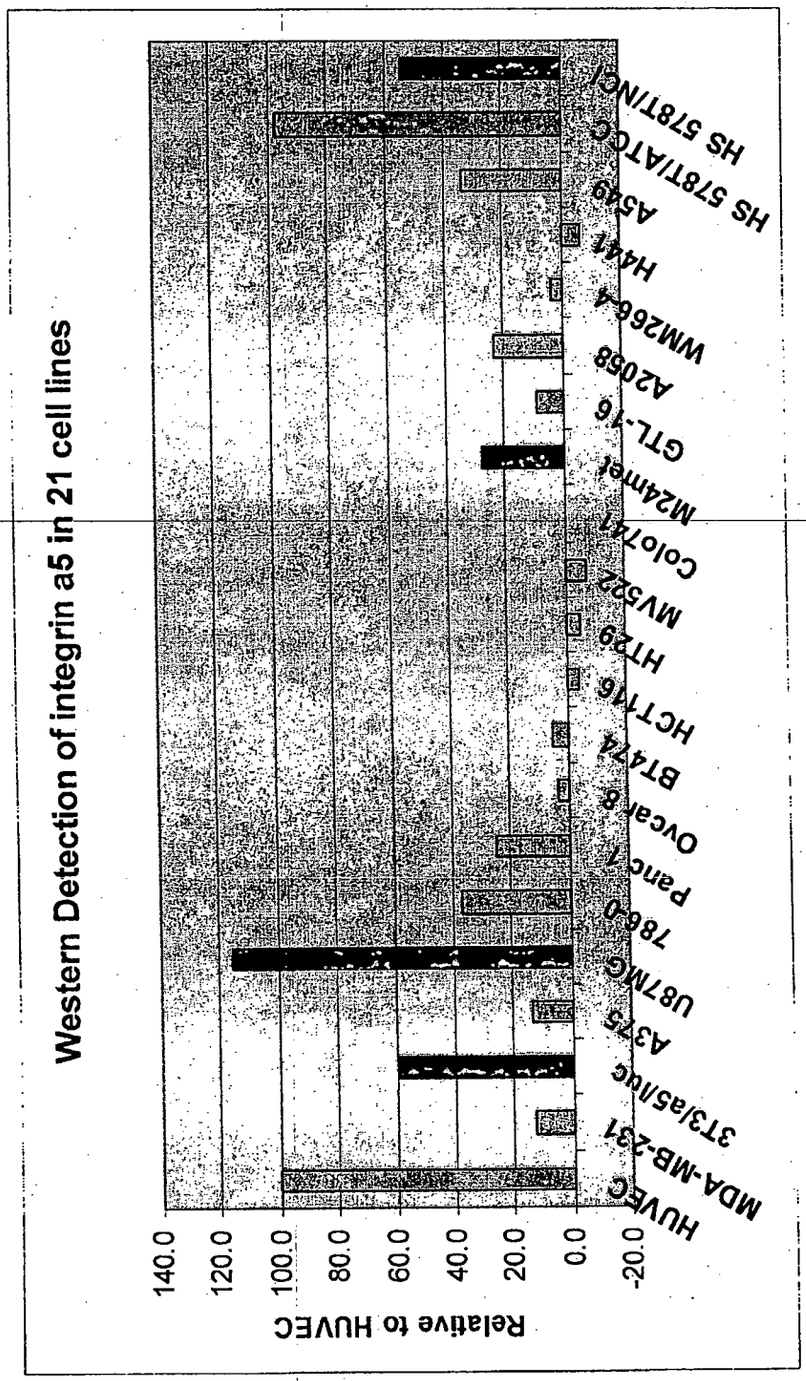

Western Detection of integrin a5 in 21 cell lines
Relative to HUVEC
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-20.0
HUVEC
MDA-MB-231
3T3/a5/luc
A375
U87MG
786-0
Panc-1
Ovcar-8
BT474
HCT116
HT29
MV522
Colo741
M24met
GTL-16
A2058
WM266-4
H441
A549
HS 578T/ATCC
HS 578T/NCI

Figure 7

mAb	KLH IgG1	22B5 IgG1	22B5 IgG1 DLE	22B5 IgG2	22B5 IgG4
EC50 (nM)	NA	0.23	0.04	NA	NA

