



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114380914 A

(43) 申请公布日 2022.04.22

(21) 申请号 202210054073.3

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22) 申请日 2016.06.24

代理人 张莉 黄革生

(30) 优先权数据

62/184,955 2015.06.26 US

62/341,568 2016.05.25 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/36 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201680048982.9 2016.06.24

(71) 申请人 诺华股份有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 J·埃德尔 S·埃韦特

U·哈西佩 Y·赫德尔

L·M·迈尔 S·梅尔科

N·希尔林

权利要求书4页 说明书74页

序列表25页 附图9页

(54) 发明名称

凝血因子XI抗体及使用方法

(57) 摘要

本发明涉及结合至人凝血因子XI及活化凝血因子XI (“凝血因子XIa”) 的单克隆抗体及其抗原结合片段, 及包含其的药物组合物及治疗方法。

1. 一种分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其片段,其结合在FXI和/或FXIa的催化结构域内。

2. 一种分离的抗体或其片段,其结合至抗FXI和/或FXIa的一或更多个表位,其中该表位包含下述氨基酸残基中的两个或更多个氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

3. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含下述氨基酸残基中的四个或更多个氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

4. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含下述氨基酸残基中的六个或更多个氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

5. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含下述氨基酸残基中的八个或更多个氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

6. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含以下残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

7. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及一或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

8. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及四个或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

9. 如权利要求2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及六个或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、

Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

10. 一种分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其片段,其结合在FXI和/或FXIa的催化结构域内,其中该抗体或片段阻断FXI和/或FXIa结合至凝血因子IX、凝血因子XIIa及凝血酶中的一个或多个。

11. 如权利要求10的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段阻断FXI和/或FXIa结合至凝血因子IX、凝血因子XIIa或凝血酶中的一个或多个及凝血途径的其他组分。

12. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段阻断FIX、FXI及FXIa中的一个或多个结合至血小板受体。

13. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段防止内在凝血途径或共同凝血途径的活化。

14. 一种分离的抗体或其片段,其以如BIAcore™测定所测量小于或等于34nM或如溶液平衡滴定分析(SET)所测定小于或等于4pM的 K_D 结合至人FXI和/或FXIa蛋白。

15. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含至少一个与表1中所述的CDR中的至少一个具有至少90%同一性的互补决定区。

16. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含来自表1的CDR1、CDR2及CDR3。

17. 一种如权利要求1的分离的抗体变体或片段,其中该抗体或片段包含来自表1的CDR1、CDR2及CDR3,且其中该变体在CDR1、CDR2或CDR3中的一个具有至少一至四个氨基酸改变。

18. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:5及25的重链CDR3。

19. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH,或与其具有90%同一性的氨基酸序列;及选自SEQ ID NO:19及39的VL,或与其具有90%同一性的氨基酸序列。

20. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH,或与其具有95%同一性的氨基酸序列;及选自SEQ ID NO:19及39的VL,或与其具有95%同一性的氨基酸序列。

21. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH,或与其具有97%同一性的氨基酸序列;及选自SEQ ID NO:19及39的VL,或与其具有97%同一性的氨基酸序列。

22. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的可变重链序列。

23. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:19及39的可变轻链序列。

24. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的可变重链;及选自SEQ ID NO:19及39的可变轻链序列。

25. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段选自以下:包含SEQ ID NO:9的可变重链及SEQ ID NO:19的可变轻链序列的抗体或片段,及包含SEQ ID NO:29的可变重

链及SEQ ID NO:39的可变轻链序列的抗体或片段。

26. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:46的重链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;选自5的重链可变区CDR3;选自SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;及选自SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

27. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:3及23的重链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:4及24的重链可变区CDR2;选自5及25的重链可变区CDR3;选自SEQ ID NO:13及33的轻链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:14及34的轻链可变区CDR2;及选自SEQ ID NO:15及35的轻链可变区CDR3。

28. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:6及26的重链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:7及27的重链可变区CDR2;选自8及28的重链可变区CDR3;选自SEQ ID NO:16及36的轻链可变区CDR1;选自SEQ ID NO:17及37的轻链可变区CDR2;及选自SEQ ID NO:18及38的轻链可变区CDR3。

29. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:3的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:13的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

30. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:23的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:24的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:34的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

31. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:6的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:7的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:8的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:16的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:17的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:18的轻链可变区CDR3。

32. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:26的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:27的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:28的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:36的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:37的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:38的轻链可变区CDR3。

33. 一种药物组合物,其包含如前述权利要求中任一项的抗体或其片段及可药用载体。

34. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段与如前述权利要求中任一项的分离的抗体或片段结合至相同的表位。

35. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段与如前述权利要求中任一项的分离的抗体或片段竞争结合至人FXI和/或FXIa蛋白。

36. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段选自NOV1090及NOV1401。

37. 一种治疗血栓栓塞病症的方法,其包含向罹患血栓栓塞病症的个体施用有效量的包含根据任何前述权利要求的抗体或片段的药物组合物。

38. 如权利要求37的方法,其中该个体罹患与心房纤维性颤动有关的缺血性中风及深层静脉血栓形成中的一个或多个。

39. 如权利要求37的方法,其中该个体罹患与心房纤维性颤动有关的缺血性中风。

40. 一种治疗血栓栓塞病症的方法,其包含向罹患血栓栓塞病症的个体施用有效量的

包含根据任何前述方面的抗体或片段的药物组合物与抑制素治疗组合。

41. 一种药物,其包含根据任何前述权利要求的抗体。

42. 一种核酸,其编码根据任何前述权利要求的抗体中的一个或多个。

43. 一种载体,其包含根据权利要求42的核酸。

44. 一种宿主细胞,其包含权利要求43的载体。

45. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至活性FXI (FXIa) 催化结构域时使FXIa构象变化为非活性构象,其中与活性构象相比N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或无序。

46. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI时防止FXI催化结构域呈现活性构象,其中环145、环188及环220按该FXIa催化结构域的结构中排列。

47. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI时防止该FXI催化结构域呈现活性构象,其中该N端4个残基、环145、环188及环220按该FXIa催化结构域的结构中排列。

48. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI时通过诱导酶原结构中的构象变化防止该FXI催化结构域呈现活性构象,进一步产生与结合至FXIa时所观察到的密切相关的抑制的FXI构象。

49. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI和/或FXIa且与该FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体:抗原复合物时,导致与该活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比,环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

50. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI和/或FXIa且与该FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体:抗原复合物时,导致与该活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比,N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

51. 如权利要求1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段结合至活性FXI (FXIa) 且导致FXI (FXIa) 催化结构域的构象变化为非活性构象,其中与该活性构象相比,环145、环188及环220发生移动和/或无序。

凝血因子XI抗体及使用方法

[0001] 本申请是申请日为2016年6月24日的、发明名称为“凝血因子XI抗体及使用方法”的中国专利申请201680048982.9 (PCT/IB2016/053790) 的分案申请。

[0002] 本申请要求2015年6月26日提交的美国临时申请第62/184,955号与2016年5月25日提交的美国临时申请第62/341,568号的权益,该临时申请中的每一个在此以全文引用的方式并入本文。

[0003] 本申请包含序列表,该序列表已由ASCII形式以电子方式提交,且其全部内容以引用的方式并入本文中。该ASCII复本于2016年6月23日产生,命名为“PAT056955_SL.txt”且大小为45,685个字节。

背景技术

[0004] 血栓形成(Thrombosis)是指在经历称为血栓形成倾向或凝固性过高状态的遗传性及获取性风险因子的组合之后,血管内部的血栓形成。血管壁损伤、淤滞、血小板反应性增加及凝血因子活化为血栓形成的一些基本特征。血栓形成可发生于静脉与动脉循环中且可导致发生深层静脉血栓形成(DVT)、肺栓塞及中风。若血栓发生于动脉系统中,则可发生下游局部缺血,从而导致急性冠状动脉综合征(ACS)、缺血性中风及急性肢体局部缺血。静脉系统中的血栓形成通常导致深度静脉血栓形成、肺栓塞及慢性血栓栓塞肺高血压。血凝块也可形式于心房纤维性颤动(AF)患者的左心耳中,且移位性血栓可导致潜在破坏性并发症,也即血栓栓塞中风及全身栓塞。包括低分子量肝素(LMWH)、凝血酶抑制剂及凝血因子Xa(FXa)抑制剂的当前可用的抗血栓药物均与重大出血风险有关(Weitz J.I. (2010) Thromb.Haemost.103,62)。极其需要不影响止血且因此不会导致出血并发症的抗血栓药物的开发。

[0005] 当前抗促凝剂注射或口服使用。可注射抗促凝剂LMWH已广泛使用且改进先前引用的未分化肝素的治疗状况。对于过去的几十年,最常用的口服抗促凝剂为华法林(warfarin)。华法林具有狭窄治疗窗,其需要频繁监测凝血状态,且显示多种药物间相互作用。最近,经口可用的直接FXa及凝血酶抑制剂进入抗促凝剂市场且逐渐得以应用。

[0006] LMWH、FXa抑制剂及凝血酶抑制剂在预防手术后静脉血栓栓塞疾病中、在治疗自发性DVT及在肺栓塞中及在心房纤维性颤动的中风预防中均有效。然而,这些抗促凝剂也与出血并发症有关,该并发症通常与在早期药物华法林及未分化肝素观察到的那些并发症相当。在ADVANCE-2临床试验中,将FXa抑制剂阿派沙班(apixaban) (艾乐妥(Eliquis))与LMWH依诺肝素(enoxaparin)在全膝置换后的患者中相比。尽管与依诺肝素相比急性阿派沙班治疗对预防静脉血栓栓塞疾病更有效,两种药物与重大出血风险有关。临床上相关的出血出现于4%的接受阿派沙班的患者及5%的用依诺肝素治疗的患者中(Lassen,M.R.等人,(2009)N.Engl.J.Med.361,594)。

[0007] 在RE-LY试验中,在具有心房纤维性颤动及中风风险的患者中将直接凝血酶抑制剂达比加群(dabigatran) (泰毕全(Pradaxa))与华法林相比(Connolly,S.J.等人,(2009)N.Engl.J.Med.361,1139)。慢性达比加群治疗与显著较低的中风风险或全身栓塞有关。然

而,主要出血并发症出现于3.1%的每天接受150mg达比加群的患者及3.4%的接受华法林($p=0.31$)的患者中。

[0008] 心房纤维性颤动(AF)仍为临床实践中最常见的心律不整,占因心脏性节律不整住院的大约三分之一。目前,估计影响欧洲超过600万患者及美国大约230万患者,且此数目因老龄化群体的比例增大而持续快速增长。估计大约5%的超过65岁群体及10%的超过80岁的人将发生AF,然而AF的发病数增大超过单独由年龄所解释的发病数。诸如高血压、充血性心脏衰竭、左心室肥大、冠状动脉疾病及糖尿病及阻塞性睡眠呼吸暂停的AF风险因子也有增加。同样,在接下来的三十年西方群体中受影响AF个体的数量预计以增两至三倍。(Kannel及Benjamin(2008) *Med Clin North Am*. 2008;92:17-40;Bunch等人, (2012) *J Innovations of Card Rhythm Manag* 2012;3:855-63)。

[0009] AF的主要风险在栓塞中风增加四至五倍。在80至89岁,与AF有关的中风的可归因风险随着年龄增长大幅度增加至23.5%。在两种性别中AF与死亡的倍增相关(Kannel及Benjamin 2008)。AF也独立地与认知下降及所有形式的痴呆有关(Marzona等人, (2012) *CMAJ* 2012;184:329-36;Geita等人2013;Bunch等人2012)。

[0010] 大部分AF患者需要终生抗凝治疗以预防心因性中风及全身栓塞。CHA₂DS₂-VASc风险评分为确定并且广泛使用的层次化工具以预测心房纤维性颤动患者的血栓栓塞风险且鉴别应受益于抗凝治疗的患者(LIP 2011;Camm等人, (2012) *Eur Heart J* 2012;33:2719-2747);积累的证据表明在鉴别发生中风及血栓栓塞的患者中CHA₂DS₂-VASc与诸如CHADS₂的评分至少一样精确或可能更佳,且对于鉴别“真正低风险”AF患者确定更佳。估计85至90%的AF患者需要抗凝治疗。

[0011] 在评估维生素K拮抗剂(VKA)减轻中风及全身栓塞的作用的包含6次试验的综合分析中,观察到极显著的发生中风的风险降低(中风的相对风险降低67%)。相对于对照,通过剂量调节的VKA全因死亡率显著降低(26%) (Hart, Pearce及Aguilar (2007) *Ann Intern Med* 2007;146:857-867)。2与3之间的国际标准化比(INR)目标与最佳益处风险比有关(Hylek等人(2003) *N Engl J Med*;349:1019-1026)且国际及国内标准普遍采用。

[0012] 在最近几年中,也称为直接口服抗凝剂(DOAC)的新颖口服抗凝剂(NOAC)已获批准并且引入临床实践中。与华法林相比,对于减轻血栓栓塞疾病,这些药物至少有效或甚至更佳(Connolly等人, (2009) *N Engl J Med*;361:1139-51;Connolly等人, (2011) *N Engl J Med*;364:806-17;Patel等人, (2011) *N Engl J Med* 2011;365:883-91)。NOAC也与华法林的最具破坏性的并发症,也即出血性中风及颅内出血的大大减轻有关。主要出血事件类似于或略低于充分进行的华法林治疗。另外,NOAC与低于华法林的药物间交互作用的可能性有关,且不采用程序监测即可使用;期望其易于在每日医疗实践中应用。

[0013] 尽管近来有所改良,但使用抗凝剂的出血风险仍持续较高。例如,在ROCKET研究中,用利伐沙班治疗的患者中主要及临床相关的非主要出血的每年发生率为14.9%且主要出血事件的每年发生率为3.6% (Patel等人2011)。在定义为HAS-Bled风险评分 ≥ 3 的高出血风险的患者中,主要出血的每年发生率 $> 5\%$ (Gallego等人, (2012) *Circ Arrhythm Electrophysiol.*;5:312-318)。主要出血为尤其相关的临床结果;例如,在ROCKET研究中,一旦主要出血出现,则在利伐沙班组中全因死亡率为20.4%且在华法林组中为26.1%。一旦主要出血事件已出现,则中风及全身栓塞出分别现于利伐沙班及华法林组中的4.7%及

5.4%患者中(Piccini等人,(2014)Eur Heart J;35:1873-80)。住院时间、血液制品输注及资源使用也受主要出血出现严重影响。出血风险也为符合条件的患者中不接受抗促凝剂的主要原因。在关于心房纤维性颤动的欧洲心脏调查(Euro Heart Survey)中,所述调查包含来自35个国家182所医院及5333个不卧床的住院AF患者的资料,仅67%的符合条件的患者在出院时接收口服抗促凝剂(Nieuwlaet等人,(2005)Eur Heart J;26,2422-2434)。

[0014] 因此存在对安全治疗的非常希望的医疗需要,其可在与现有治疗具有类似疗效但出血倾向较低时,减轻AF血栓栓塞并发症,诸如中风、全身栓塞、认知下降及死亡率。

[0015] 发明概述

[0016] 本发明涉及结合人凝血因子XI及FXIa(活化凝血因子XI)(在下文中有时称作“FXI”、“FXIa”及类似术语)的单克隆抗体及包含其的药物组合物,和包含施用其的治疗方法。有效预防及治疗血栓或血栓栓塞疾病/病症(例如血栓性中风、心房纤维性颤动、心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF)、深层静脉血栓形成、静脉血栓栓塞、肺栓塞、急性冠状动脉综合征(ACS)、缺血性中风、急性肢体局部缺血、慢性血栓栓塞肺高血压、全身栓塞)但不具有或仅具有极小的出血风险的抗血栓药物(agent)的开发将符合非常希望的医疗需要。

[0017] 在具体方面中,本文提供的抗体(例如人抗体、嵌合抗体、人源化单克隆抗体)以类似高亲和力结合至人FXIa及FXI的催化结构域(CD)且诱导FXIa中非活性蛋白酶结构域构象。

[0018] 本文所述的分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体,例如具有两个结合位点的本文所述的全长IgG,以小于或等于100pM的平衡解离常数(K_D)的结合FXI和/或FXIa。例如,本文所述的分离的抗体可以小于或等于100pM、小于或等于50pM、小于或等于45pM、小于或等于40pM、小于或等于35pM、小于或等于20pM、或小于或等于10pM的 K_D 结合至人FXI和/或FXIa。更具体的,本文所述的分离的抗体也可以小于或等于34pM(如由表面等离子共振(SPR),例如BIACORE™测定所测量)或以小于或等于4pM(由溶液平衡滴定分析(SET)所测定)的 K_D 结合人FXI和/或FXIa;且也可以小于或等于53pM(由BIACORE™测定所测量)或小于或等于4pM(由SET所测定)的 K_D 结合食蟹猴FXI和/或FXIa。在具体方面中,本文所述的分离的抗体(例如NOV1401)分别以小于或等于大约5pM(例如4.7pM)及2pM(例如1.3pM)(例如由溶液平衡滴定分析(SET)所测定)的表观 K_D 结合人FXI及FXIa。在具体实施方案中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体以大约12.5($\pm$ 6.6)pM(对于FXIa)及大约5.0($\pm$ 0.7)pM(由SET所测定)的表观 K_D 结合至食蟹猴FXI/FXIa(参见例如实施例2)。在具体实施方案中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体以大约20($\pm$ 2)nM的 K_D 结合兔FXI和/或FXIa。在具体方面中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体结合人、食蟹猴及兔FXI和/或FXIa,但并不特异性结合小鼠或大鼠FXI。