Figure 8A

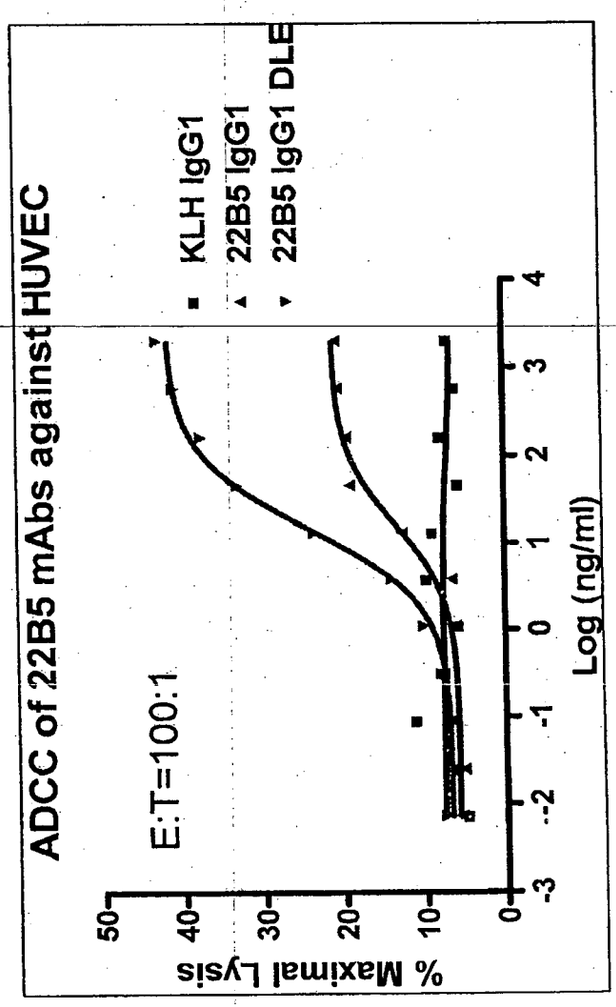

ADCC of 22B5 mAbs against HUVEC
E:T=100:1
KLH IgG1
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
Log (ng/ml)
50
40
30
20
10
0
-3
-2
-1
0
1
2
3
4

Figure 8B

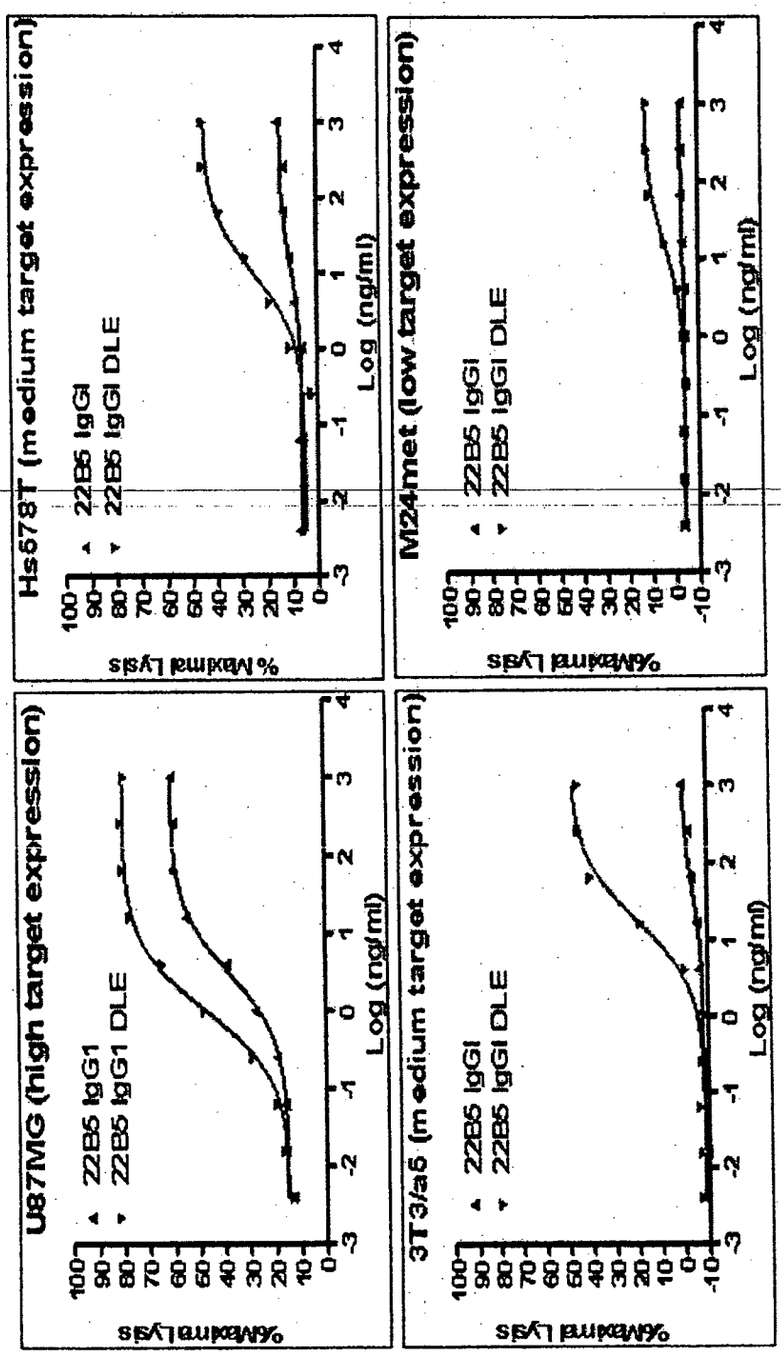

Hs678T (medium target expression)
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
Log (ng/ml)
M24met (low target expression)
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
Log (ng/ml)
U87MG (high target expression)
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
Log (ng/ml)
3T3/a5 (medium target expression)
22B5 IgG1
22B5 IgG1 DLE
% Maximal Lysis
Log (ng/ml)

Figure 9

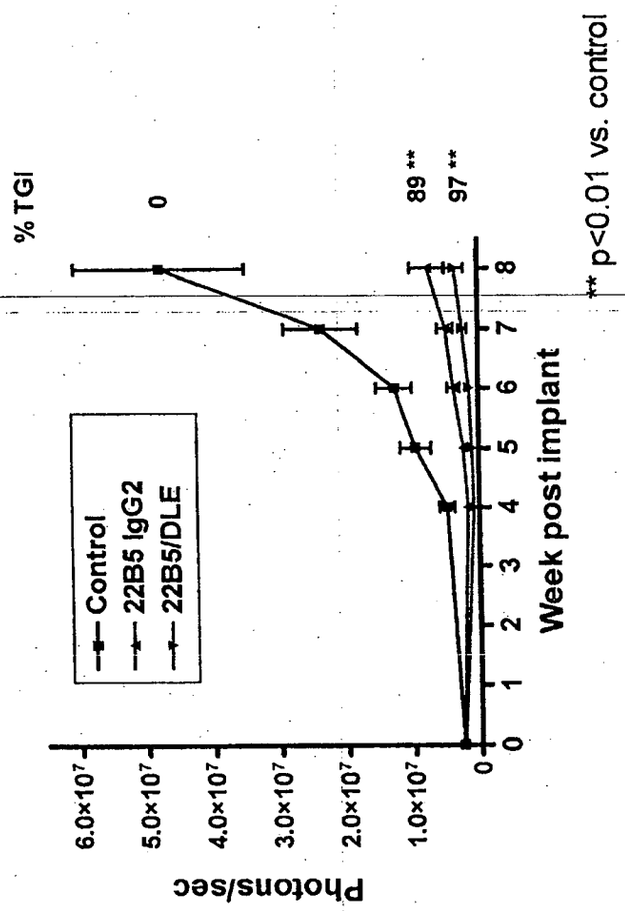

A
Photons/sec
6.0×10⁷
5.0×10⁷
4.0×10⁷
3.0×10⁷
2.0×10⁷
1.0×10⁷
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8
Week post implant
Control
22B5 IgG2
22B5/DLE
% TGI
0
89 **
97 **
** p<0.01 vs. control