[0019] 本文所述的分离的抗FXI和/或抗FXIa抗原结合片段,例如Fab片段及含有一个结合位点的其他片段,以小于或等于10nM的平衡解离常数(K_D)结合FXI和/或FXIa。例如,本文所述的分离的抗原结合片段可以小于或等于10nM、小于或等于5nM、小于或等于1nM、小于或等于500pM、小于或等于305pM、小于或等于62pM的KD结合至人FXI和/或FXIa。更具体的,本文所述的分离的抗原结合片段也可以小于或等于305pM的KD结合人FXI和/或FXIa。

[0020] 本发明是关于一种结合至人、兔及食蟹猴FXIa的分离的抗体或其抗原结合片段。本发明也是关于一种结合在FXI和/或FXIa的催化结构域内,尤其结合至活性位点区域的表面的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0021] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合FXI和/或FXIa且进一步与如表1中所述的抗体(例如NOV1401)竞争结合。如本文所述,抗体和/或其抗原结合片段之间的“竞争”表示两种抗体(或其结合片段)皆结合至相同或重叠FXI和/或FXIa表位(例如由竞争性结合分析通过本领域技术人员所熟知的方法中的任一个所确定)。如本文所用,抗体或其抗原结合片段并不与本发明的FXI和/或FXIa抗体或抗原结合片段(例如NOV1401或NOV1090)“竞争”,除非该竞争性抗体或其抗原结合片段结合与本发明的抗体或抗原结合片段相同的FXI和/或FXIa表位,或重叠FXI和/或FXIa表位。如本文所用,竞争性抗体或其抗原结合片段不包括具有以下之一:(i)空间上阻断本发明的抗体或抗原结合片段结合其目标(例如若该竞争性抗体结合至邻近非重叠FXI和/或FXIa表位且以物理方式防止本发明的抗体或抗原结合片段结合其目标);和/或(ii)结合至不同非重叠FXI和/或FXIa表位且诱导FXI和/或FXIa蛋白的构象变化以使得该蛋白质可不再以不存在该构象变化下进行的方式,与本发明的FXI和/或FXIa抗体或抗原结合片段结合。

[0022] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合FXI和/或FXIa,且进一步与如表1中所述抗体竞争结合以结合至与该表1的抗体结合的表位的大多数氨基酸。在另一实施例中,分离的抗体或其抗原结合片段结合FXI和/或FXIa,且进一步与如表1中所述抗体竞争结合以结合至与该表1的抗体结合的所有表位。

[0023] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至活性FXI (FXIa) 且在结合至活性FXI (FXIa) 催化结构域时使FXIa构象变化为非活性构象。在另一实施例中,该分离的抗体或其抗原结合片段进一步诱导变化,其中与活性构象相比,该非活性构象的N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或无序。

[0024] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI (例如人FXI) 且在结合至FXI时防止FXI催化结构域呈现活性构象,其中环145、环188及环220按FXIa催化结构域的结构中排列。

[0025] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI且在结合至FXI时防止FXI催化结构域呈现活性构象,其中N端4个残基、环145、环188及环220按FXIa催化结构域的结构中排列。

[0026] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI且在结合至FXI时通过诱导酶原结构中的构象变化防止FXI催化结构域呈现活性构象,进一步产生与结合至FXIa时所观察到的构象密切相关的抑制的FXI构象。

[0027] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI和/或FXIa且在结合至FXI和/或FXIa且与FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体:抗原复合物时,导致与活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

[0028] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI和/或FXIa且在结合至FXI和/或FXIa且与FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体:抗原复合物时,导致与活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

[0029] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至活性FXI (FXIa) 且导致FXI (FXIa) 催化结构域的构象变化为非活性构象,其中与活性构象相比环145、环188及环

220发生移动和/或无序。

[0030] 在一个实施方案中,分离的抗体或其抗原结合片段结合至FXI且通过诱导酶原结构的构象变化防止催化结构域呈现活性构象,由此产生与结合至FXIa时所观察到的构象密切相关的抑制的FXI构象。

[0031] 本发明也进一步涉及结合与如表1中所述的抗体(例如NOV1401)相同的表位的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0032] 本文所述的分离抗体及抗原结合片段的结合亲和力可通过溶液平衡滴定(SET)来测定.SET的方法在本领域中已知,且进一步详细描述于下文中。或者,本文所述的分离的抗体或片段的结合亲和力可例如在BIAcore™分析中通过表面等离子共振测定测定。BIAcore™动力学分析的方法在本领域中已知,且进一步详细描述于下文中。

[0033] 本文所述的分离的抗FXI和/或FXIa抗体及抗原结合片段可用以抑制凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶的直接或间接活化和/或与血小板受体的结合,且因此可防止内在(intrinsic)和/或共同(common)凝血途径活化。

[0034] 本文所述的分离的抗FXI和/或FXIa抗体及抗原结合片段可用于以小于或等于100nM、小于或等于50nM、小于或等于35nM、小于或等于25nM、小于或等于10nM、或小于或等于5.2nM的IC₅₀抑制凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶的直接或间接活化。更具体的,如本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以小于或等于100nM、小于或等于50nM、小于或等于35nM、小于或等于25nM、小于或等于10nM、或小于或等于5.2nM的IC₅₀抑制凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶的直接或间接活化。更具体的,如本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以小于或等于100nM、小于或等于50nM、小于或等于35nM、小于或等于25nM、小于或等于20nM、或小于或等于18nM的IC₅₀抑制凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶的直接或间接活化。更具体的,如本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段可以小于或等于100nM、小于或等于50nM、小于或等于35nM、小于或等于25nM、小于或等于10nM、或小于或等于5nM的IC₅₀抑制凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶的直接或间接活化。在一具体实施方案中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体或其抗原结合片段以小于或等于2nM,例如1.8nM的IC₅₀抑制FXIa介导的其天然底物FIX的活化。

[0035] 分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段可用于例如通过抑制FXI和/或FXIa介导的FIX活化来抑制内在和/或共同凝血途径(例如阻断其活化)。分离的抗FXI/FXIa抗体或其抗原结合片段因此可用以预防凝血或凝血传播(propagation)。分离的抗体或其抗原结合片段可用于通过抑制FXI介导的FIX活化来预防、治疗或改善此类凝血病症,如深层静脉血栓形成及中风(例如缺血性中风)。

[0036] 在具体实施方案中,例如如实施例部分中所述,由aPTT分析所确定,抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够以浓度依赖性方式延长人血浆的凝血时间(例如直至血液凝块开始形成的时间)。在一具体实施方案中,由aPTT分析所确定,在10nM至20nM范围内,例如大约14nM或15nM的总抗FXI抗体(例如NOV1401)浓度下与基线相比凝血时间(aPTT)加倍。在具体实施方案中,例如如实施例部分中所述,由aPTT分析所确定,抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够以浓度依赖性方式以5nM至20nM范围内,例如大约13nM的IC₅₀延长人血浆的凝血时间。

[0037] 在具体实施方案中,例如如实施例部分中所述,由aPTT分析所确定,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够例如以浓度依赖性方式延长人血浆的凝血时间(例如直至血液凝块开始形成的时间)至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍或2倍。在具体实施方案中,由aPTT测定所测量,例如如实施例部分中所述,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够延长人血浆的凝血时间(例如直至血液凝块开始形成的时间)至少1.4倍、1.5倍、1.6倍或1.7倍。

[0038] 在具体方面中,在人血浆的凝血酶产生分析(TGA)中,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够以浓度依赖性方式减少凝血酶的量,该分析测定在存在极低组织因子(TF)浓度下FXIa抑制对凝血酶→FXIa前馈环路的作用。在具体实施方案中,在人血浆的凝血酶产生分析(TGA)中,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其抗原结合片段能够减少凝血酶的量,其中 IC_{50} 值在10nM至30nM的范围内,例如大约20nM或24nM,且残余凝血酶浓度大约159nM。

[0039] 在具体方面中,本文提供抗体(例如表1中的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的HCDR 1-3及LCDR 1-3的抗体)或其抗原结合片段,其特异性结合至人FXI和/或FXIa的催化结构域,且其在食蟹猴中的总抗体的终末消除半衰期($t_{1/2}$)为大约14-15天。在具体实施方案中,此类抗FXI/FXIa抗体呈现大约61-66%的绝对皮下(s.c.)生物可用性。

[0040] 在一具体实施方案中,特异性结合于人FXI和/或FXIa的本文提供的抗体或其抗原结合片段(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401)展现以下特征中的一个或多个(例如两个、或三个、或四个、或五个、或六个、或七个)或所有:

[0041] (i) 例如以分别大约1-2pM及4-5pM的表观 K_D 特异性结合于人FXI及FXIa的催化结构域(CD);

[0042] (ii) 由活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)分析所评估的延长凝血时间;

[0043] (iii) 分别通过活化凝血因子XII(FXIIa)且通过凝血酶通过抑制FXI活化来抑制人血浆中的凝血酶产生;

[0044] (iv) 表明用人FXI重建的FXI-/-小鼠中的抗血栓剂及抗促凝剂活性;

[0045] (v) 降低例如食蟹猴中游离FXI(FXI_f)含量或延长其降低时间;

[0046] (vi) 其例如在食蟹猴中的总抗体的终末消除半衰期为大约14-15天;

[0047] (vii) 特异性结合至人及猕猴FXI和/或FXIa,但不特异性结合至小鼠或大鼠FXI和/或FXIa;及

[0048] (viii) 使以下人FXI残基(Swissprot编号)中的一个或多个(例如两个、三个、四个、五个、六个或七个或更多个)或一些或所有接触:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472-Glu476、Tyr521-Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594-Glu597及Arg602-Arg604。

[0049] 如本文所述的分离的抗FXI和/或FXIa抗体或其抗原结合片段可为单克隆抗体、人抗体或人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、Fab片段、Fv片段、F(ab')₂片段或scFv片段和/或IgG同种型(例如IgG1,诸如人IgG1)。在具体实施方案中,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体为重组人抗体。在具体实施方案中,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体为人IgG1/ λ 抗体。在具体实施方案中,本文所述的抗FXI和/或抗FXIa抗体为人IgG1/ λ 抗体,其包含经工程改造以降低效应子功能(例如ADCC和/或CDC)的潜能的Fc结构域,例如包含D265A和/或P329A

替代的人Fc结构域。

[0050] 如本文所述的分离的抗FXI和/或FXIa抗体或其抗原结合片段也可包括氨基酸已取代至来自相应人VH或VL种系序列的抗体构架中的构架。

[0051] 本发明的另一方面包括具有表1中所述的Fab的完整重链及轻链序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体的,分离的抗体或其抗原结合片段可具有NOV1090及NOV1401的重链及轻链序列。

[0052] 本发明的另一方面包括具有表1中所述的Fab的重链及轻链可变结构域序列的分离的抗体或其抗原结合片段。更具体的,经分离的抗体或其抗原结合片段可具有NOV1090及NOV1401的重链及轻链可变结构域序列。

[0053] 本发明的另一方面包括分离的抗体或其抗原结合片段,其具有表1中所述的抗体的重链可变结构域CDR(也即HCDR1、HCDR2及HCDR3)及轻链可变结构域CDR(也即LCDR1、LCDR2及LCDR3)序列,诸如Kabat CDR、IMGT CDR、Chothia CDR或组合CDR。更具体的,经分离的抗体或其抗原结合片段可具有例如如表1中所呈现的NOV1090及NOV1401的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,诸如Kabat CDR、IMGT CDR、Chothia CDR或组合CDR。

[0054] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括选自SEQ ID NO:3及23的重链CDR1;选自SEQ ID NO:4及24的重链CDR2;及选自SEQ ID NO:5及25的重链CDR3,其中分离的抗体或其抗原结合片段结合至人FXI和/或FXIa。在另一方面中,此类分离的抗体或其抗原结合片段进一步包括选自SEQ ID NO:13及33的轻链CDR1;选自SEQ ID NO:14及34的轻链CDR2;及选自SEQ ID NO:15及35的轻链CDR3。

[0055] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括选自SEQ ID NO:13及33的重链CDR1;选自SEQ ID NO:14及34的重链CDR2;及选自SEQ ID NO:15及35的重链CDR3,其中分离的抗体或其抗原结合片段结合至人FXI和/或FXIa。

[0056] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合具有HCDR1、HCDR2及HCDR3及LCDR1、LCDR2及LCDR3的FXI和/或FXIa,其中HCDR1、HCDR2及HCDR3包含SEQ ID NO:3、4及5,且LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:13、14及15;或HCDR1、HCDR2及HCDR3包含SEQ ID NO:23、24及25,且LCDR1、LCDR2、LCDR3包含SEQ ID NO:33、34及35。

[0057] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合具有HCDR1、HCDR2及HCDR3及LCDR1、LCDR2及LCDR3的FXI和/或FXIa,其中HCDR1、HCDR2及HCDR3分别包含SEQ ID NO:43、44及45,且LCDR1、LCDR2、LCDR3分别包含SEQ ID NO:47、37及15。

[0058] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其结合具有HCDR1、HCDR2及HCDR3及LCDR1、LCDR2及LCDR3的FXI和/或FXIa,其中HCDR1、HCDR2及HCDR3分别包含SEQ ID NO:46、4及5且LCDR1、LCDR2、LCDR3分别包含SEQ ID NO:33、14及15。

[0059] 本发明也是关于一种抗体或抗原结合片段,其具有如Chothia所定义的SEQ ID NO:9及29的可变重链的HCDR1、HCDR2及HCDR3,及SEQ ID NO:19及39的可变轻链的LCDR1、LCDR2及LCDR3。在本发明的另一方面中,抗体或抗原结合片段可以具有如Kabat所定义的SEQ ID NO:9及29的重链可变结构域序列的HCDR1、HCDR2及HCDR3及SEQ ID NO:19及39的轻链可变结构域序列的LCDR1、LCDR2及LCDR3。

[0060] 本发明也是关于一种抗体或抗原结合片段,其具有如IMGT所定义的SEQ ID NO:9及29的可变重链的HCDR1、HCDR2及HCDR3及SEQ ID NO:19及39的可变轻链的LCDR1、LCDR2及

LCDR3。在本发明的另一方面中,抗体或抗原结合片段可以具有如组合的所定义的SEQ ID NO:9及29的重链可变结构域序列的HCDR1、HCDR2及HCDR3及SEQ ID NO:19及39的轻链可变结构域序列的LCDR1、LCDR2及LCDR3。

[0061] 在本发明的一个方面中,分离的抗体或其抗原结合片段包括选自SEQ ID NO:9及29的重链可变结构域序列。经分离的抗体或抗原结合片段进一步可包含轻链可变结构域序列,其中重链可变结构域与轻链可变结构域组合以形成FXIa的抗原结合位点。具体而言,轻链可变结构域序列可选自SEQ ID NO:19及39,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合FXI和/或FXIa。

[0062] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括选自SEQ ID NO:19及39的轻链可变结构域序列,其中该分离的抗体或其抗原结合片段结合至人FXI和/或FXIa。经分离的抗体或抗原结合片段可进一步包含重链可变结构域序列,其中轻链可变结构域与重链可变结构域组合以形成FXI和/或FXIa的抗原结合位点。

[0063] 具体而言,结合FXI和/或FXIa的分离的抗体或其抗原结合片段可具有分别包含SEQ ID NO:9及19;或19及39的序列的重链及轻链可变结构域。

[0064] 本发明进一步涉及分离的抗体或其抗原结合片段,其包括与选自SEQ ID NO:9及29的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的重链可变结构域,其中该抗体结合至FXI和/或FXIa。在一个方面中,分离的抗体或其抗原结合片段也包括与选自SEQ ID NO:19及39的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变结构域。在本发明的另一方面中,经分离的抗体或抗原结合片段具有由Kabat所定义且如表1中所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3。在一具体实施方案中,经分离的抗体或抗原结合片段具有由Chothia、IMGT或组合的所定义且如表1中所述的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1 LCDR2及LCDR3。

[0065] 本发明也是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,具有与选自SEQ ID NO:19及39的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的轻链可变结构域,其中该抗体结合FXI和/或FXIa。

[0066] 在本发明的另一方面中,结合至FXI和/或FXIa的分离的抗体或其抗原结合片段可具有包含SEQ ID NO:11或31的序列的重链。分离的抗体也可包括轻链,其可与重链组合以形成人FXI和/或FXIa的抗原结合位点。具体而言,轻链可具有包含SEQ ID NO:21或41的序列。具体而言,结合FXI和/或FXIa的分离的抗体或其抗原结合片段可具有分别包含SEQ ID NO:11及21;或31及41的序列的重链及轻链。

[0067] 本发明另外是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括与选自SEQ ID NO:11或31的序列具有至少90%序列同一性的重链,其中该抗体结合至FXI和/或FXIa。在一个方面中,分离的抗体或其抗原结合片段也包括与选自SEQ ID NO:21及41的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的轻链。

[0068] 本发明另外是关于一种分离的抗体或其抗原结合片段,其包括与选自SEQ ID NO:21或41的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的轻链,其中该抗体结合FXI和/或FXIa。

[0069] 本发明也是关于组合物,其包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段以及抗体组合物以及可药用载体。特别地,本发明进一步包括药物组合物,其包含表1的抗体或其