Figure 10A

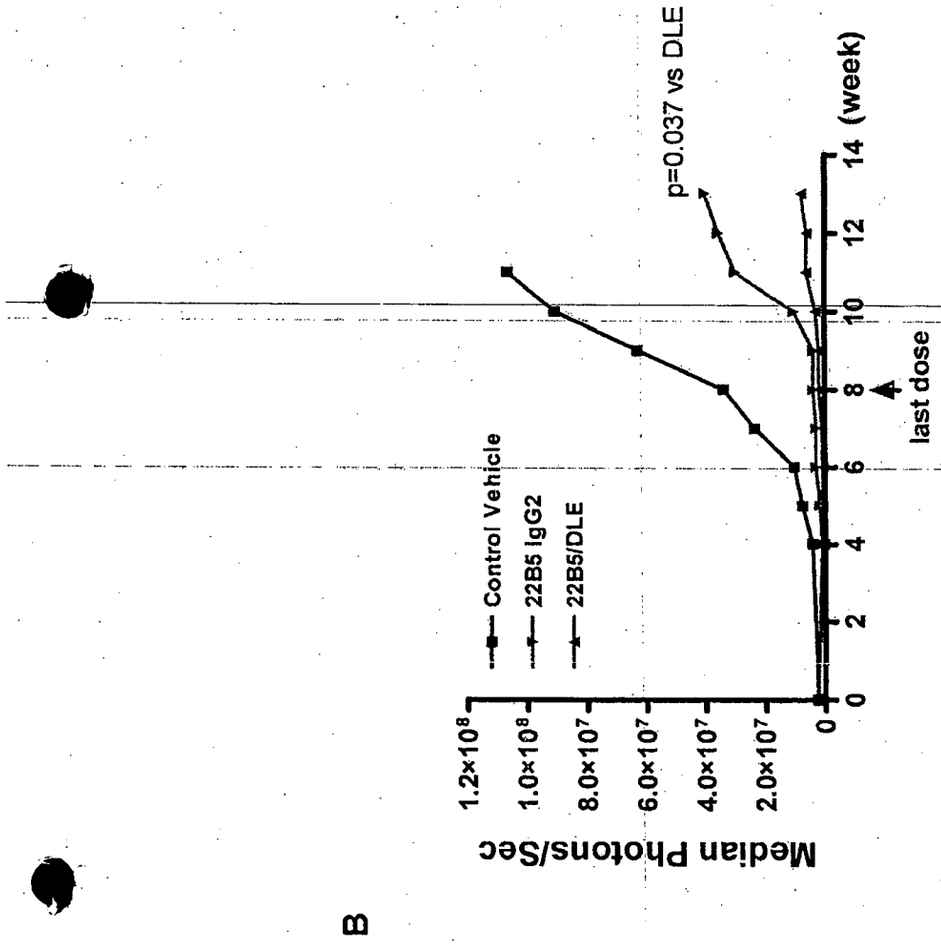
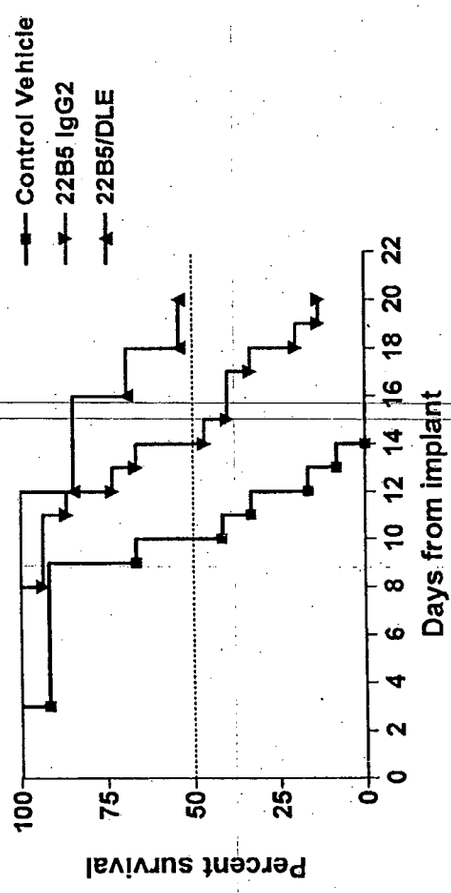
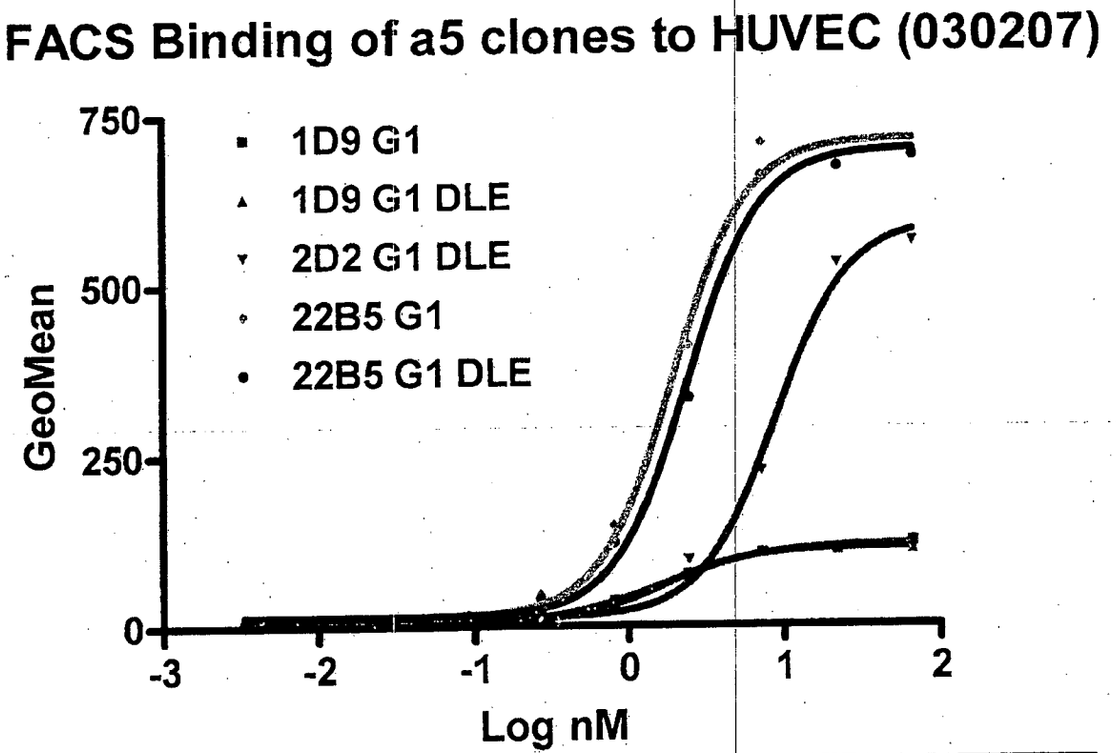

B
Median Photons/Sec
1.2×10^8
1.0×10^8
8.0×10^7
6.0×10^7
4.0×10^7
2.0×10^7
0
0
2
4
6
8
10
12
14 (week)
last dose
p=0.037 vs DLE
Control Vehicle
22B5 IgG2
22B5/DLE

Figure 10B


Control Vehicle
22B5 IgG2
22B5/DLE
Percent survival
100
75
50
25
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
Days from implant

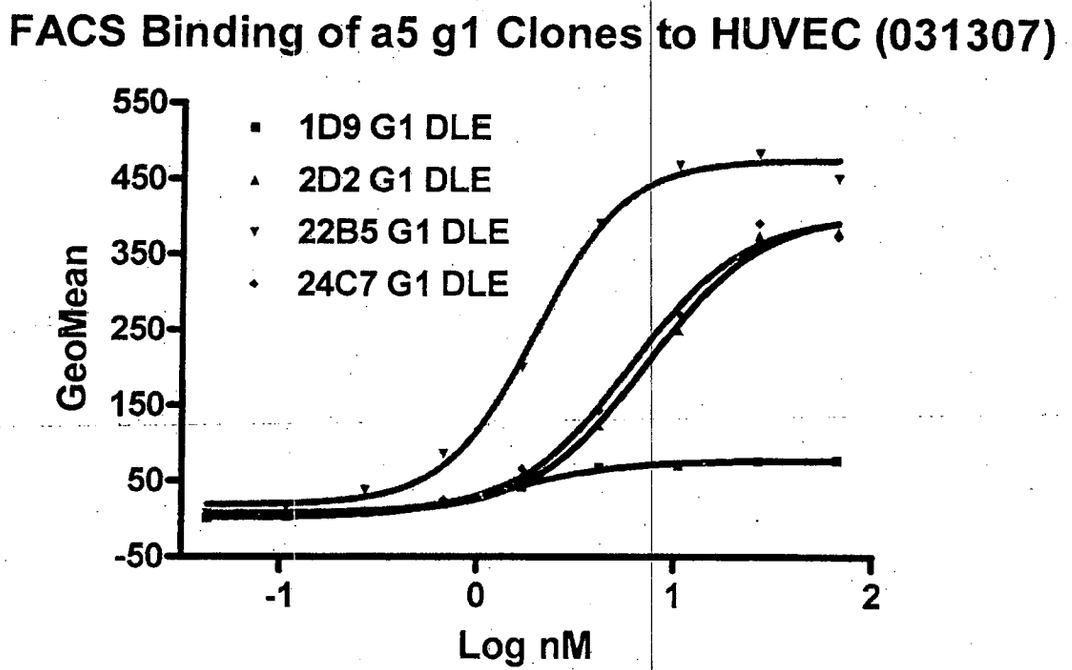
C

Figure 10C



mAb	1D9 G1	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1	22B5 G1 DLE
Kd (nM)	1.69	1.68	8.78	1.95	2.42
R^2	1.00	1.00	0.99	0.99	1.00

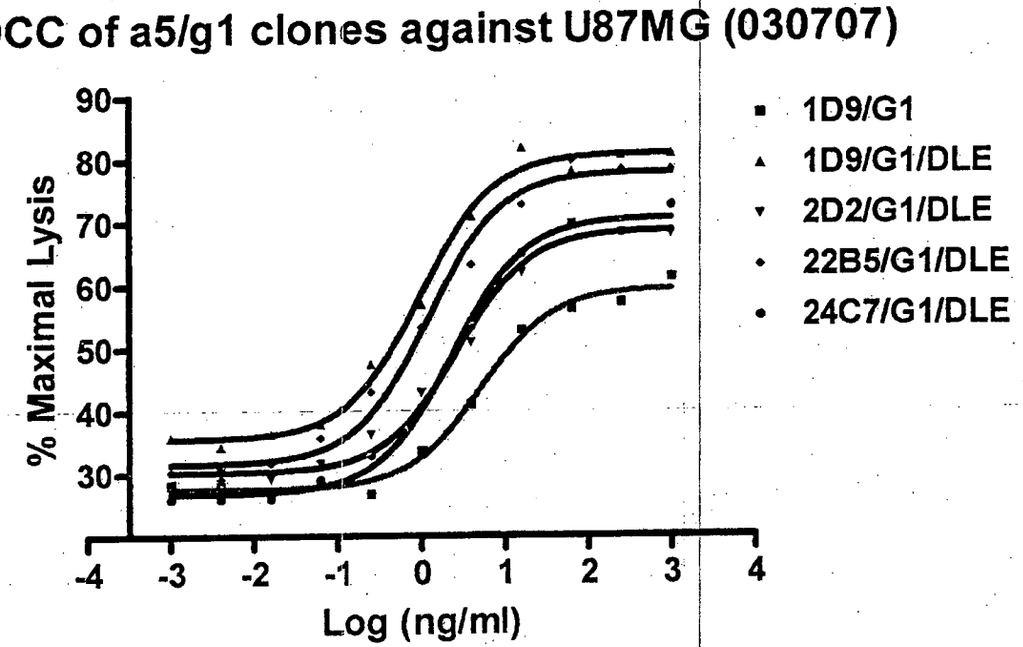
Figure 11A



mAb	1D9 G1 DLE	2D2 G1 DLE	22B5 G1 DLE	24C7 G1 DLE
Kd (nM)	1.49	7.32	1.99	6.08
R^2	1.00	1.00	1.00	0.99

Note: 24C7 unpurified

Figure 11B



mAb	1D9/G1	1D9/G1/DLE	2D2/G1/DLE	22B5/G1/DLE	24C7/G1/DLE
EC50 (ng/ml)	5.06	0.96	2.66	1.21	2.28
R^2	0.99	0.99	0.99	0.99	1.00