抗原结合片段,诸如抗体NOV1090及NOV1401。本发明也关于药物组合物,其包含表1的分离的抗体或其抗原结合片段中的两个或更多个的组合。

[0070] 本发明也是关于一种分离的核酸序列,其编码具有选自SEQ ID NO:9及29的序列的可变重链。具体而言,核酸具有与选自SEQ ID NO:10及30的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在本发明的另一方面中,序列为SEQ ID NO:10或30。

[0071] 本发明也是关于一种分离的核酸序列,其编码具有选自SEQ ID NO:20及40的序列的可变轻链。具体而言,核酸具有与选自SEQ ID NO:20及40的序列具有至少80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在本发明的另一方面中,序列为SEQ ID NO:20或40。

[0072] 本发明也是关于一种分离的核酸,其包含编码包括与选自SEQ ID NO:20及40的序列具有至少90%序列同一性的轻链可变结构域的多肽的序列。

[0073] 本发明也关于一种载体,其包括本文所述的核酸分子中的一个或多个。

[0074] 本发明也关于一种分离的宿主细胞,其包括编码上述抗体的重链的重组DNA序列,及编码上述抗体的轻链的第二重组DNA序列,其中该DNA序列可操作地连接于启动子且能够表达于宿主细胞中。抗体可意欲为人单克隆抗体。宿主细胞也意欲为非人哺乳动物细胞。

[0075] 本发明也是关于一种降低FXI和/或FXIa表达和/或内在和/或共同凝血途径活化的方法,其中该方法包括使细胞与有效量的包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤。

[0076] 本发明也是关于一种抑制FXI和/或FXIa与FIX结合的方法,其中该方法包括使细胞与有效量的包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物接触的步骤。

[0077] 细胞意欲为人细胞。细胞进一步意欲在个体中。在一个实施方案中,细胞意欲为血小板。个体又意欲为人。

[0078] 本发明也是关于一种治疗、改善或预防个体的血栓栓塞疾病的方法,其中该方法包括向个体施用有效量的包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的组合物的步骤。在一个方面中,血栓栓塞疾病为血栓性病症(例如血栓形成、血栓性中风、心房纤维性颤动、心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF)、深层静脉血栓形成、静脉血栓栓塞及肺栓塞)。个体意欲为人。

[0079] 任一种前述分离的抗体或其抗原结合片段可为单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0080] 本发明的非限制性实施例描述于以下方面中:

[0081] 1.一种分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其片段,其结合在FXI和/或FXIa的催化结构域内。

[0082] 2.一种分离的抗体或其片段,其结合至抗FXI和/或FXIa的一或更多个表位,其中该表位包含以下中的两个或更多个氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0083] 3.如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含四个或更多个以下氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、

Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0084] 4. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含六个或更多个以下氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0085] 5. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含八个或更多个以下氨基酸残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0086] 6. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含以下残基:Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0087] 7. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及一或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0088] 8. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及四个或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0089] 9. 如方面2的分离的抗体或片段,其中该表位包含氨基酸残基Pro410、Arg413、Lys527及六个或更多个以下氨基酸残基:Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472、Lys473、Met474、Ala475、Glu476、Tyr521、Arg522、Lys523、Leu524、Arg525、Asp526、Arg548、His552、Ser575、Ser594、Trp595、Gly596、Glu597、Arg602、Glu603及Arg604。

[0090] 10. 一种分离的抗FXI和/或抗FXIa抗体或其片段,其结合在FXI和/或FXIa的催化结构域内,其中该抗体或片段阻断FXI和/或FXIa结合至凝血因子IX、凝血因子XIIa及凝血酶中的一个或多个。

[0091] 11. 如方面10的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段阻断FXI和/或FXIa结合至凝血因子IX、凝血因子XIIa或凝血酶中的一个或多个及凝血途径的其他组分。

[0092] 12. 如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段阻断FIX、FXI及FXIa中的一个或多个结合至血小板受体。

[0093] 13. 如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段防止内在或共同凝血途径的活化。

[0094] 14. 一种分离的抗体或其片段,其以由BIACORE™测定所测量小于或等于34nM或由

溶液平衡滴定分析 (SET) 所测定小于或等于4pM的 K_D 结合至人FXI和/或FXIa蛋白。

[0095] 15. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含至少一个与表1中所述的CDR中的至少一个具有至少90%同一性的互补决定区。

[0096] 16. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含来自表1的CDR1、CDR2及CDR3。

[0097] 17. 一种如方面1的分离的抗体变体或片段, 其中该抗体或片段包含来自表1的CDR1、CDR2及CDR3, 且其中该变体在CDR1、CDR2或CDR3中的一个具有至少一至四个氨基酸改变。

[0098] 18. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:5及25的重链CDR3。

[0099] 20. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH或与其具有90%同一性的氨基酸序列; 及选自SEQ ID NO:19及39的VL或与其具有90%同一性的氨基酸序列。

[0100] 21. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH或与其具有95%同一性的氨基酸序列; 及选自SEQ ID NO:19及39的VL或与其具有95%同一性的氨基酸序列。

[0101] 22. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的VH或与其具有97%同一性的氨基酸序列; 及选自SEQ ID NO:19及39的VL或与其具有97%同一性的氨基酸序列。

[0102] 23. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的可变重链序列。

[0103] 24. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:19及39的可变轻链序列。

[0104] 25. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:9及29的可变重链; 及选自SEQ ID NO:19及39的可变轻链序列。

[0105] 26. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段选自以下: 包含SEQ ID NO:9的可变重链及SEQ ID NO:19的可变轻链序列的抗体或片段, 及包含SEQ ID NO:29的可变重链及SEQ ID NO:39的可变轻链序列的抗体或片段。

[0106] 27. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:46的重链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2; 选自5的重链可变区CDR3; 选自SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2; 及选自SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0107] 28. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:3及23的重链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:4及24的重链可变区CDR2; 选自5及25的重链可变区CDR3; 选自SEQ ID NO:13及33的轻链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:14及34的轻链可变区CDR2; 及选自SEQ ID NO:15及35的轻链可变区CDR3。

[0108] 29. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段包含选自SEQ ID NO:6及26的重链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:7及27的重链可变区CDR2; 选自8及28的重链可变区CDR3; 选自SEQ ID NO:16及36的轻链可变区CDR1; 选自SEQ ID NO:17及37的轻链可变区

CDR2;及选自SEQ ID NO:18及38的轻链可变区CDR3。

[0109] 30.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:3的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:13的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0110] 31.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:23的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:24的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:34的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

[0111] 32.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:6的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:7的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:8的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:16的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:17的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:18的轻链可变区CDR3。

[0112] 33.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段包含SEQ ID NO:26的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:27的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:28的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:36的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:37的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:38的轻链可变区CDR3。

[0113] 34.一种医药组合物,其包含先前方面中一项的抗体或其片段及可药用载体。

[0114] 35.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段结合至与根据任何前述方面的分离的抗体或片段相同的表位。

[0115] 36.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段与根据任何前述方面的分离的抗体或片段竞争结合至人FXI和/或FXIa蛋白。

[0116] 37.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段选自NOV1090及NOV1401。

[0117] 38.一种治疗血栓栓塞病症的方法,其包含向罹患血栓栓塞病症的个体施用有效量的包含根据任何前述方面的抗体或片段的药物组合物。

[0118] 39.如方面38的方法,其中该个体罹患与心房纤维性颤动有关的缺血性中风及深层静脉血栓形成中的一个或多个。

[0119] 40.如方面38的方法,其中该个体罹患与心房纤维性颤动有关的缺血性中风。

[0120] 41.一种治疗血栓栓塞病症的方法,其包含向罹患血栓栓塞病症的个体施用有效量的包含根据任何前述方面的抗体或片段的药物组合物与抑制素(statin)治疗组合。

[0121] 42.一种药物,其包含根据任何前述方面的抗体。

[0122] 43.一种核酸,其编码根据任何前述方面的抗体中的一个或多个。

[0123] 44.一种载体,其包含根据方面43的核酸。

[0124] 45.一种宿主细胞,其包含方面44的载体。

[0125] 46.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至活性FXI (FXIa) 催化结构域时使FXIa构象变化为非活性构象,其中与活性构象相比N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或无序。

[0126] 47.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI时防止FXI催化结构域呈现活性构象,其中环145、环188及环220按该FXIa催化结构域的结构中排列。

[0127] 48.如方面1的分离的抗体或片段,其中该抗体或片段在结合至FXI时防止该FXI催化结构域呈现活性构象,其中该N端4个残基、环145、环188及环220按该FXIa催化结构域的

结构中排列。

[0128] 49. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段在结合至FXI时通过诱导酶原结构中的构象变化防止该FXI催化结构域呈现活性构象, 进一步产生与结合至FXIa时所观察到的密切相关的抑制的FXI构象。

[0129] 50. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段在结合至FXI和/或FXIa且与该FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体: 抗原复合物时, 导致与该活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

[0130] 51. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段在结合至FXI和/或FXIa且与该FXI和/或FXIa的催化结构域形成抗体: 抗原复合物时, 导致与该活性凝血因子XI (FXIa) 的催化结构域的未复合结构相比N端4个残基、环145、环188及环220发生移动和/或非定向。

[0131] 52. 如方面1的分离的抗体或片段, 其中该抗体或片段结合至活性FXI (FXIa) 且导致FXI (FXIa) 催化结构域的构象变化为非活性构象, 其中与该活性构象相比环145、环188及环220发生移动和/或无序。

[0132] 定义

[0133] 除非另外定义, 否则本文中所用的所有技术及科学术语皆具有与本发明所述领域的技术人员通常理解的含义相同的含义。

[0134] 术语“FXI蛋白”、“FXI抗原”及“FXI”可互换使用, 且是指不同物种的凝血因子XI蛋白。凝血因子XI为哺乳动物血浆凝血因子XI, 一种以酶原形式以25-30nM的浓度存在于人血浆中的糖蛋白, 当通过有限蛋白水解转化为活性丝氨酸蛋白酶时其参与血液凝血的内在途径。

[0135] 术语“FXIa蛋白”、“FXIa抗原”及“FXIa”可互换使用, 且是指不同物种的活化FXI蛋白。酶原凝血因子XI通过血凝接触阶段或通过血小板表面上的凝血酶介导的活化转化为其活性形式, 即凝血因子XIa (FXIa)。在此凝血因子XI活化期间, 内部肽键的两个链中的每一个裂解, 从而产生活化因子XIa, 一种由通过二硫键结合在一起的两个重链及两个轻链构成的丝氨酸蛋白酶。此丝氨酸蛋白酶FXIa使凝血因子IX转化为IXa, 其随后活化凝血因子X (Xa)。Xa接着可介导凝血因子II/凝血酶活化。例如, 人FXI具有如表1中所述的序列 (SEQ ID NO:1), 且已描述于先前报导及文献 (Mandle RJ Jr等人, (1979) Blood; 54 (4): 850; NCBI Reference Sequence: AAA51985) 中。

[0136] 在本发明的上下文中, 术语“FXI”及“FXIa” (及其类似术语) 分别包括天然FXI及FXIa蛋白的突变体及变体, 其具有与以上提及的报导所述的天然一级结构 (氨基酸序列) 大体上相同的氨基酸序列。

[0137] 如本文所用, 术语“催化结构域”、“丝氨酸蛋白酶催化结构域”及类似术语是指氨基酸Ile370至Val607, 如由循环中成熟蛋白的N端的Glu1开始计数。其也可描述为FXI的C端的残基388-625。如本文所用, 术语“活性位点”是指包含氨基酸His413、Asp462及Ser557的催化三联体。(Bane及Gailani (2014) Drug Disc. 19 (9))。

[0138] 相对于数值x的术语“约”是指例如 $x \pm 10\%$ 。

[0139] 如本文所用, 术语“抗体”是指完整抗体及其任何抗原结合片段 (也即“抗原结合部分”) 或单链。完整抗体为包含通过二硫键相互连接的至少两条重 (H) 链及两条轻 (L) 链的糖蛋白。每一重链包含重链可变区 (本文缩写为VH) 及重链恒定区。重链恒定区包含三个区域

(CH1、CH2及CH3)。各轻链包含轻链可变区(本文中简化为VL)及轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。VH及VL区可进一步再分成高变区,称为互补决定区(CDR),穿插称为构架区(FR)的更保守区域。各VH及VL由自氨基末端至羧基末端按照以下顺序排列的三个CDR及四个FR组成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链及轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体恒定区可介导免疫球蛋白结合至宿主组织或因子,包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞)及经典补系统的第一组分(C1q)。

[0140] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”或“抗原结合片段”是指保留与给定抗原(例如凝血因子XIIa(FXIIa))特异性结合的能力的完整抗体的一或更多个片段。抗体的抗原结合功能可由完整抗体的片段执行。术语抗体的抗原结合部分或抗原结合片段内所涵盖的结合片段的实施例包括Fab片段,一种由VL、VH、CL及CH1结构域组成的单价片段;F(ab)₂片段,一种包含两个Fab片段的二价片段,该两个Fab片段经位于铰链区的二硫桥键连接;Fd片段,其由VH及CH1结构域组成;Fv片段,其由抗体的单臂的VL及VH结构域组成;单域抗体(dAb)片段(Ward等人,1989Nature 341:544-546),其由VH结构域或VL结构域组成;及分离的互补决定区(CDR)。

[0141] 此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由独立基因编码,但其可使用重组方法,通过人工肽接头接合,所述接头使其能够制备成单一蛋白质链形式,其中VL区和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人,1988Science 242:423-426;及Huston等人,1988Proc.Natl.Acad.Sci.85:5879-5883)。此类单链抗体包括抗体的一或更多个抗原结合部分或片段。这些抗体片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得,且以与完整抗体相同的方式来筛选供使用的片段。

[0142] 抗原结合片段也可并入至单域抗体、最大抗体(maxibody)、微型抗体(minibody)、胞内抗体(intrabody)、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR及双scFv中(参见例如Hollinger及Hudson,2005,Nature Biotechnology,23,9,1126-1136)。抗体的抗原结合部分可嫁接至基于诸如纤连蛋白III型(Fn3)的多肽的骨架中(参见美国专利第6,703,199号,其描述纤连蛋白多肽单体)。

[0143] 抗原结合片段可并入至包含一对串联Fv片段(VH-CH1-VH-CH1)的单链分子中,该对串联Fv片段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人,1995Protein Eng.8(10):1057-1062;及美国专利第5,641,870号)。

[0144] 如本文所用,术语“亲和力”是指单一抗原位点处抗体与抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内,抗体“臂”的可变区通过弱非共价力与抗原在多个位点处相互作用;相互作用愈大,亲和力愈强。如本文所用,抗体或其抗原结合片段(例如Fab片段)的术语“高亲和力”通常是指具有 10^{-9} M或更小的 K_D (例如 10^{-10} M或更小的 K_D 、 10^{-11} M或更小的 K_D 、 10^{-12} M或更小的 K_D 、 10^{-13} M或更小的 K_D 、 10^{-14} M或更小的 K_D 等)的抗体或抗原结合片段。

[0145] 术语“氨基酸”是指天然产生且合成的氨基酸,以及以类似于天然产生的氨基酸的方式发挥功能的氨基酸类似物及氨基酸模拟物。天然产生的氨基酸为通过基因密码编码的氨基酸,以及随后经修饰的氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸及O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(也即与氢、羧基、氨基及R基结合的 α 碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫(methyl sulfonium)。此类类似物具有经修饰的R基(例如正亮氨酸)或经修饰的肽主链,然而保持与

天然产生的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,然而以与天然产生的氨基酸类似的方式起作用的化合物。

[0146] 如本文所用,术语“结合特异性”是指个别抗体结合位点与仅一个抗原决定簇反应的能力。

[0147] 短语“特异性(或选择性)结合”至抗体(例如FXI和/或FXIa结合抗体)是指决定在蛋白质及其他生物制品的非均质群体中存在关联抗原(例如人FXI和/或FXIa或猕猴FXI和/或FXIa)的结合反应。本文中短语“识别抗原的抗体”及“对抗原具有特异性的抗体”可与术语“与抗原特异性结合的抗体”互换使用。

[0148] 术语“FXI和/或FXIa介导”是指如下事实:FXI和/或FXIa通过直接或间接活化凝血因子IX(也称为FIX)、凝血因子X(FX)和/或凝血酶和/或通过结合至血小板受体介导内在和/或共同凝血途径。

[0149] 术语“止血”表示在伤口愈合期间分别遏制损伤部位流血且使血管回复通畅的主要机制。在正常止血及病理性血栓期间,同时活化三种机制:活化的血小板与血管壁的相互作用的初期止血、纤维蛋白形成及成为纤维蛋白溶解的过程。

[0150] 术语“凝血及凝血级联”、“凝血级联模型”及其类似术语是指基于蛋白质的系统,其用以使形成以密封伤口的凝块稳定。凝血途径为蛋白水解级联。该途径的各酶以酶原形式(非活性形式)存在于血浆中,其在活化时经历蛋白水解分裂自前体分子释放活性凝血因子。凝血级联充当控制活化过程的一系列正及负反馈环。途径的最终目的为产生凝血酶,其接着可使可溶性血纤维蛋白原转化为形成凝块的纤维蛋白。