note: 24C7 unpurified

Figure 12

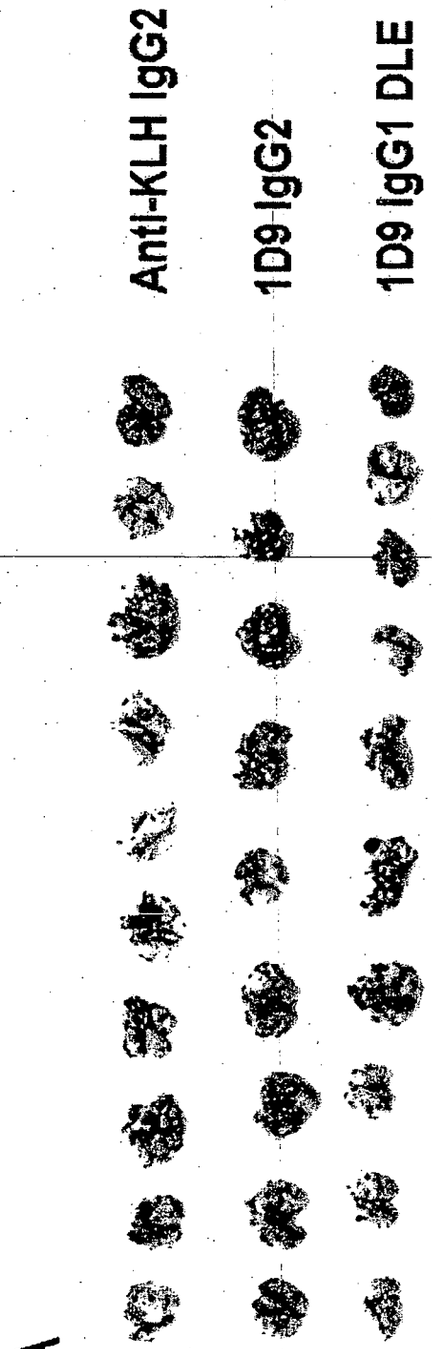


Figure 13 A

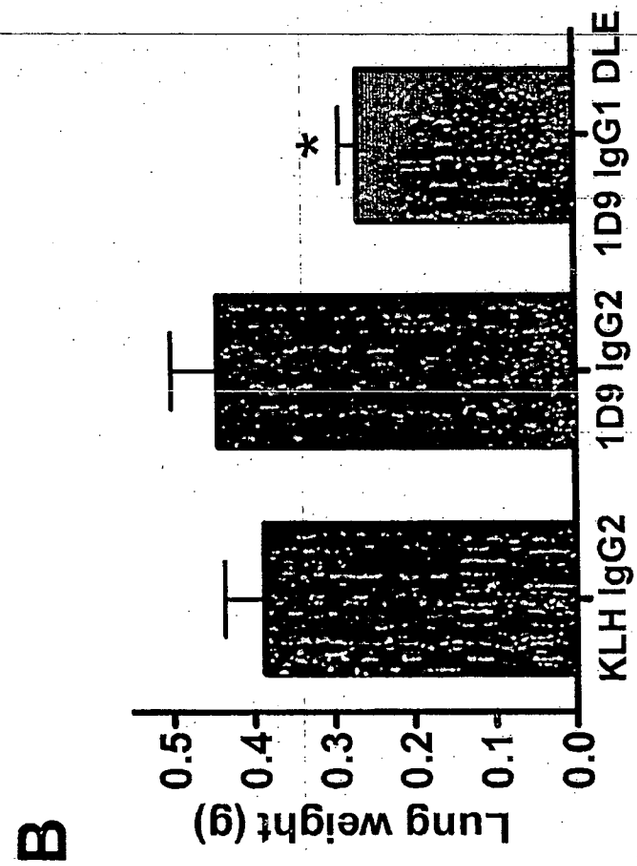


Figure 13 B

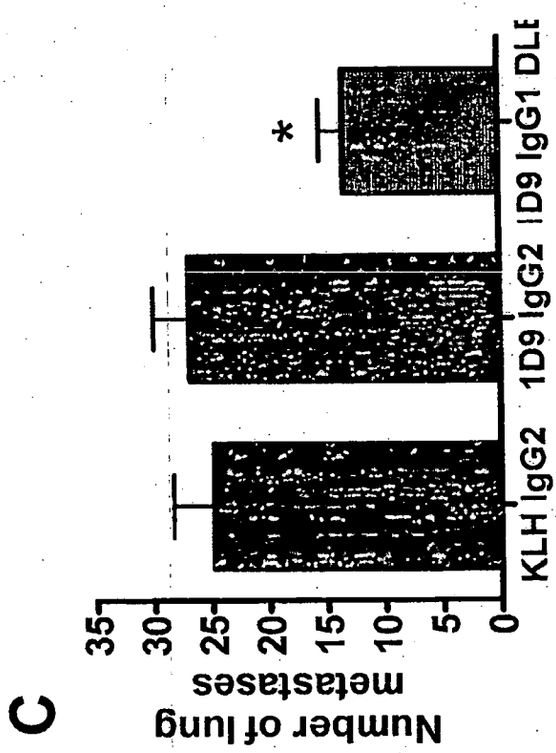

C
Number of lung metastases
35
30
25
20
15
10
5
0
KLH IgG2
1D9 IgG2
1D9 IgG1 DLE
*

Figure 13 C

SEQUENCE LISTING

<110> Pfizer Inc and Medarex, Inc.