[0151] 产生凝血酶的过程可划分为三个阶段:内在及外来途径,其为产生活性凝血因子(即FXa(活化凝血因子-X))提供替代途径,及最终共同途径,其致使凝血酶形成(Hoffman M.M.及Monroe D.M.(2005) Curr Hematol Rep.4:391-396;Johne J等人,(2006) Biol Chem.387:173-178)。

[0152] “血小板聚集”是指一种过程,其中当血管破裂发生时通常不会与血流直接接触的物质得以暴露。这些物质(主要为胶原蛋白及von Willebrand因子)使血小板黏着于破裂表面。一旦血小板黏着于表面,其即释放将其他血小板吸引至受损区域的化学物质,称为血小板聚集。这些两个过程为终止出血的第一反应。

[0153] 如本文所用,“血栓栓塞病症”或类似术语是指内在和/或共同凝血途径异常活化或并非天然失活(例如在无治疗性手段下)的许多病状或疾病。这些病状包括(但不限于)血栓性中风、心房纤维性颤动、心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF)、深层静脉血栓形成、静脉血栓栓塞及肺栓塞。这些病状也可包括导管中形成血栓的导管相关的病状(例如肿瘤患者中的希克曼导管(Hickman catheter)),及管道中产生凝块的体外膜氧化(ECMO)。

[0154] 如本文所用,“血栓栓塞”或类似术语也可指本发明的抗FXI和/或FXIa抗体或其抗原结合片段可用以预防或治疗的以下病状中的许多病状:

[0155] -怀疑或确诊有心律不整,诸如突发性、持久性或永久性心房纤维性颤动或心房颤动的个体的血栓栓塞;

[0156] -心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF),其亚群为经受经皮冠状动脉干预(PCI)的AF患者;

[0157] -高出血风险的患者中急性静脉血栓栓塞事件(VTE)治疗及持久继发性VTE预防;

- [0158] -短暂局部缺血性发作 (TIA) 或非失能性中风后二级预防及并发窦性节律的心脏衰竭中血栓栓塞事件预防中的大脑及心脏血管事件;
- [0159] -经受针对心律不整的心脏复律的个体的左心房的凝块形成及血栓栓塞;
- [0160] -在针对心律不整的切除程序前、期间及后的血栓形成;
- [0161] -静脉血栓形成,此情况包括(但不排除)治疗及二级预防下部或上部的深层或表面静脉血栓、腹部及胸部静脉的血栓、窦血栓形成及颈静脉血栓形成;
- [0162] -静脉样导管或起搏器导线中的任何人工表面上的血栓;
- [0163] -有或无静脉血栓的患者的肺栓塞;
- [0164] -慢性血栓栓塞性肺高血压 (CTEPH) ;
- [0165] -破裂动脉粥样硬化斑上的动脉血栓、动脉内辅具或导管上的血栓及表面上正常的动脉中的血栓,此病状包括(但不限于)急性冠状动脉综合征、ST抬高性心肌梗塞、非ST抬高性心肌梗塞、不稳定绞痛、支架血栓、动脉系统中任何人工表面的血栓及有或无肺高血压的个体的肺部动脉的血栓;
- [0166] -经受经皮冠状动脉干预 (PCI) 的患者的血栓形成及血栓栓塞;
- [0167] -心因性及隐性中风;
- [0168] -患有侵入性及非侵入性癌症恶性肿瘤的患者的血栓形成;
- [0169] -留置导管上的血栓;
- [0170] -严重疾病患者的血栓及血栓栓塞;
- [0171] -心脏血栓及血栓栓塞,此包括(但非独占式地)心肌梗塞后的心脏血栓、与诸如心脏动脉瘤、心肌纤维化、心脏增大及功能障碍、心肌炎及心脏中的人工表面的病状有关的心脏血栓;
- [0172] -有或无心房纤维性颤动的心脏瓣膜病患者的血栓栓塞;
- [0173] -瓣膜机械或生物辅具上的血栓栓塞;
- [0174] -在简单或复杂心脏畸形的患者修复之后具有天然或人工心脏补片、动脉或静脉导管的患者的血栓栓塞;
- [0175] -膝置换手术、髌置换手术及矫形外科手术、胸部或腹部手术后的静脉血栓及血栓栓塞;
- [0176] -包括颅内及脊髓干预的神经外科手术后的动脉或静脉血栓;
- [0177] -先天性或获取性血栓形成倾向,包括(但非独占式地)凝血因子V莱顿、凝血酶原突变、抗凝血酶III、蛋白C及蛋白S缺乏、凝血因子XIII突变、家族纤维蛋白原不良血症、先天性纤维蛋白溶酶原缺乏、凝血因子XI含量增加、镰状细胞疾病、抗磷脂综合征、自身免疫性疾病、慢性肠病、肾病综合征、溶血性尿毒症、骨髓增生疾病、散播性血管内凝血、阵发性夜间血红蛋白尿症及肝素诱导的血小板减少症;
- [0178] -慢性肾病中的血栓形成及血栓栓塞;及
- [0179] -经受血液透析的患者及经受体外膜氧化的患者的血栓及血栓栓塞。
- [0180] 术语“嵌合抗体”为一种抗体分子,其中 (a) 恒定区或其一部分发生变化、置换或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接至不同或改变类别、效应功能和/或物种或赋予嵌合抗体(例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等)新特性的完全不同分子的恒定区;或 (b) 可变区或其一部分变成具有不同或改变抗原特异性的可变区、经具有不同或改变抗原特异性的可

变区置换或交换。例如,小鼠抗体可通过用来自人免疫球蛋白的恒定区置换其恒定区来修饰。由于经人恒定区置换,因此嵌合抗体可保持其识别抗原的特异性,同时相较于初始小鼠抗体,其在人中的抗原性降低。

[0181] 术语“保守修饰的变体”适用于氨基酸与核酸序列。关于特定核酸序列,经保守修饰的变体是指编码相同或基本上相同氨基酸序列的那些核酸,或其中该核酸不依照基本上相同序列来编码氨基酸序列。由于遗传密码的简并性,因此许多在功能上相同的核酸编码任何指定蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG及GCU皆编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸通过密码子说明的每一位置上,密码子可在不改变所编码的多肽的情况下改变成任一个所述对应密码子。此类核酸变异为“沉默变异”,其为一种保守修饰型变异。本文中编码多肽的每一核酸序列也描述核酸的每一可能的沉默变异。本领域技术人员应认识到核酸中的各密码子(除通常为甲硫氨酸的唯一密码子的AUG及通常为色氨酸的唯一密码子的TGG外)可经修饰以产生功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各沉默变异隐含于各所述序列中。

[0182] 就多肽序列而言,“经保守修饰的变体”包括对多肽序列的各个取代、删除或添加,其导致用化学上相似氨基酸取代氨基酸。提供功能上类似的氨基酸的保守取代表在本领域中已熟知。此类经保守修饰的变体另外为且不排除本发明的多态变体、种间同源物及等位基因。以下八组含有彼此为保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);及8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)(参见例如Creighton,Proteins(1984))。在一些实施例中,术语“保守序列修饰”用于指氨基酸修饰,其不会显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特征。

[0183] 术语“表位”是指能够特异性结合至抗体的蛋白质决定子。表位通常由诸如氨基酸或糖侧链的分子的化学活性表面基团组成,且通常具有特定三维结构特征,以及荷质比(specific charge)特征。构象表位与非构象表位区别在于,在变性溶剂存在下,与前者的结合消失,但与后者的结合未消失。若在竞争性结合分析中一个抗体展示为通过本领域技术人员熟知的方法中的任一个结合与第二抗体相同的表位,则两个抗体称为“竞争”。

[0184] 如本文所用,术语“人抗体”意欲包括可变区中的构架与CDR区均来源于人序列的抗体。此外,若抗体含有恒定区,则恒定区也源自此类人序列,例如人种系序列或人种系序列的突变形式。本发明的人抗体可包括不由人序列编码的氨基酸残基(例由体外随机或定点突变诱发或通过体内体细胞突变所引入的突变)。

[0185] 术语“人单克隆抗体”是指具有可变区呈现单结合特异性的抗体,其中构架与CDR区均来源于人序列。在一个实施方案中,人单克隆抗体使用筛选人免疫球蛋白基因库的噬菌体展示方法制备。

[0186] “人源化”抗体为保持非人抗体的反应性同时其在人中具有较低免疫原性的抗体。此可例如由保留非人CDR区且用其对应物替换抗体的剩余部分来达成(也即恒定区以及可变区的构架部分)。参见例如Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855,1984;Morrison及Oi,Adv.Immunol.,44:65-92,1988;Verhoeyen等人,Science,239:1534-1536,1988;Padlan,Molec.Immun.,28:489-498,1991;及Padlan,Molec.Immun.,31:169-217,1994。人工程改造技术的其他实施例包括(但不限于)US5,766,886中所揭示的Xoma技

术。

[0187] 在两个或两个以上核酸或多肽序列的情况下,术语“相同”或“同一性”百分比是指两个或更多个序列或子序列相同。当在比较窗或指定区域上根据最大同一性比较及比定时,若两个序列具有特定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(也即在特定区域上,或未说明时在整个序列上,60%同一性,任选65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%同一性),如使用以下序列比较算法之一或通过人工比对及目视检查所测定,则两个序列“基本上相同”。任选地,同一性存在于至少约50个核苷酸(或10个氨基酸)长度的区域上,或更佳100至500个或1000个或1000个以上核苷酸(或20、50、200个或200个以上氨基酸)长度的区域上。

[0188] 就序列比较而言,通常一个序列用作参考序列,测试序列与其比较。使用序列比对算法时,将测试序列及参考序列输入计算机中,必要时指定子序列坐标,且指定序列算法程序参数。可使用默认程序参数,或可指定替代参数。序列比较算法接着基于程序参数来计算测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0189] 如本文所用,“比较窗”包括提及在两个序列最佳比对之后,一个序列可与具有相同邻接位置数目的参考序列比较的区段,该区段具有任一个选自20至600、通常约50至约200、更通常约100至约150的邻接位置数目。用于比较的序列比对方法为本领域中所熟知。用于比较的最佳序列比对可例由Smith及Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c的局部同源性算法、通过Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970的同源性比对算法、通过Pearson及Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988的相似性搜寻方法、通过这些算法的计算机化实施方案 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA) 或通过人工比对及目测进行(参见例如Brent等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. (Ringbou编, 2003))。

[0190] 适用于确定序列同一性百分比及序列相似性的算法的两个实施例为BLAST及BLAST 2.0算法,其分别描述于Altschul等人, (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402;及Altschul等人, (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410中。进行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开获得。此算法包括通过鉴别查询序列中的长度W的短字来首先鉴别高分序列对 (HSP), 该短字在与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足某些正值阈值分数T。T称为邻域字分数阈值 (Altschul等人, 前述)。这些初始邻域字成功结果充当用于起始搜寻的种子以寻找含有其的较长HSP。字匹配沿各序列在两个方向上延伸,只要累积比对分数增加即可。就核苷酸序列而言,累积分数是使用参数M (一对匹配残基的奖励分数;始终>0) 及N (失配残基的罚分;始终<0) 计算。就氨基酸序列而言,计分矩阵用于计算累积分数。当以下情况时,字命中在各方向中的延伸中断:累积比对分数从其达成的最大值降低量X;累积分数归因于一或多种负评分残基比对的累积而变成0或0以下;或达到任一序列的末端。BLAST算法参数W、T及X决定比对的灵敏度及速度。BLASTN程序 (用于核苷酸序列) 是使用字长 (W) 11、期望值 (E) 或10、M = 5、N = -4及双链比较作为预设参数。就氨基酸序列而言,BLASTP程序使用以下默认:字长为3,及期望值 (E) 为10,且BLOSUM62评分矩阵 (参见Henikoff及Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915, 1989) 采用以下预设:比对 (B) 为50,期望值 (E) 为10, M

=5, N=-4, 及双链的对比。

[0191] BLAST算法也对两个序列之间的相似性进行统计学分析(参见例如Karlin及Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787, 1993)。通过BLAST算法提供的一种相似性度量为最小总和概率(P(N)), 其提供两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然出现匹配的概率的指示。例如, 若测试核酸与参考核酸比较时的最小总和概率小于约0.2, 更佳小于约0.01, 且最佳小于约0.001, 则认为核酸与参考序列相似。

[0192] 两个氨基酸序列之间的同一性百分比也可使用E. Meyers及W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17, 1988)的算法(其已并入至ALIGN程序(2.0版)中)使用PAM120权重残基表(weight residue table)(空位长度罚分为12且空位罚分为4)测定。此外, 两个氨基酸序列之间的同一性百分比可使用Needleman及Wunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453, 1970)算法(其已并入至GCG软件包(可在全球信息网gcg.com获得)的GAP程序中), 使用Blossom 62矩阵或PAM250矩阵, 及空位权重16、14、12、10、8、6或4以及长度权重1、2、3、4、5或6来测定。

[0193] 如下文所述, 除以上提到的序列同一性的百分比之外, 两个核酸序列或多肽基本上相同的另一指示为, 通过第一核酸编码的多肽在针对通过第二核酸编码的多肽所引起的抗体的情况下具免疫交叉活性。因此, 多肽通常与第二多肽基本上相同, 例如其中两个肽不同指出仅为保守性取代。如下所述, 两个核酸序列基本上相同的另一指示为两个分子或其补体在严格条件下彼此杂交。两个核酸序列基本上相同的另一指示为可使用相同引物扩增序列。

[0194] 术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如特异性结合FXI和/或FXIa的分离的抗体基本上不含特异性结合除FXI和/或FXIa外的抗原的抗体)。然而, 特异性结合至FXI和/或FXIa的分离的抗体可与其他抗原具有交叉反应性。另外, 分离的抗体可基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0195] 术语“同种型”是指由重链恒定区基因得到的抗体类别(例如IgM、IgE、IgG, 诸如IgG1或IgG4)。同种型也包括这些类别之一的修饰型, 其中已进行修饰以改变Fc功能, 例如以增强或减少效应子功能或与Fc受体的结合。

[0196] 如本文所用, 术语“ k_{assoc} ”或“ k_a ”意指特定抗体-抗原相互作用的结合速率, 然而如本文所用, 术语“ k_{dis} ”或“ k_d ”意指特定抗体-抗原相互作用的解离速率。如本文所用, 术语“ K_D ”意指解离常数, 其获自 k_d 与 k_a 的比率(也即 k_d/k_a)且以摩尔浓度(M)表示。抗体的 K_D 值可使用本领域中充分确立的方法测定。测定抗体的 K_D 的方法包括使用诸如BIACORE™系统的生物传感器系统测定表面等离子共振, 或通过溶液平衡滴定(SET)在溶液中测定亲和力。

[0197] 如本文所用, 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示针对特定表位的单一结合特异性及亲和性。

[0198] 术语“核酸”在本文中可与术语“多核苷酸”互换使用且是指呈单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。该术语涵盖含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键的核酸, 该核酸为合成的、天然产生的及非天然产生的, 具有与参考核酸类似的结合特性, 且以类似于参考核苷酸的方式代谢。此类类似物的实施例包括(但不限于)硫代磷酸酯、氨基磷酸酯、磷酸甲酯、手性磷酸甲酯、2-0-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

[0199] 除非另外指明, 否则特定核酸序列也含蓄地涵盖其经保守修饰的变体(例如简并

密码子取代)及互补序列,以及经明确指示的序列。特别地,如下详述,简并密码子取代可通过产生其中一或多个所选(或所有)密码子的第三位置经混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代的序列来达成(Batzer等人,Nucleic Acid Res.19:5081,1991;Ohtsuka等人,J.Biol.Chem.260:2605-2608,1985;及Rossolini等人,Mol.Cell.Probes 8:91-98,1994)。

[0200] 术语“有效连接”是指两个或多个多核苷酸(例如DNA)片段之间的功能关系。典型地,该术语是指转录调节序列相对于所转录序列的功能关系。例如,启动子或增强子序列若其在适当宿主细胞或其他表达系统中刺激或调节编码序列的转录,则有效连接至编码序列。一般而言,有效连接至转录序列的启动子转录调节序列在物理上邻接于所转录序列,也即其为顺式作用。然而,诸如增强子的一些转录调节序列无需在物理上邻接于或紧邻于其增强转录的编码序列。

[0201] 如本文所使用的术语“经优化”是指,使用密码子改变核苷酸序列以编码氨基酸序列,该密码子优选于生产细胞或生物体,一般而言为真核细胞,例如毕赤酵母(*Pichia*)细胞、中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或人细胞。使经优化核苷酸序列工程化以完全或尽可能地保留通过起始核苷酸序列来最初编码的氨基酸序列,其也被称为“亲本”序列。本文中的优化序列已经工程改造以具有哺乳动物细胞中的优选密码子。然而,本文中也预想在其他真核细胞或原核细胞中这些序列的经优化表达。由优化核苷酸序列编码的氨基酸序列也称为优化。

[0202] 术语“多肽”或“蛋白质”在本文中可互换使用,且是指氨基酸残基的聚合物。该术语适用于氨基酸聚合物,其中一或多种氨基酸残基为相应天然产生的氨基酸的人工化学模拟物,以及适用于天然产生的氨基酸聚合物及非天然产生的氨基酸聚合物。除非另外指明,否则特定多肽序列也隐含地涵盖其保守修饰型变体。