<120> Alpha-5 Beta-1 Antibodies and Their Uses

<130> PC33646

<140> PCT/US2009/033042
<141> 2009/02/04

<150> US 61/095,429
<151> 2008/09/09

<150> US 61/026,027
<151> 2008/02/05

<160> 44

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Ser Ser Ser Tyr Trp Gly
1 5
11:13 06/05/2009

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu Asp
1 5 10 15

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 7
<211> 125
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 455
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Ser Tyr Trp Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Ser Ile Tyr Tyr Ser Gly Arg Asn Tyr Asn Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Gly Ser Gly Ser Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Asp Leu
100 105 110

Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
115 120 125

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser
130 135 140

Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
145 150 155 160

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
165 170 175

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
180 185 190

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
195 200 205

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu
210 215 220

Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
225 230 235 240

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
245 250 255

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
260 265 270

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
275 280 285

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
290 295 300

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315 320

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
325 330 335

Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
340 345 350

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
355 360 365

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
385 390 395 400

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
405 410 415

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
420 425 430

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
435 440 445

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 10
<211> 214
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 11
<211> 375
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 11
cagctgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagc agtagtagct actggggctg gatccgccag 120

cccccaggga aggggctgga gtggattggg agtatctact atagtgggag aaactacaac 180

aacccgtccc tcaagagtcg agtcaccata tccgtagaca cgtccaagaa ccagttctcc 240

ctgaagctga gctctgtgac cgccgcagac acggctgtgt attactgtgc gagacattac 300

tatggttcgg ggagttccta ctactactac gatctggacg tctggggcca agggaccacg 360

gtcaccgtct cctca 375

<210> 12
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 12
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Asn Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 20
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Thr Asn Trp Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 21
caggtgcagt tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agttatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcaa taaaaactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctatgt attactgtgc gagagaatac 300

tggggaacct actactacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 22
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 22
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc aactacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtaccaact ggccgtacac ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 23
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23

Ser Thr Tyr Ala Met His
1 5

<210> 24
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24

Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 29
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Ser Pro Pro Ile Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 30

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 366
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 31
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt ccccttcagt acctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atggaagcaa taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagagtcc 300

ccccccatct actactacta cggtatggac gtctggggcc aagggaccac ggtcaccgtc 360

tcctca 366

<210> 32
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 32
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

Ser Tyr Ala Met His
1 5

<210> 34
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34

Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35

Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val
1 5 10

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36

Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 38
<211> 9

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 39
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Ser Phe Asp Gly Ser Thr Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Trp Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Thr Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 41
<211> 363
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 41
caggtgcaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctatgcta tgcactgggt ccgccaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatttg atggaagcac taaatactac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctggat 240

ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctctgt attactgtgc gagagaatac 300

tggggaacct actactacgg gacggacgtc tggggccaag ggaccacggt catcgtctcc 360

tca 363

<210> 42
<211> 321
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 42
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttaac agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 43
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 44
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/033042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/134876 A (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; MORPHOSYS AG [DE]; MENRAD ANDREAS [GB];) 29 November 2007 (2007-11-29) page 19 - page 34 figures 1-18	1-7, 12-20 8-11
X Y	RAMAKRISHNAN V ET AL: "Preclinical evaluation of an anti-Alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent" JOURNAL OF EXPERIMENTAL THERAPEUTICS AND ONCOLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 5, no. 4, 4 May 2006 (2006-05-04), pages 273-286, XP008081487 ISSN: 1359-4117 page 275 figures 1-6	1-7, 12-20 8-11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 June 2009	22/06/2009

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Cilensek, Zoran

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/033042

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/092073 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; BHASKAR VINAY) 6 October 2005 (2005-10-06)	1-7, 12-20
Y	page 8, line 17 - line 28 page 27, line 7 - page 28, line 28 page 31, lines 6-28	8-11
Y	WO 2004/089988 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; JOHNSON DALE E [US]; JEFFRY URSULA [US]) 21 October 2004 (2004-10-21) paragraph [0143] figures 1-15	8-11
A	WO 01/04157 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA [US]) 18 January 2001 (2001-01-18) page 34 - page 36	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/033042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007134876 A	29-11-2007	AR 061107 A1	06-08-2008
		AU 2007253586 A1	29-11-2007
		CA 2652886 A1	29-11-2007
		EC SP088909 A	30-12-2008
		EP 2032605 A2	11-03-2009
		US 2009081207 A1	26-03-2009
		UY 30362 A1	02-01-2008
WO 2005092073 A	06-10-2005	AU 2005226736 A1	06-10-2005
		BR PI0509177 A	18-09-2007
		CA 2560508 A1	06-10-2005
		EP 1755659 A2	28-02-2007
		JP 2007530584 T	01-11-2007
		KR 20070009637 A	18-01-2007
WO 2004089988 A	21-10-2004	CA 2520121 A1	21-10-2004
		EP 1625165 A2	15-02-2006
		JP 2007524605 T	30-08-2007
WO 0104157 A	18-01-2001	AU 783019 B2	15-09-2005
		AU 6344700 A	30-01-2001
		CA 2379373 A1	18-01-2001
		CN 1379685 A	13-11-2002
		EP 1203025 A2	08-05-2002
		JP 2003508352 T	04-03-2003
		US 2006062777 A1	23-03-2006

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference	**FOR FURTHER ACTION**	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
M3248.0008-PC		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2009/033042	04/02/2009	05/02/2008
Applicant		
MEDAREX, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [ ] This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [ ] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 13C
      [X] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [ ] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2009/033042