[0203] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如小鼠)或从其制备的融合瘤中分离的抗体;自经转染以表达人抗体的宿主细胞(例如转染瘤)中分离的抗体;自重组、组合人抗体文库中分离的抗体;及通过任何其他方式(包括将人免疫球蛋白基因序列的全部或一部分与其他DNA序列剪接)制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有其中构架及CDR区来源于人种系免疫球蛋白序列的可变区。然而,在某些实施例,此类重组人抗体可进行体外突变诱发(或当使用人Ig序列的转基因动物时,为体内体细胞突变诱发),且因此重组抗体的VH及VL区的氨基酸序列为体内可不天然产生于人抗体种系的所有组成成分,虽然该序列来源于人种系VH及VL序列且与人种系VH及VL序列有关。

[0204] 术语“重组宿主细胞”(或简言的“宿主细胞”)是指已引入重组表达载体的细胞。应了解,此类术语不仅意指特定个体细胞,而且指此类细胞的后代。因为某些修饰可能因突变或环境影响而出现在后代中,所以此类后代可能实际上不与亲本细胞相同,然而仍包括于如本文所使用的术语“宿主细胞”范畴内。

[0205] 术语“个体”包括人及非人动物。非人动物包括所有脊椎动物(例如:哺乳动物及非哺乳动物),诸如非人灵长类动物(例如食蟹猴)、绵羊、兔、狗、母牛、鸡、两栖动物及爬虫。除提到时外,术语“患者”或“个体”在本文中互换使用。如本文所用,术语“猕猴”或“食蟹猴(*cynomolgus*)”是指食蟹猴(*cynomolgus monkey*) (食蟹猴)。在具体方面中,患者或个体为人。

[0206] 如本文所用,术语“治疗(treating/treatment)”任何疾病或病症(例如血栓栓塞病症)在一个实施方案中是指改善疾病或病症(也即减缓或遏制或减少疾病或其临床症状中的至少一个的发展)。在另一实施例中,“治疗(treating/treatment)”是指缓解或改善至少一种身体参数,包括患者可能辨别不出的身体参数。在又一实施例中,“治疗(treating/treatment)”是指身体上(例如使可辨别症状稳定)、生理学上(例如使身体参数稳定)或以两种方式调节疾病或病症。在又一实施例中,“治疗(treating/treatment)”是指预防或延迟疾病或病症的发作或发展或进展。

[0207] “预防”在其涉及本文所述的适应症(包括例如血栓栓塞病症)时是指预防或减缓有该恶化风险的患者的如下所述例如血栓栓塞疾病参数的恶化的任何作用。

[0208] 术语“载体”意指多核苷酸分子,其能够传输其已连接的另一多核苷酸。载体的一种类型为“质粒”,其是指其他DNA片段可接合至其中的环形双链DNA环。另一种载体类型为病毒载体,诸如腺相关病毒载体(AAV或AAV2),其中其他DNA区段可连接至病毒基因组。某些载体能够在引入其的宿主细胞中自主复制(例如具有复制的细菌源的细菌载体及游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如非游离型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中时可整合至宿主细胞的基因组中,且进而与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够引起其有效连接的基因的表达。该载体在本文中称为“重组表达载体”(或简言的“表达载体”)。一般而言,用于重组DNA技术中的表达载体常常呈质粒形式。由于质粒为载体的最常用形式,因而在本发明书中,“质粒”及“载体”可互换使用。然而,本发明意欲包括提供等效功能的此类其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如复制缺陷反转录病毒、腺病毒以及腺相关病毒)。

[0209] 附图简述

[0210] 图1A-C展示在用人FXI蛋白重建的FXI^{-/-}小鼠中NOV1401对FeCl₃诱导的血栓形成的影响。NOV1401剂量依赖性地抑制血栓形成。抗体会延长aPTT,其延长程度与未处理的FXI^{-/-}小鼠相同。

[0211] 图2A-B展示食蟹猴中多种静脉内(i.v.) (A;N=2)或皮下(s.c.) (B;N=2)剂量3mg/kg、10mg/kg及30mg/kg的NOV1401对aPTT(菱形)及总血浆NOV1401含量关系(方块)的影响。单次剂量3mg/kg导致约2倍aPTT,其维持5-6周。所有所测试的剂量均使aPTT以类似程度延长,且所测试的较高剂量似乎不会使3mg/kg剂量下观察到的aPTT延长的量级增加。

[0212] 图3A-B展示在食蟹猴中多种静脉内(A;N=2)或皮下(B;N=2)剂量3mg/kg、10mg/kg及30mg/kg的NOV1401对血浆游离FXI(方块)及aPTT关系(菱形)的影响。单次剂量3mg/kg会降低游离FXI大约90%,维持5-6周。所有所测试的剂量均使游离FXI以类似程度降低,且所测试的较高剂量似乎不会使3mg/kg剂量下观察到的游离FXI减少的量级增加。

[0213] 图4A-B展示结合至FXI的本发明的NOV1401抗体的Fab的X射线结构。图4A展示NOV1401 Fab-FXI CD复合物的X射线结构。FXI催化结构域展示为灰色表面,Fab为浅灰色(轻链)及深灰色(重链)条带。图4B展示与FXI酶原叠加的NOV1401 Fab-FXI CD复合物的X射线结构。FXI催化结构域展示为灰色条带。Fab的可变结构域展示为浅灰色(VL)及深灰色(VH)条带。叠加处为包括位于在结构底部(PDB 2F83)的呈深灰色条带的四个apple结构域的酶原结构。指示活化裂解位点(Ile370)。

[0214] 图5A-B展示NOV1401 Fab结合时FXIa的结构性变化。图5A展示Fab结合之前FXIa活性位点的视图。FXIa表示为具有透明表面的条带。标记Fab结合时发生构象变化的结构的部

分(环(loop)145、环188及环220)。指示S1及S1'子袋。图5B展示Fab复合物中FXI的非活性构象(Fab未图示)。

[0215] 图6A-C展示抗FXI/FXIa抗体的化合物反应曲线。图6A展示通过NOV1401抑制凝血因子XIa活性。抗体NOV1401抑制全长人FXIa的酶活性的代表性化合物反应曲线。如实施例3中所述,该分析测定荧光标记的肽的裂解。使用非线性曲线拟合对数拟合模型 $[y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/IC_{50})^p)]$,其中y为抑制剂浓度x下的抑制百分比。A1为最低抑制值,且A2为最大抑制值。该代表性数据集的指数p[为希尔系数]产生160pM的 IC_{50} 值。图6B展示aPTT化合物反应曲线。aPTT分析中使用汇集的人血浆得到的抗体NOV1401延长凝血时间的代表性化合物反应曲线。如实施例4中所述,该分析测定在不同浓度的NOV1401存在下起始内在凝血级联后的凝血时间。黑线表示使用逻辑非线性拟合模型得到的拟合结果。点线表示不存在NOV1401下汇集的人血浆的基线凝血时间。基线凝血时间为32.3秒,且在图中指示为灰色虚线。灰色点线指示与基线相比凝血时间加倍的抗体浓度,也即 $2 \times aPTT$ 值,其为14nM。图6C展示TGA反应曲线。展示TGA中用汇集的人血浆得到的抗体NOV1401抑制凝血酶产生的代表性化合物反应曲线。如实施例4中所述,该分析测定通过可通过极低组织因子(TF)浓度触发的所谓凝血酶 $\rightarrow$ FXIa前馈环得到的不同浓度的NOV1401对FXI依赖性凝血酶产生的影响。黑线表示使用四参数剂量-反应曲线模型得到的拟合结果。点线表示归因于通过少量TF诱导的凝血酶产生的残余凝血酶浓度。计算此化合物反应曲线的24nM的 IC_{50} 值及159nM的残余凝血酶浓度(点线)。

[0216] 图7A-B展示皮下10mg/kg (N=3) 及100mg/kg (N=5) 的每周NOV1401剂量维持13周(14个剂量)或静脉内50mg/kg (N=3) 维持4周(5个剂量)对aPTT及FXI活性(FXI:C)的影响。图7A展示对aPTT的影响,在研究第2、23及79天测定。在接受NOV1401的所有动物中aPTT增加2.1至3倍且在研究的整个给药阶段中持续升高。未观察到剂量依赖性且未注意到性别相关的差异。图7B展示对FXI:C的影响,在研究第2、23及79天测定且描绘为血浆FXI活性的百分比。在接受NOV1401的所有动物中FXI:C降低至5-12%的程度且在该研究的整个给药阶段中维持于这些程度。未观察到剂量依赖性且未注意到性别相关的差异。

[0217] 具体描述

[0218] 本发明部分地是基于发现特异性结合至FXIa且抑制其生物活性的抗体分子。本发明关于完整IgG形式抗体及其抗原结合片段,诸如Fab片段(例如抗体NOV1090及NOV1401)。

[0219] 因此,本发明提供特异性结合至FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa)的抗体、药物组合物、此类抗体及组合物的产生方法及使用方法。

[0220] 凝血因子XI

[0221] FXI保持在内在与外来凝血途径及桥接血浆止血的起始及扩增阶段中起重要作用。凝血因子XIIa与凝血酶可活化FXI,从而导致持续产生凝血酶及抑制纤维蛋白溶解。FXI在高组织因子环境中“在血管损伤之后”在正常止血中起次要作用,然而其似乎在血栓形成中起重要作用。重度凝血因子XI缺乏与缺血性中风及静脉血栓栓塞事件发生率较低相关(Salomon等人2008;Salomon等人,(2011)Thromb Haemost.;105:269-73)。重度凝血因子XI缺乏个体中的出血表现不频繁,通常为轻度的,损伤诱导的且优选影响纤维蛋白溶解活性增加的组织,诸如口腔黏膜、鼻黏膜及泌尿道(Salomon等人2011)。关键器官的出血极其罕

见或不存在。

[0222] 血浆凝血为血液中的凝血因子相互作用且发生活化的连续过程,最后导致纤维蛋白产生及凝块形成。在凝血的经典级联模型中,纤维蛋白产生的方法可通过两种不同途径起始,也即分别内在及外来途径 (Mackman, 2008)。

[0223] 在外来途径中,血管损伤使血管外组织因子 (TF) 与凝血因子VII (FVII) 相互作用且将其活化,其相继导致凝血因子X及凝血酶原活化。活性凝血酶最终将可溶性血纤维蛋白原转化成纤维蛋白。外来途径为止血的核心问题,在此途径中干扰凝血因子导致出血风险。

[0224] 在内在途径中,在一些情况下,凝血因子XII可通过称为接触活化的过程活化。产生活化凝血因子XIIa导致凝血因子XI及凝血因子IX连续活化。当凝血因子IXa活化凝血因子X时,外来及内在途径在此阶段会聚 (在共同途径)。凝血酶活性通过通过前馈环使其自身产生增强来强化,其中凝血酶独立于凝血因子XII活化凝血因子XI。此前馈环有助于持续血栓生长,但仅以最低限度涉及止血,因为通过血管外组织因子强力活化足以使凝块形成。内在途径因此基本上不涉及止血 (Gailani及Renné (2007) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007; 27 (12): 2507-13, Müller, Gailani, and Renné 2011)。

[0225] 使用跨越多种物种的多种途径抑制FXI或FXIa的临床前研究有助于验证此目标。FXI^{-/-}小鼠对实验性静脉 (Wang等人, (2006) *J Thromb Haemost*; 4: 1982-8) 及动脉 (Wang等人 (2005) *J Thromb Haemost*; 3: 695-702) 血栓具有抗性。用阻断通过FXIa进行的FXI活化的抗体 (Ab, 14E11) 治疗小鼠会致使抑制实验性血栓 (Cheng等人, (2010) *Blood*, 116: 3981-9) 且降低缺血性中风的小鼠模型中大脑梗塞尺寸 (Leung等人, (2012) *Transl Stroke Res* 2012; 3: 381-9)。在施用阻断FIX的结合及FXIa进行的FIX的活化的抗FXI Ab的狒狒中,在包覆胶原蛋白的血管移植植物上观察到富血小板的血栓的生长减低 (Tucker等人, (2009) *Blood* 2009; 113: 936-44) 且在此模型中在14E11下发现类似结果 (Cheng 2010)。在这些研究中的任一个中未注意到过量出血。

[0226] 在小鼠 (Zhang等人, (2010) *Blood* 2010; 116: 4684-92)、食蟹猴 (Younis等人, (2012) *Blood* 2012; 119: 2401-8) 及狒狒 (Crosby等人, (2013) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013; 33: 1670-8) 中用反义寡核苷酸阻断FXI合成在无过量出血下产生抗血栓剂及抗促凝剂效果。此外,在大鼠 (Schumacher等人, (2007) *Eur J Pharmacol* 2007; 570: 167-74) 及兔 (Wong等人, (2011) *J Thromb Thrombolysis* 2011; 32: 129-37) 中的血栓的静脉及动脉模型中类似效果已由用低分子量抑制剂阻断FXIa产生。

[0227] 重度FXI缺乏患者很少自发出血且其仅展示轻度创伤诱导出血,具有高纤维蛋白溶解活性的组织中除外。重度FXI缺乏的罕见性使得必须使用群体研究,该群体研究相对于一般群体展现这些患者的血栓概况。值得注意的是,此类研究报导这些患者中缺血性中风 (Salomon 2008) 及深层静脉血栓形成 (DVT) (Salomon等人, (2011) *Blood* 2008; 111: 4113-17) 的发生率降低。因此,在115位重度FXI缺乏患者中观察到的局部缺血性中风 (N=1) 的数量低于 ($p<0.003$) 一般犹太人群体中的预期发生率 (N=8.6), 而重度FXI缺乏患者中DVT的发生率 (N=0) 低于 ($p<0.019$) 对照群体中所预期 (N=4.7)。相反,FXI含量高于90%的个体发生DVT的风险为两倍 (Meijers等人, (2000) *N Engl J Med.* 2000; 342: 696-701)。

[0228] 近年来,经全膝置换 (一种易患DVT的程序) 的患者用FXI反义疗法 (antisense therapy) 或标准疗法 (standard of care) (依诺肝素) 治疗。反义组 (300mg) 与标准疗法相

比显示静脉血栓发生率降低7倍且较少(不显著)出血事件(Büller等人, (2014) N Engl J Med. 372 (3) :232-40. doi:10.1056/NEJMoa 1405760. Epub 2014年12月7日)。

[0229] 总而言之,以上研究强烈支持FXI作为抗血栓治疗的有效目标。

[0230] FXIa抗体及抗原结合片段

[0231] 本发明提供特异性结合至FXI和/或FXIa的抗体。在一些实施例中,本发明提供特异性结合至人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa的抗体。本发明的抗体包括(但不限于)人单克隆抗体及Fab,如实施例中所述分离。

[0232] 本发明提供特异性结合FXI和/或FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa)的抗体,其中该抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:9及29的VH域。本发明也提供特异性结合至FXI和/或FXIa蛋白的抗体,其中该抗体包含具有下文表1中所列的任一VH CDR的氨基酸序列的VH CDR。特别地,本发明提供特异性结合至FXI和/或FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa)的抗体,其中该抗体包含一个、两个、三个或更多个具有下文表1中所列的任一VH CDR氨基酸序列的VH CDR(或者由其组成)。

[0233] 本发明提供特异性结合至FXIa蛋白的抗体,该抗体包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:19或39的VL结构域。本发明也提供特异性结合至FXI和/或FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa)的抗体,该抗体包含具有下文表1中所列的任一VL CDR氨基酸序列的VL CDR。特别地,本发明提供特异性结合至FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXI和/或FXIa)的抗体,该抗体包含一个、两个、三个或更多个具有下文表1中所列的任一VL CDR氨基酸序列的VL CDR(或者由其组成)。

[0234] 本发明的其他抗体包括已突变,然而CDR区域与表1所述序列中所描绘的CDR区域具有至少60%、70%、80%、85%、90%或95%序列同一性的氨基酸。在一些实施例中,相较于表1所述序列中所描绘的CDR区域,其包括CDR区域中不超过1个、2个、3个、4个或5个氨基酸已突变的突变型氨基酸序列。

[0235] 本发明也提供编码特异性结合至FXI和/或FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXIa)的抗体的VH、VL、全长重链及全长轻链的核酸序列。此类核酸序列可就在哺乳动物细胞中的表达实现优化(例如表1展示本发明抗体的重链及轻链的优化核酸序列)。

[0236] 表1.FXIa抗体、Fab及FXIa蛋白的实施例

[0237]

序列描述	序列识别号 (SEQ ID NO:)	氨基酸或多核苷酸序列
人 FXIa 全长蛋白序列 (NCBI 参考序列： AAA51985)	1	MIFLYQVVHF ILFTSVSGEC VTQLLKDTCF EGGDITTVFT PSAKYCQVVC TYHPRCLLFT FTAESPSEDP TRWFTCVLKD SVTETLPRVN RTAAISGYSF KQCSHQISAC NKDIYVDLDM KGINYNSSVA KSAQECQERC TDDVHCHFFT YATRQFPSLE HRNICLLKHT QTGTPTRITK LDKVVS GFSL KSCALSNLAC IRDIFPNTVF ADSNIDSVMA PDAFVSGRIC THHPGCLFFT FFSQEWPKEs QRNLCLLKTS ESGLPSTRIK KSKALSGFSL QSCRHSIPVF CHSSFYHDTD FLGEELDIVA AKSHEACQKL CTNAVRCQFF TYTPAQASCN EGKGKCYLKL SSNGSPTKIL HGRGGISGYT LRLCKMDNEC TTKIKPRIVG GTASVRGEWP WQVTLHTTSP TQRHLCGSI IGNQWILTAA HCFYGVESPK ILRVYSILN QSEIKEDTSF FGVQEIIHD QYKMAESGYD IALLKLETTV NYTDSQRPIC LPSKGDNRVI YTDWCWTGWG YRKLDRKIQN TLQKAKIPLV TNEECQKRYR GHKITHKMIC AGYREGKDA CKGDSGGPLS CKHNEVWHLV GITSWGEGCA QRERPGVYTN VVEYVDWILE KTQAV
人 FXIa 全长核苷酸序列 (NCBI 参考序列： NM_000128.3)	2	AGGCACACAG GCAAAATCAA GTTCTACATC TGTCCCTGTG TATGTCACCT GTTTGAATAC GAAATAAAAT TAAAAAATA AATTCAGTGT ATTGAGAAAG CAAGCAATTC TCTCAAGGTA TATTTCTGAC ATACTAAGAT TTTAACGACT TTCACAATA TGCTGTACTG AGAGAGAATG TTACATAACA TTGAGAACTA GTACAAGTAA ATATTAAAGT GAAGTGACCA TTTCCTACAC AAGCTCATTC AGAGGAGGAT GAAGACCATT TTGGAGGAAG AAAAGCACCC TTATTAAGAA TTGCAGCAAG TAAGCCAACA AGGTCTTTTC AGGATGATTT TCTTATATCA AGTGGTACAT TTCATTTTAT TTACTTCAGT TTCTGGTGAA TGTGTGACTC AGTTGTTGAA GGACACCTGC TTTGAAGGAG GGGACATTAC TACGGTCTTC ACACCAAGCG CCAAGTACTG CCAGGTAGTC TGCACTTACC ACCCAAGATG TTTACTCTTC ACTTTCACGG CGGAATCACC ATCTGAGGAT CCCACCCGAT GGTTTACTTG TGTCCTGAAA GACAGTGTTA CAGAAACACT GCCAAGAGTG AATAGGACAG CAGCGATTTT TGGGTATTCT TTCAAGCAAT GCTCACACCA AATAAGCGCT TGCAACAAAG ACATTTATGT GGACCTAGAC ATGAAGGGCA TAAACTATAA CAGCTCAGTT GCCAAGAGTG CTCAAGAATG CCAAGAAAGA TGCACGGATG ACGTCCACTG CCACTTTTTC ACGTACGCCA CAAGGCAGTT TCCCAGCCTG GAGCATCGTA ACATTTGTCT ACTGAAGCAC ACCCAAACAG GGACACCAAC CAGAATAACG AAGCTCGATA AAGTGGTGTC TGGATTTTCA CTGAAATCCT GTGCACTTTC

[0238]

		TAATCTGGCT TGTATTAGGG ACATTTTCCC TAATACGGTG TTTGCAGACA GCAACATCGA CAGTGTCTATG GCTCCCGATG CTTTTGTCTG TGGCCGAATC TGCATCTATC ATCCCGGTTG CTTGTTTTTT ACCTTCTTTT CCCAGGAATG GCCCAAAGAA TCTCAAAGAA ATCTTTGTCT CCTTAAACA TCTGAGAGTG GATTGCCCAG TACACGCATT AAAAAGAGCA AAGCTCTTTC TGGTTTCAGT CTACAAAGCT GCAGGCACAG CATCCCAGTG TTCTGCCATT CTTTATTTTA CCATGACACT GATTTCTTGG GAGAAGAACT GGATATTGTT GCTGCAAAAA GTCACGAGGC CTGCCAGAAA CTGTGCACCA ATGCCGTCCG CTGCCAGTTT TTTACCTATA CCCAGGCCA AGCATCCTGC AACGAAGGGA AGGGCAAGTG TTACTTAAAG CTTTCTTCAA ACGGATCTCC AACTAAAATA CTTACGCGGA GAGGAGGCAT CTCTGGATAC ACATTAAGGT TGTGTAAAT GGATAATGAG TGTACCACCA AAATCAAGCC CAGGATCGTT GGAGGAAGTG CGTCTGTTTCG TGGTGAGTGG CCGTGGCAGG TGACCCTGCA CACAACCTCA CCCACTCAGA GACACCTGTG TGGAGGCTCC ATCATTTGGA ACCAAGTGAT ATTAACAGCC GCTCACTGTT TCTATGGGGT AGAGTCACCT AAGATTTTGC GTGTCTACAG TGGCATTTTA AATCAATCTG AAATAAAGA GGACACATCT TTCTTTGGGG TTCAAGAAAT AATAATCCAT GATCAGTATA AAATGGCAGA AAGCGGGTAT GATATTGCCT TGTTGAAACT GGAAACCA GTGAATTACA CAGATTCTCA ACGACCCATA TGCCTGCCTT CCAAAGGAGA TAGAAATGTA ATATACACTG ATTGCTGGGT GACTGGATGG GGGTACAGAA AACTAAGAGA CAAAATACAA AATACTCTCC AGAAAGCCAA GATACCCTTA GTGACCAACG AAGAGTGCCA GAAGAGATAC AGAGGACATA AAATAACCCA TAAGATGATC TGTGCCGGCT ACAGGGAAGG AGGGAAGGAC GCTTGCAAGG GAGATTCGGG AGGCCCTCTG TCCTGCAAAC ACAATGAGGT CTGGCATCTG GTAGGCATCA CGAGCTGGGG CGAAGGCTGT GCTCAAAGGG AGCGGCCAGG TGTTTACACC AACGTGGTCG AGTACGTGGA CTGGATTCTG GAGAAAACTC AAGCAGTGTG AATGGGTTCC CAGGGGCCAT TGGAGTCCCT GAAGGACCCA GGATTTGCTG GGAGAGGGTG TTGAGTTCAC TGTGCCAGCA TGCTTCCTCC ACAGTAACAC GCTGAAGGGG CTTGGTGTTT GTAAGAAAT GCTAGAAGAA AACAACTGT CACAAGTTGT TATGTCCAAA ACTCCCGTTC TATGATCGTT GTAGTTTGTT TGAGCATTCG GTCTCTTTGT TTTTGATCAC GCTTCTATGG AGTCCAAGAA TTACCATAAG GCAATATTTT TGAAGATTAC TATATAGGCA GATATAGCAG AAAATAACCA AGTAGTGGCA GTGGGGATCA GGCAGAAGAA CTGGTAAAAAG AAGCCACCAT AAATAGATTT GTTCGATGAA AGATGAAAA TGGAAGAAAG GAGAACAAAG ACAGTCTTCA CCATTTTGCA GGAATCTACA CTCTGCCTAT GTGAACACAT TTCTTTTGTA AAGAAAGAAA TTGATTGCAT TTAATGGCAG ATTTTCAGAA TAGTCAGGAA TTCTTGTCAT TTCCATTTTA AAATATATAT TAAAAAAAT CAGTTCGAGT AGACACGAGC TAAGAGTGAA TGTGAAGATA ACAGAATTTT TGTGTGGAAG AGGATTACAA GCAGCAATTT ACCTGGAAGT GATACCTTAG GGGCAATCTT GAAGATACAC TTTCTGAAA AATGATTTGT GATGGATTGT ATATTTATTT AAAATATCTT GGGAGGGGAG GCTGATGGAG ATAGGGAGCA TGCTCAAACC TCCCTAAGAC AAGCTGCTGC TGTGACTATG GGCTCCCAA GAGCTAGATC GTATATTTAT TTGACAAAAA TCACCATAGA CTGCATCCAT ACTACAGAGA AAAAACAATT AGGGCGCAAA TGGATAGTTA CAGTAAAGTC TTCAGCAAGC AGCTGCCTGT ATTCTAAGCA CTGGGATTTT CTGTTTCGTG CAAATATTTA TCTCATTTAT GTTGTGATCT AGTTCAATAA CCTAGAATTT GAATTGTCAC CACATAGCTT TCAATCTGTG CCAACAACCTA TACAATTCAT CAAGTGTG
NOV1090		

[0239]

HCDR1 (Kabat)	3	TAAMS
HCDR2 (Kabat)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Kabat)	5	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Chothia)	6	GFTFSTA
HCDR2 (Chothia)	7	SGSGSS
HCDR3 (Chothia)	8	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (IMGT)	43	GFTFSTAA
HCDR2 (IMGT)	44	ISGSGSST
HCDR3 (IMGT)	45	ARELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (组合的)	46	GFTFSTAAMS
HCDR2 (组合的)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (组合的)	5	ELSYLYSGYYFDY
VH	9	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGLVTVSS
编码 VH 的 DNA	10	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGG GTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTT TTCTACTGCTGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGGTTCCGGTATCTCTGGTCTGGTCTCTCTA CCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG CGATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGCGCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTGT CTTACCTGTACTCTGGTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGG CACCTGGTGACTGTAGCTCA
重链	11	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
编码重链的 DNA	12	CAGGTGCAATTGCTGGAAAGCGGCGGTGGCCTGGTGCAGCCGG GTGGCAGCCTGCGTCTGAGCTGCGCGGCGTCCGGATTACCTT TTCTACTGCTGCTATGTCTTGGGTGCGCCAGGCCCGGGCAAA GGTCTCGAGTGGGTTCCGGTATCTCTGGTCTGGTCTCTCTA CCTACTATGCGGATAGCGTGAAAGGCCGCTTTACCATCAGCCG CGATAATTCGAAAAACACCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTG CGTGCGGAAGATACGCGCGTGTATTATTGCGCGCGTGAAGTGT CTTACCTGTACTCTGGTACTACTTCGATTACTGGGGCCAAGG CACCTGGTGACTGTAGCTCAGCCTCCACCAAGGTCCATCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGCA CAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGCGGTG CACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCC TCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCA GACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAG GTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTACA CATGCCCACCGTGCCAGCACCTGAAGCAGCGGGGGGACCGTC AGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATC TCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTAC

[0240]

		AACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA CAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCC AAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCAT CCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCT GGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAG AGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAAGCTCAC CGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA
LCDR1 (Kabat)	13	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Kabat)	14	KNYNRPS
LCDR3 (Kabat)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Chothia)	16	SSSNIGSND
LCDR2 (Chothia)	17	KNY
LCDR3 (Chothia)	18	WDQRQFDV
LCDR1 (IMGT)	47	SSNIGSND
LCDR2 (IMGT)	37	KNY
LCDR3 (IMGT)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (组合的)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (组合的)	14	KNYNRPS
LCDR3 (组合的)	15	SAWDQRQFDVV
VL	19	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVL
编码 VL 的 DNA	20	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGG GCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAACAT TGGTTCTAACGACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACG GCGCCGAAACTGCTGATCTACAAAACTACAACCGCCCGAGCG GCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACACGCGC CAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGAT TATTACTGCTCTGCTTGGGACCAGCGTCAGTTCGACGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTA
轻链	21	DIVLTQPPSVSGAPGQRVTISCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVLQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
编码轻链的 DNA	22	GATATCGTGCTGACCCAGCCGCCGAGCGTGAGCGGTGCACCGG GCCAGCGCGTGACCATTAGCTGTAGCGGCAGCAGCAACAT TGGTTCTAACGACGTGTCTTGGTACCAGCAGCTGCCGGGCACG GCGCCGAAACTGCTGATCTACAAAACTACAACCGCCCGAGCG GCGTGCCGGATCGCTTTAGCGGATCCAAAAGCGGCACACGCGC CAGCCTGGCGATTACCGGCCTGCAAGCAGAAGACGAAGCGGAT TATTACTGCTCTGCTTGGGACCAGCGTCAGTTCGACGTTGTGT TTGGCGGCGGCACGAAGTTAACCGTCCTAGGTGAGCCCAAGGC TGCCCCCTCGGTCACTCTGTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTT CAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTATAAGTGAAGTCTT ACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCC CGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACACACCCCTCCAAACAAAGC AACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTGAGCCTGACGCCTG AGCAGTGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTACGCA TGAAGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCTACAGAATGT TCA

[0241]

NOV1401		
HCDR1 (Kabat)	23	TAAMS
HCDR2 (Kabat)	24	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (Kabat)	25	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (Chothia)	26	GFTFSTA
HCDR2 (Chothia)	27	SGSGSS
HCDR3 (Chothia)	28	ELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (IMGT)	43	GFTFSTAA
HCDR2 (IMGT)	44	ISGSGSST
HCDR3 (IMGT)	45	ARELSYLYSGYYFDY
HCDR1 (组合的)	46	GFTFSTAAMS
HCDR2 (组合的)	4	GISGSGSSTYYADSVKG
HCDR3 (组合的)	5	ELSYLYSGYYFDY
VH	29	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGLVTVSS
编码 VH 的 DNA	30	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTT TAGCACC GCCGCTATGAGCTGGGTTCGACAGGCCCCAGGAAA GGCCTCGAGTGGGTCTCAGGGATTAGCGGTAGCGGCTCTAGCA CCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCCTACTCTCTAG GGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTG AGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCTGA GCTACCTGTATAGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGTCAAGG CACCTGGTCCACCGTGTCTAGC
重链	31	QVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSTAAMSWVRQAPGK GLEWVSGISGSGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCARELSYLYSGYYFDYWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKRVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVAVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALAAPIEKTISKAK KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
编码重链的 DNA	32	CAGGTGCAGCTGCTGGAATCAGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTG GCGGTAGCCTGAGACTGAGCTGCGCTGCTAGTGGCTTACCTT TAGCACC GCCGCTATGAGCTGGGTTCGACAGGCCCCAGGAAA GGCCTCGAGTGGGTCTCAGGGATTAGCGGTAGCGGCTCTAGCA CCTACTACGCCGATAGCGTGAAGGGCCGGTTCCTACTCTCTAG GGATAACTCTAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAATAGCCTG AGAGCCGAGGACACCGCCGTCTACTACTGCGCTAGAGAGCTGA GCTACCTGTATAGCGGCTACTACTTCGACTACTGGGGTCAAGG CACCTGGTCCACCGTGTCTAGCGCTAGCACTAAGGGCCCTCC GTGTTCCCTCTGGCCCCCTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGCA CAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCTGAGCC TGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCTGGCGTG CACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCC TGTCTCCGTGGTCAAGTGCCTTCAAGCAGCCTGGGACCCCA GACCTATATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAG GTGGACAAGCGGTGGAGCCTAAGTCTGCGACAAGACCCACA CCTGTCTCCCTGCCCTGCTCCTGAACTGCTGGGCGGCCCTTC TGTGTTCTGTTCCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATC TCCCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGCGGTGTCCC ACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGT

[0242]

		GGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAACAGTAC AACTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCACC AGGACTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAAGTCTCCAA CAAGGCCCTGGCCGCCCTATCGAAAAGACAATCTCCAAGGCC AAGGGCCAGCCTAGGGAACCCAGGTGTACACCCTGCCACCCA GCCGGGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCT GGTCAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAG TCTAACGGCCAGCCTGAGAACAACATAAGACCACCCCTCTCTG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTGTACTCCAACTGAC CGTGGACAAGTCCCGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTCTGC TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CCCTGTCCCTGTCTCCCGCAAG
LCDR1 (Kabat)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (Kabat)	34	KNYNRPS
LCDR3 (Kabat)	35	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (Chothia)	36	SSSNIGSND
LCDR2 (Chothia)	37	KNY
LCDR3 (Chothia)	38	WDQRQFDV
LCDR1 (IMGT)	47	SSNIGSND
LCDR2 (IMGT)	37	KNY
LCDR3 (IMGT)	15	SAWDQRQFDVV
LCDR1 (组合的)	33	SGSSSNIGSNDVS
LCDR2 (组合的)	14	KNYNRPS
LCDR3 (组合的)	15	SAWDQRQFDVV
VL	39	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVL
编码 VL 的 DNA	40	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTG GTCAAAGAGTGACTATTAGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATAT CGGCTCTAACGACGTCAGCTGGTATCAGCAGCTGCCCCGCACC GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGAACTATAATAGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAATCAGGGACTTCTGC TAGTCTGGCTATTAGCGGCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGAC TACTACTGTAGCGCTGGGATCAGCGTCAGTTCGACGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTG
轻链	41	QSVLTQPPSASGTPGQRTVITSCSGSSSNIGSNDVSWYQQLPGT APKLLIYKNYNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEAD YYCSAWDQRQFDVVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEEL QANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQS NNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTEC S
编码轻链的 DNA	42	CAGTCAGTCCTGACTCAGCCCCCTAGCGCTAGTGGCACCCCTG GTCAAAGAGTGACTATTAGCTGTAGCGGCTCTAGCTCTAATAT CGGCTCTAACGACGTCAGCTGGTATCAGCAGCTGCCCCGCACC GCCCCTAAGCTGCTGATCTATAAGAACTATAATAGGCCTAGCG GCGTGCCCGATAGGTTTAGCGGATCTAAATCAGGGACTTCTGC TAGTCTGGCTATTAGCGGCTGCAGTCAGAGGACGAGGCCGAC TACTACTGTAGCGCTGGGATCAGCGTCAGTTCGACGTGGTGT TCGGCGGAGGCACTAAGCTGACCGTGCTGGGTCAACCTAAGGC TGCCCCCAGCGTGACCCTGTTCCCCCCCAGCAGCGAGGAGCTG CAGGCCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTGATCAGCGACTTCT ACCCAGGCGCCGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACAGCAGCCC CGTGAAGGCCGCGTGGAGACCACCACCCCGCAAGCAGAGC AACAACAAGTACGCCGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACCCCCG AGCAGTGGGAAGAGCCACAGGTCCTACAGCTGCCAGGTGACCCA CGAGGGCAGCACCGTGGAAAAGACCGTGGCCCCAACCGAGTGC AGC