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [X] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in electronic form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/033042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61K39/395 A61P35/00 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2007/134876 A (BAYER SCHERING PHARMA AG [DE]; MORPHOSYS AG [DE]; MENRAD ANDREAS [GB];) 29 November 2007 (2007-11-29) page 19 - page 34 figures 1-18	1-7, 12-20 8-11
X Y	RAMAKRISHNAN V ET AL: "Preclinical evaluation of an anti-Alpha5beta1 integrin antibody as a novel anti-angiogenic agent" JOURNAL OF EXPERIMENTAL THERAPEUTICS AND ONCOLOGY, RAPID SCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 5, no. 4, 4 May 2006 (2006-05-04), pages 273-286, XP008081487 ISSN: 1359-4117 page 275 figures 1-6	1-7, 12-20 8-11

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 June 2009	22/06/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Cilensek, Zoran

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2009/033042

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2005/092073 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; RAMAKRISHNAN VANITHA [US]; BHASKAR VINAY) 6 October 2005 (2005-10-06) page 8, line 17 - line 28 page 27, line 7 - page 28, line 28 page 31, lines 6-28	1-7, 12-20 8-11
Y	WO 2004/089988 A (PROTEIN DESIGN LABS INC [US]; JOHNSON DALE E [US]; JEFFRY URSULA [US]) 21 October 2004 (2004-10-21) paragraph [0143] figures 1-15	8-11
A	WO 01/04157 A (UNIV SOUTHERN CALIFORNIA [US]) 18 January 2001 (2001-01-18) page 34 - page 36	1-20

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2009/033042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007134876 A	29-11-2007	AR 061107 A1	06-08-2008
		AU 2007253586 A1	29-11-2007
		CA 2652886 A1	29-11-2007
		EC SP088909 A	30-12-2008
		EP 2032605 A2	11-03-2009
		US 2009081207 A1	26-03-2009
		UY 30362 A1	02-01-2008
WO 2005092073 A	06-10-2005	AU 2005226736 A1	06-10-2005
		BR PI0509177 A	18-09-2007
		CA 2560508 A1	06-10-2005
		EP 1755659 A2	28-02-2007
		JP 2007530584 T	01-11-2007
		KR 20070009637 A	18-01-2007
WO 2004089988 A	21-10-2004	CA 2520121 A1	21-10-2004
		EP 1625165 A2	15-02-2006
		JP 2007524605 T	30-08-2007
WO 0104157 A	18-01-2001	AU 783019 B2	15-09-2005
		AU 6344700 A	30-01-2001
		CA 2379373 A1	18-01-2001
		CN 1379685 A	13-11-2002
		EP 1203025 A2	08-05-2002
		JP 2003508352 T	04-03-2003
		US 2006062777 A1	23-03-2006

254

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2009/033042

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

BRADY, James, W.
Dickstein Shapiro LLP
1825 Eye Street, NW
Washington, DC 20006-5403
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing *(day/month/year)*
22 July 2010 (22.07.2010)

Applicant's or agent's file reference
M3248.0008-PC

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/US2009/033042

International filing date *(day/month/year)*
04 February 2009 (04.02.2009)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address

MEDAREX, INC.
Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08540
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☒ the name ☐ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address

BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY
Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08540
United States of America

State of Nationality	State of Residence
US	US

Telephone No.

Facsimile No.

E-mail address

☐ Notifications by e-mail authorized

3. Further observations, if necessary:
The request for recording of the above change was received by the International Bureau between 20 and 30 months from the priority date.

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☐ the Authority(ies) specified for supplementary search
☐ the International Preliminary Examining Authority
☒ the designated Offices concerned
☐ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 89 95

Authorized officer

Dezempte Anne

e-mail pt04.pct@wipo.int

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 10-110046- -00000-0000

Fecha: 2010-09-06 17:17:27 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 254

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 110046
	Solicitud internacional	PCT/US2009/033042
	Fecha inicio fase nacional	05/09/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	12047

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. El solicitante debe presentar un nuevo titulo que permita identificar la materia de la cual trata la solicitud, ya que el titulo relacionado no se encuentra con la precisión necesaria para identificar claramente el objeto de la solicitud de patente. (Regla 4.3 PCT, Art 26-27 D-486, Circular única 5.2.9)

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Continua en la página siguiente...

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 17 SET. 2010
adpa11

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Bogotá D.C.,
2020

Doctor(a)
OLARTE GARCIA CARLOS REYNALDO
Apoderado(a) y/o Representante de
PFIZER INC.

REFERENCIA	Radicación No.	10 110046
	Solicitud internacional	PCT/US2009/033042
	Fecha inicio fase nacional	05/09/2010
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	№ 12045

Teniendo en cuenta que el capítulo reivindicatorio presentado excede de diez reivindicaciones, es necesario que cancele la tasa establecida por cada reivindicación adicional presentada, de conformidad con lo dispuesto en la resolución de tasas vigente para la fecha de presentación de la solicitud, so pena de que no sean tenidas en cuenta dentro del presente trámite administrativo.

En consecuencia, con fundamento en lo previsto por el artículo 12 del Código Contencioso Administrativo, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio atienda el requerimiento aquí señalado. Lo anterior, con el alcance que para tal efecto establece el artículo 13 de la misma codificación, respecto de las reivindicaciones adicionales.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del titulo primero de la Circular Única N° 10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Directora de Nuevas Creaciones (c)

17 SET. 2010

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha_____.
adpa11