[0243] 本发明的其他抗体包括氨基酸或编码氨基酸的核酸已突变,但与描述于表1中的序列具有至少60、65、70、75、80、85、90或95%同一性的那些抗体。一些实施方式包括突变氨基酸序列,其中当相比于描绘于表1中的序列所描绘的可变区时,不超过1个、2个、3个、4个或5个氨基酸已在可变区中发生突变,同时保持基本上相同的抗原结合活性。

[0244] 由于这些抗体中的每一个均可结合至FXI和/或FXIa,因此VH、VL、全长轻链及全长

重链序列(氨基酸序列及编码氨基酸序列的核苷酸序列)可经“混合及匹配”以产生本发明的其他FXI和/或FXIa结合抗体。此类“经混合及匹配”的FXI和/或FXIa结合抗体可使用本领域中已知的结合分析(例如ELISA及实施例章节中所述的其他分析)来测试。当这些链混合及匹配时,来自特定VH/VL配对的VH序列应经结构上类似的VH序列置换。同样,来自特定全长重链/全长轻链配对的全长重链序列应经结构上类似的全长重链序列置换。同样,自特定VH/VL配对的VL序列应用结构上类似的VL序列替换。同样,自特定全长重链/全长轻链配对的全长轻链序列应用结构上类似的全长轻链序列置换。

[0245] 因此,在一个方面中,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合区,其具有:包含选自SEQ ID NO:9及29的氨基酸序列的重链可变结构域,及包含选自SEQ ID NO:19及39的氨基酸序列的轻链可变结构域,其中该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人\兔及食蟹猴FXIa)。

[0246] 更具体的,在某些方面中,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合区,其具有包含分别选自SEQ ID NO:9及29;或19及39的重链可变结构域及轻链可变结构域。

[0247] 在一具体实施方案中,特异性结合于人FXI和/或FXIa的本文提供的抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链可变区。

[0248] 在一具体实施方案中,特异性结合于人FXI和/或FXIa的本文提供的抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列的轻链可变区。

[0249] 在另一方面中,本发明提供(i)分离的抗体,其具有:包含选自SEQ ID NO:11或31就在哺乳动物细胞中表达而言已经优化的氨基酸序列的全长重链,及包含选自SEQ ID NO:21或41就在哺乳动物细胞中表达而言已经优化的氨基酸序列的全长轻链;或(ii)功能蛋白,其包含其抗原结合部分。更具体的,在某些方面中,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合区,其具有包含分别选自SEQ ID NO:11及31;或19及39的氨基酸序列的重链及轻链。

[0250] 在一具体实施方案中,特异性结合于人FXI和/或FXIa的本文提供的抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的重链及包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的轻链。

[0251] 在一具体实施方案中,特异性结合于人FXI和/或FXIa的本文提供的抗体或其抗原结合片段包含有包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:41的氨基酸序列的轻链可变区。

[0252] 如本文所用,术语“互补决定区”及“CDR”是指抗体可变区内赋予抗原特异性及结合亲和力的氨基酸序列。一般而言,各重链可变区中存在三种CDR(HCDR1、HCDR2、HCDR3),且各轻链可变区中存在三种CDR(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

[0253] 给定CDR的精确氨基酸序列边界可容易使用多种熟知流程中的任一个确定,该流程包括Kabat等人(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,公共卫生署(Public Health Service),美国国家卫生研究院(National Institutes of Health),Bethesda,MD(“Kabat”编号流程);Al-Lazikani等人,(1997) JMB 273,927-948(“Chothia”编号流程);Lefranc等人,(2003) Dev.Comp.Immunol.,27,55-77(“IMGT”编号流程)或“组合的”系统所述的那些流程。

[0254] 例如,根据Kabat,抗体NOV1090在重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为31至35(HCDR1)、50至66(HCDR2)及99至111(HCDR3);且轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为22至35(LCDR1)、51至57(LCDR2)及90至100(LCDR3)。根据Chothia,VH中的CDR氨基酸编号为26至32(HCDR1)、52至57(HCDR2)及99至111(HCDR3);且VL中的氨基酸残基编号为25至33(LCDR1)、51至53(LCDR2)及92至99(LCDR3)。根据Kabat与Chothia的CDR定义组合,CDR是由人VH中的氨基酸残基26至35(HCDR1)、50至66(HCDR2)及99至111(HCDR3)及人VL中的氨基酸残基22至35(LCDR1)、51至57(LCDR2)及90至100(LCDR3)组成。根据Kabat与Chothia的CDR定义组合,“组合的”CDR由人VH中的氨基酸残基26至35(HCDR1)、50至66(HCDR2)及99至108(HCDR3)及人VL中的氨基酸残基24至38(LCDR1)、54至60(LCDR2)及93至101(LCDR3)组成。作为另一实施例,根据IMGT,将重链可变结构域(VH)中的CDR氨基酸残基编号为26至33(HCDR1)、51至58(HCDR2)及97至108(HCDR3);且将轻链可变结构域(VL)中的CDR氨基酸残基编号为27至36(LCDR1)、54至56(LCDR2)及93至101(LCDR3)。表1提供抗FXI/FXIa抗体(例如NOV1090及NOV1401)的例示性Kabat、Chothia、组合的及IMGT HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3。在另一方面中,本发明提供FXIa结合抗体,其包含如表1中所述的重链及轻链CDR1、CDR2及CDR3或其组合。抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:3及23中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:4及24中。抗体的VH CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:5及25中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:13及33中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:14及34中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:15及35中。这些CDR区使用Kabat系统描绘。

[0255] 或者,如使用Chothia系统(Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948)所定义,抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:6及26中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:7及27中。抗体的VH CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:8及28中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:16及36中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:17及37中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:18及38中。

[0256] 或者,如使用组合的系统所定义,抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:46中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:4中。抗体的VH CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:5中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:33中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:14中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:15中。

[0257] 或者,如使用IMGT编号流程所定义,抗体的VH CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:43中。抗体的VH CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:44中。抗体的VH CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:45中。抗体的VL CDR1的氨基酸序列示于SEQ ID NO:47中。抗体的VL CDR2的氨基酸序列示于SEQ ID NO:37中。抗体的VL CDR3的氨基酸序列示于SEQ ID NO:15中。

[0258] 假定这些抗体中的每一个可结合至FXI和/或FXIa且抗原结合特异性主要由CDR1、CDR2及CDR3区域提供,因此VH CDR1、CDR2及CDR3序列与VL CDR1、CDR2及CDR3序列可“经混合及匹配”(也即来自不同抗体的CDR可经混合及匹配,但各抗体优选含有VH CDR1、CDR2及CDR3以及VL CDR1、CDR2及CDR3以产生本发明的其他FXI和/或FXIa结合分子。此类“经混合及匹配”的FXI和/或FXIa结合抗体可使用本领域中已知的结合分析及实施例中所述的分析(例如ELISA、SET、BIACORE™分析)来测试。当VH CDR序列混合及匹配时,来自特定VH序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应经结构上类似的CDR序列置换。同样,当VL CDR序列混合及匹配

时,来自特定VL序列的CDR1、CDR2和/或CDR3序列应经结构上类似的CDR序列置换。本领域技术人员显而易见,新颖的VH及VL序列可通过用选自本文中针对本发明的单克隆抗体所示的CDR序列的结构类似序列取代一或多个VH和/或VL CDR区序列来产生。除前述以外,在一个实施方案中,本文所述的抗体的抗原结合片段可包含VH CDR1、CDR2及CDR3或VL CDR 1、2及3,其中该片段以单可变结构域结合至FXI和/或FXIa。

[0259] 在本发明的某些实施例中,抗体或其抗原结合片段可具有表1中所述的Fab的重链及轻链序列。更具体的,抗体或其抗原结合片段可具有NOV1090及NOV1401的重链及轻链序列。

[0260] 在本发明的其他实施例中,特异性结合FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2及轻链可变区CDR3,如Kabat所定义且如表1中所述。在本发明的其他实施例中,特异性结合FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2及轻链可变区CDR3,如Chothia所定义且如表1中所述。在其他实施例中,特异性结合FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2及轻链可变区CDR3,如组合的系统所定义且如表1中所述。在本发明的其他实施例中,特异性结合FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段包含重链可变区CDR1、重链可变区CDR2、重链可变区CDR3、轻链可变区CDR1、轻链可变区CDR2及轻链可变区CDR3,如IMGT所定义且如表1中所述。

[0261] 在一具体实施方案中,本发明包括特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ ID NO:3的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:13的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0262] 在一具体实施方案中,本发明包括特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ ID NO:23的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:24的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:25的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:34的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:35的轻链可变区CDR3。

[0263] 在一具体实施方案中,本发明包括特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ ID NO:6的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:7的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:8的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:16的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:17的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:18的轻链可变区CDR3。

[0264] 在一具体实施方案中,本发明包括特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ ID NO:26的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:27的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:28的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:36的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:37的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:38的轻链可变区CDR3。

[0265] 在一具体实施方案中,本文提供特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ ID NO:43的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:44的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:45的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:47的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:37的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0266] 在一具体实施方案中,本文提供特异性结合于FXI和/或FXIa的抗体,其包含SEQ

ID NO:46的重链可变区CDR1;SEQ ID NO:4的重链可变区CDR2;SEQ ID NO:5的重链可变区CDR3;SEQ ID NO:33的轻链可变区CDR1;SEQ ID NO:14的轻链可变区CDR2;及SEQ ID NO:15的轻链可变区CDR3。

[0267] 在某些实施例中,本发明包括如表1中所述的特异性结合至FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段。在一优选实施例中,结合FXI和/或FXIa的抗体或抗原结合片段为NOV1090及NOV1401。

[0268] 如本文所使用,人抗体包含重链或轻链可变区或全长重链或轻链,若抗体的可变区或全长链获自使用人种系免疫球蛋白基因的系统,则其为特定种系序列的“产物”或“来源于”特定种系序列。此类系统包括用目的抗原使具有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠免疫或用目的抗原筛选呈现在噬菌体上的人免疫球蛋白基因库。为人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“来源于”人种系免疫球蛋白序列的人抗体可通过将人抗体的氨基酸序列与人种系免疫球蛋白的氨基酸序列进行比较且选择按顺序(也即最大同一性百分比)最接近人抗体序列的人种系免疫球蛋白序列来如此识别。

[0269] 如与种系序列所比较,为特定人种系免疫球蛋白序列的“产物”或“来源于”特定人种系免疫球蛋白序列的人抗体可含有氨基酸差异,其归因于例如天然产生的体细胞突变或定点突变的有意引入。然而,在VH或VL构架区中,所选人抗体通常在氨基酸序列上与由人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少90%同一性,且含有当与其他物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列(例如鼠类种系序列)相比时鉴别人抗体为人的氨基酸残基。在某些情况下,人抗体在氨基酸序列上与通过种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少60%、70%、80%、90%,或至少95%,或甚至至少96%、97%、98%,或99%同一性。

[0270] 通常,重组人抗体在VH或VL构架区中将呈现异于通过人种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过10个氨基酸差异。在某些情况下,人抗体可能呈现异于通过种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列的不超过5个,或甚至不超过4个、3个、2个或1个氨基酸差异。人种系免疫球蛋白基因的实施例包括(但不限于)下文所述的可变结构域种系片段,以及DP47及DPK9。

[0271] 同源抗体

[0272] 在又一实施例中,本发明提供一种抗体或其抗原结合片段,其包含与表1中所述的序列(例如SEQ ID NO:29、31、39或41)同源的氨基酸序列,且抗体结合至FXI和/或FXIa蛋白(例如人、兔及食蟹猴FXIa),且保留表1中所述的那些抗体(诸如NOV1090及NOV1401)的所需功能特性。在具体方面中,此类同源抗体保留表1中所述的CDR氨基酸序列(例如Kabat CDR、Chothia CDR、IMGT CDR或组合的CDR)。

[0273] 例如,本发明提供一种分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其包含重链可变结构域及轻链可变结构域,其中该重链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:9及29的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链可变结构域包含与选自SEQ ID NO:19及39的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在一个实施方案中,分离的抗体或其功能性抗原结合片段包含重链可变结构域及轻链可变结构域,其中该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列具有至少80%、至少

90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在一个实施方案中,分离的抗体或其功能性抗原结合片段包含重链可变结构域及轻链可变结构域,其中该重链可变结构域包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链可变结构域包含与SEQ ID NO:39的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在本发明的某些方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由Kabat所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:3、4、5、13、14及15。在本发明的某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由Chothia所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:6、7、8、16、17及18。在某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由组合的系统所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:46、4、5、33、14及15。在某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由IMGT所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:43、44、45、47、37及15。

[0274] 在其他实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可与表1中所述的序列50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。在其他实施例中,VH和/或VL氨基酸序列可为相同的,但其中不超过1、2、3、4或5个氨基酸位置存在氨基酸取代。与表1中所述那些抗体的VH及VL区具有高(也即80%或大于80%)同一性的具有VH及VL区的抗体可通过分别编码SEQ ID NO:10或30及SEQ ID NO:20及40的核酸分子的突变诱发(例如定点或PCR介导的突变诱发),之后使用本文所述的功能性分析测试经编码的改变抗体的保留功能来获得。

[0275] 在其他实施例中,全长重链和/或全长轻链氨基酸序列可与表1中所述的序列(例如SEQ ID NO:11和/或21或31和/或41)具有50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。与SEQ ID NO:11或31中的任一个的全长重链及SEQ ID NO:21或41中的任一个的全长轻链具有高(也即80%或大于80%)同一性的具有全长重链及全长轻链的抗体可通过编码此类多肽的核酸分子的突变诱发(例如定点或PCR介导的突变诱发),之后使用本文所述的功能性分析测试经编码的改变抗体的保留功能来获得。

[0276] 在一个方面中,本文提供一种分离的抗体或其功能性抗原结合片段,其包含重链及轻链,其中该重链包含与选自SEQ ID NO:11及31的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链包含与选自SEQ ID NO:21及41的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在一个实施方案中,分离的抗体或其功能性抗原结合片段包含重链及轻链,其中该重链包含与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在一个实施方案中,分离的抗体或其功能性抗原结合片段包含重链及轻链,其中该重链包含与SEQ ID NO:31的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;该轻链包含与SEQ ID NO:41的氨基酸序列具有至少80%、至少90%或至少95%同一性的氨基酸序列;且该抗体特异性结合于FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。在本发明的某些方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由Kabat所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:3、4、5、13、14及15。在本发

明的某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由Chothia所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:6、7、8、16、17及18。在某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由组合的系统所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:46、4、5、33、14及15。在某些其他方面中,重链及轻链序列分别进一步包含由IMGT所定义的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2及LCDR3序列,例如SEQ ID NO:43、44、45、47、37及15。

[0277] 在其他实施例中,全长重链和/或全长轻链核苷酸序列可与表1中所述的序列(例如SEQ ID NO:12和/或22,或32和/或42)具有60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0278] 在其他实施例中,轻链核苷酸序列的重链可变区和/或轻链可变区可与表1中所述的序列(例如SEQ ID NO:10和/或20,或30和/或40)具有60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。

[0279] 如本文所使用,两个序列之间的同一性百分比为序列共享的相同位置的数目的函数(也即,同一性百分比等于相同位置数/总位置数 $\times 100$),考虑就两个序列的最佳比对而言需要引入的空位数及各空位的长度。如下文非限制性实施例中所述,序列比较及测定两个序列之间的同一性百分比可使用数学算法完成。

[0280] 或者或另外,本发明的蛋白序列可进一步用作“查询序列”以对公共数据库进行搜寻,例如鉴别相关序列。例如,此类检索可使用Altschul等人,1990J.Mol.Biol.215:403-10的BLAST程序(2.0版)进行。

[0281] 具有保守性修饰的抗体

[0282] 在某些实施例中,本发明的抗体具有包含CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区,其中这些CDR序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守修饰的特定氨基酸序列,且其中抗体保留本发明的FXIa结合抗体的所需功能特性。

[0283] 因此,本发明提供一种分离的抗体或其抗原结合片段,其由包含CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区组成,其中:该重链可变区CDR1氨基酸序列选自SEQ ID NO:3及23及其保守性修饰;该重链可变区CDR2氨基酸序列选自SEQ ID NO:4及24及其保守性修饰;该重链可变区CDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:5及25及其保守性修饰;该轻链可变区CDR1氨基酸序列选自SEQ ID NO:13及33及其保守性修饰;该轻链可变区CDR2氨基酸序列选自SEQ ID NO:14及34及其保守性修饰;该轻链可变区CDR3氨基酸序列选自SEQ ID NO:15及35及其保守性修饰;且该抗体或其抗原结合片段特异性结合于FXIa。

[0284] 在一个方面中,本文提供一种分离的抗体或其抗原结合片段,其由包含CDR1、CDR2及CDR3序列的重链可变区及包含CDR1、CDR2及CDR3序列的轻链可变区组成,其中:该重链可变区CDR1氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;该重链可变区CDR2氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;该重链可变区CDR3氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;该轻链可变区CDR1氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;该轻链可变区CDR2氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;该轻链可变区CDR3氨基酸序列选自表1中所述的那些序列及其保守性修饰;且该抗

体或其抗原结合片段特异性结合至FXIa。

[0285] 在其他实施例中,就在哺乳动物细胞中表达而言优化的本发明抗体具有全长重链序列及全长轻链序列,其中这些序列中的一个或多个具有基于本文所述的抗体或其保守性修饰的特定氨基酸序列,且其中抗体保留本发明的FXIa结合抗体的所需功能特性。因此,本发明提供一种就在哺乳动物细胞中表达而言经优化的分离的抗体,其由全长重链及全长轻链组成,其中该全长重链具有选自SEQ ID NO:11或31及其保守性修饰的氨基酸序列;且该全长轻链具有选自SEQ ID NO:21或41及其保守性修饰的氨基酸序列;且抗体特异性结合至FXI和/或FXIa(例如人、兔及食蟹猴FXIa)。

[0286] 结合至相同表位的抗体

[0287] 本发明提供与表1中所述的FXI和/或FXIa结合抗体结合至相同表位的抗体。其他抗体因此可在FXI和/或FXIa结合分析(诸如实施例部分中所述的那些分析)中根据其与其他本发明抗体竞争(例如以统计显著方式竞争性抑制结合至相同或重叠表位的结合)的能力进行识别。测试抗体抑制本发明的抗体与FXI和/或FXIa蛋白结合的能力表明测试抗体可与该抗体竞争结合至FXI和/或FXIa;根据非限制性理论,此类抗体可结合至与其所竞争的抗体相同或相关(例如结构上相似或空间上邻近)的FXI和/或FXIa蛋白的表位。在某一具体实施例中,结合至与本发明的抗体相同的FXI和/或FXIa表位的抗体为人单克隆抗体。此类人单克隆抗体可如本文所述制备及分离。

[0288] 如本文所用,当竞争性抗体结合至与本发明的抗体或抗原结合片段(例如NOV1401或NOV1090)相同的FXI和/或FXIa表位且在等摩尔浓度的竞争性抗体存在下抑制本发明的抗体或抗原结合片段的FXI和/或FXIa结合超过50%(例如80%、85%、90%、95%、98%或99%)时,抗体“竞争”以结合。这可在竞争性结合分析中,例如由本领域技术人员熟知的方法中的任一个来确定。

[0289] 如本文所用,抗体或其抗原结合片段并不与本发明的FXI和/或FXIa抗体或抗原结合片段(例如NOV1401 NOV1090)“竞争”,除非该竞争性抗体或其抗原结合片段结合与本发明的抗体或抗原结合片段相同的FXI和/或FXIa表位,或重叠FXI和/或FXIa表位。如本文所用,竞争性抗体或其抗原结合片段不包括具有以下特征之一:(i)空间上阻断本发明的抗体或抗原结合片段结合其目标(例如若该竞争性抗体结合至邻近非重叠FXI和/或FXIa表位且以物理方式防止本发明的抗体或抗原结合片段结合其目标);和/或(ii)结合至不同非重叠FXI和/或FXIa表位且诱导FXI和/或FXIa蛋白的构象变化以使得该蛋白可不再以不存在该构象变化下进行的方式与本发明的FXI和/或FXIa抗体或抗原结合片段结合。

[0290] 经工程改造及经修饰的抗体

[0291] 本发明的抗体进一步可使用具有本文中所示的VH和/或VL序列中的一个或多个的抗体来制备作为工程改造经修饰抗体的起始材料,该经修饰抗体可具有自起始抗体的经改变的特性。抗体可通过在一种或两种可变区(也即VH和/或VL)内,例如一或多种CDR区内和/或在一或多种构架区内修饰一或更多个残基来工程改造。或者或另外,抗体可通过在恒定区内工程改造以例如改变抗体的效应功能。

[0292] 可进行的可变区工程改造的一种类型为CDR接枝。抗体主要通过位于六个重链及轻链互补决定区(CDR)中的氨基酸残基与目标抗原相互作用。出于此原因,个别抗体之间的CDR内的氨基酸序列比CDR外的序列更多样化。因为CDR序列造成大部分抗体抗原相互作用,

所以有可能表达重组抗体,其通过建构表达载体模拟特定天然存在的抗体的特性,所述表达载体包括接枝至自具有不同特性的不同抗体的构架序列上的自特定天然产生的抗体的CDR序列(参见例如Riechmann,L.等人,1998Nature 332:323-327;Jones,P.等人,1986Nature 321:522-525;Queen,C.等人,1989Proc.Natl.Acad.,U.S.A.86:10029-10033;Winter的美国专利第5,225,539号及Queen等人的美国专利第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,762号及第6,180,370号)。

[0293] 因此,本发明的另一实施例是关于分离的抗体或其抗原结合片段,其包含以下:重链可变区分别,其包含具有选自SEQ ID NO:3及23的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自SEQ ID NO:4及24的氨基酸序列的CDR2序列;具有选自SEQ ID NO:5及25的氨基酸序列的CDR3序列;轻链可变区分别,其具有有选自SEQ ID NO:13及33的氨基酸序列的CDR1序列;具有选自SEQ ID NO:14及34的氨基酸序列的CDR2序列;及由选自SEQ ID NO:15及35的氨基酸序列组成的CDR3序列。由此,此类抗体含有单克隆抗体的VH及VL CDR序列,但可能含有与这些抗体不同的构架序列。

[0294] 此类构架序列可获自公共DNA数据库或包括种系抗体基因序列的公开文献。例如,人重链及轻链可变区基因的种系DNA序列可见于"VBase"人种系序列数据库(基于全球信息网在mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase上获得)以及Kabat,E.A.等人,1991Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,美国卫生及公共服务部(U.S.Department of Health and Human Services),国家卫生研究院出版号91-3242;Tomlinson,I.M.等人,1992J.Mol.Biol.227:776-798;及Cox,J.P.L.等人,1994Eur.J Immunol.24:827-836;;每一个的内容以引用的方式明确并入本文中。

[0295] 用于本发明抗体的构架序列的一个实施例为结构上类似于本发明的所选抗体所使用的构架序列的构架序列,例如本发明的单克隆抗体所使用的共同序列和/或构架序列。VH CDR1、CDR2及CDR3序列及VL CDR1、CDR2及CDR3序列可接枝至构架区上,其具有与起源构架序列的种系免疫球蛋白基因中所发现的序列相同的序列,或CDR序列可接枝至与种系序列相比含有一或多种突变的构架区上。例如,已发现在某些情况下使构架区内的残基突变为有益的,以维持或增强抗体的抗原结合能力(参见例如Queen等人的美国专利第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,762号及第6,180,370号)。可用作在上面建构本文所述的抗体及抗原结合片段的骨架的构架包括(但不限于)VH1A、VH1B、VH3、Vk1、Vl2及Vk2。其他构架在本领域中已知,且可见于例如基于全球信息网在vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/index.php?&MMN_position=1:1下的vBase资料中。

[0296] 因此,本发明的一实施例是关于分离的FXIa结合抗体或其抗原结合片段,其包含有包含选自SEQ ID NO:9及29的氨基酸序列或在此类序列的构架区中具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的重链可变区,且进一步包含具有选自SEQ ID NO:19或39的氨基酸序列或在此类序列的构架区中具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的轻链可变区。

[0297] 可变区修饰的另一类型为使VH和/或VL CDR1、CDR2和/或CDR3区内的氨基酸残基发生突变以藉此改良所关注抗体的一或多种结合特性(例如亲和力),称为“亲和力成熟”。可进行定点突变诱发或PCR介导的突变诱发以引入突变且对抗体结合或目的其他功能性特性的影响可在如本文所述的体外或体内分析中评估且提供于实施例部分中。可引入保守性

修饰(如上文所论述)。突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外,典型地,在CDR区域内不超过一个、两个、三个、四个或五个经改变。

[0298] 因此,在另一实施例中,本发明提供分离的FXIa结合抗体或其抗原结合片段,其由以下组成:重链可变区,其具有由选自具有SEQ ID NO:3及23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:3及23相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区;具有选自SEQ ID NO:4及24的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4及24相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区;具有选自SEQ ID NO:5及25的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5及25相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区;具有选自SEQ ID NO:13及33的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13及33相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR1区;具有选自SEQ ID NO:14及34的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14及34相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR2区;及具有选自SEQ ID NO:15及35的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15及35相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0299] 因此,在另一实施例中,本发明提供分离的FXIa结合抗体或其抗原结合片段,其由以下组成:重链可变区,其具有由选自具有SEQ ID NO:6及26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6及26相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列组成的VH CDR1区;具有选自SEQ ID NO:7及27的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7及27相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR2区;具有选自SEQ ID NO:8及28的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8及28相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VH CDR3区;具有选自SEQ ID NO:16及36的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16及36相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR1区;具有选自SEQ ID NO:17及37的氨基酸序列或与SEQ ID NO:17及37相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR2区;及具有选自SEQ ID NO:18及38的氨基酸序列或与SEQ ID NO:18及38相比具有一个、两个、三个、四个或五个氨基酸取代、缺失或添加的氨基酸序列的VL CDR3区。

[0300] 抗原结合结构域接枝至替代构架或骨架中

[0301] 可使用很多种抗体/免疫球蛋白构架或骨架,只要所得多肽包括特异性结合至FXIa的至少一个结合区即可。此类构架或骨架包括人免疫球蛋白的5种主要独特型或其片段,且包括其他动物物种的免疫球蛋白,其优选具有人源化方面。就此而言,诸如在骆驼中识别的单重链抗体备受关注。本领域技术人员不断地发现及开发新颖的构架、骨架及片段。

[0302] 在一个方面中,本发明是关于使用本发明的CDR可接枝的非免疫球蛋白骨架产生基于非免疫球蛋白的抗体。可采用已知或未来非免疫球蛋白构架及骨架,只要其包含对目标FXI和/或FXIa蛋白具有特异性的结合区即可。已知非免疫球蛋白构架或骨架包括(但不限于)纤连蛋白(Compound Therapeutics, Inc., Waltham, MA)、锚蛋白(Molecular Partners AG, Zurich, 瑞士)、域抗体(Domantis, Ltd., Cambridge, MA及Ablynx nv, Zwijnaarde, Belgium)、脂质运载蛋白(Pieris Proteolab AG, Freising, 德国)、小模块免疫药物(Trubion Pharmaceuticals Inc., Seattle, WA)、最大抗体(Avidia, Inc., Mountain View, CA)、蛋白A(Affibody AG, Sweden)及阿菲林(affilin)(γ -晶体蛋白或泛素)(Scil

Proteins GmbH, Halle, 德国)。

[0303] 纤连蛋白骨架是基于纤连蛋白III型域(例如纤连蛋白III型的第十模块(10Fn3域))。纤连蛋白III型域具有分布在两个 β 片之间的7或8个 β 链,其自身彼此间填塞而形成蛋白质的核心,且进一步含有使 β 链彼此间连接且暴露于溶剂的环(与CDR类似)。在 β 片夹层结构的各边缘处存在至少三个此类环,其中边缘为蛋白垂直于 β 链方向的边界(参见US 6,818,418)。这些基于纤连蛋白的骨架不为免疫球蛋白,但总体折叠与包含骆驼及骆马IgG的完整抗原识别单元的最小功能抗体片段(重链可变区)的折叠密切相关。因为该结构,所以非免疫球蛋白抗体模拟对抗体的抗原结合特性在本质上和亲和力上类似的抗原结合特性。类似于体内抗体亲和力成熟方法,体外随机化及改组策略中可使用这些骨架。这些基于纤连蛋白的分子可用作骨架,其中分子的环区可使用标准克隆技术用本发明的CDR替换。

[0304] 锚蛋白技术是基于使用具有锚蛋白衍生的重复模块的蛋白用于承载可用于与不同目标结合的可变区的骨架。锚蛋白重复模块为一种由两个逆平行 α 螺旋及 β 转弯组成的33个氨基酸的多肽。可变区的结合主要通过使用核糖体呈现来优化。

[0305] 高亲和性多聚体(avimer)来源于含有天然A结构域的蛋白质,诸如LRP-1。这些结构域本质上用于蛋白-蛋白相互作用,且在人中逾250种蛋白在结构上是基于A结构域。高亲和性多聚体由通过氨基酸接头连接的多个不同“A结构域”单体(2至10个)组成。高亲和性多聚体可使用描述在例如美国专利申请公开案第20040175756号、第20050053973号、第20050048512号及第20060008844号中的方法产生,其可与目标抗原结合。

[0306] 亲和抗体(affibody)亲和力配体为由三螺旋束组成的简单小蛋白,该三螺旋束是基于蛋白A的IgG结合结构域之一的骨架。蛋白A为来自细菌金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的表面蛋白。此骨架域由58个氨基酸组成,使其中的13个随机化以产生具有大量配体变体的亲和抗体库(参见例如US 5,831,012)。亲和抗体分子模拟抗体,与分子量为150kDa的抗体相比,其分子量为6kDa。与亲和抗体分子的小尺寸无关,亲和抗体分子的结合位点类似于抗体的结合位点。

[0307] 抗运载蛋白(Anticalins)为Pieris ProteoLab AG公司开发的产品。其来源于脂质运载蛋白(一组广泛的小型稳定蛋白质,其通常涉及化学敏感或不溶化物的生理学运输或储存)。若干种天然脂质运载蛋白出现于人组织或体液中。蛋白质架构与免疫球蛋白类似,其中高变环位于刚性构架的顶部。然而,与抗体或其重组片段相比,脂质运载蛋白由具有160至180个氨基酸残基的单多肽链组成,其仅略大于单免疫球蛋白域。一组构成结合袋的四个环显示明显的结构可塑性且包容多个侧链。结合位点因此可以专有方法再成形以利用高亲和性及特异性识别不同形状的指定靶分子。大菜粉蝶(*Pieris Brassicae*)之后胆色素结合蛋白(bilin-binding protein;BBP),脂质运载蛋白家族中的一种蛋白质,已用于通过对该组四个环进行突变诱发来开发抗运载蛋白。描述抗运载蛋白的专利申请案的一个实施例存在于PCT公开案第W0 199916873号中。

[0308] 阿菲林(affilin)分子为小型非免疫球蛋白,其经设计而对蛋白及小分子具特异性亲和力。新阿菲林分子可极快速地选自两个文库,各文库均基于不同的人源骨架蛋白。阿菲林分子对免疫球蛋白不显示任何结构同源性。目前使用两种阿菲林骨架,其一为 γ 晶体(人结构性眼晶状体蛋白),且另一个为“泛素”超家族蛋白质。两种人骨架均极小,展示高温稳定性且几乎对pH值变化及变性剂具抗性。此高稳定性主要归因于蛋白的 β 片结构扩大。

γ 结晶体源蛋白质的实施例描述于W0200104144中且”泛素样”蛋白的实施例描述于W02004106368中。

[0309] 蛋白质表位模拟物(PEM)为模拟蛋白的 β 发夹二级结构(涉及蛋白-蛋白相互作用的主要二级结构)的中型、环状、肽样分子(MW 1-2kDa)。

[0310] 本发明提供特异性结合至FXIa蛋白的全人抗体。与嵌合或人源化抗体相比,当向人个体施用,本发明的FXIa结合抗体的抗原性进一步减小。

[0311] 骆驼科(camelid)抗体

[0312] 自骆驼及单峰驼(双峰骆驼(*Camelus bactrianus*)及单峰骆驼(*Calanus dromaderius*))家族成员(包括新世界成员,诸如骆马物种(羊驼(*Lama paccos*)、大羊驼(*Lama glama*)及瘦驼(*Lama vicugna*)))获得的抗体蛋白已在尺寸、结构复杂性及对个体体的抗原性方面加以表征。如自然界中所发现的来自此哺乳动物家族的某些IgG抗体缺少轻链,且因此在结构上不同于其他动物抗体的具有两条重链及两条轻链的典型四链四级结构。参见PCT/EP93/02214(1994年3月3日公开的W0 94/04678)。

[0313] 骆驼科抗体的识别为VHH的区域(小型单可变结构域)可通过遗传工程化获得,以产生对靶靶具有高亲和力的小型蛋白,产生称作“骆驼科纳米抗体”的衍生自抗体的低分子量蛋白。参见1998年6月2日发布的美国专利第5,759,808号;也参见Stijlemans,B.等人,2004J Biol Chem 279:1256-1261;Dumoulin,M.等人,2003Nature 424:783-788;Pleschberger,M.等人2003Bioconjugate Chem 14:440-448;Cortez-Retamozo,V.等人2002Int J Cancer 89:456-62及Lauwereys,M.等人1998EMBO J 17:3512-3520。骆驼科抗体及抗体片段的工程改造文库可购自例如Ablynx,Ghent,Belgium。如同非人来源的其他抗体,骆驼科抗体的氨基酸序列可重组改变以得到更密切类似人序列的序列,也即纳米抗体可经“人源化”。由此,可进一步减小骆驼科抗体对人的天然低抗原性。

[0314] 骆驼科纳米抗体的分子量为人IgG分子的约十分之一,且蛋白质的物理直径仅为几纳米。小尺寸的一种结果为骆驼科纳米抗体结合对较大抗体蛋白功能上不可见的抗原位点的能力,骆驼科纳米抗体适用作检测使用经典免疫技术而隐藏的抗原的试剂,且适用作可能的治疗剂。因此,小尺寸的又一结果为骆驼科纳米抗体由于结合至目标蛋白的凹槽或窄隙中的特定定位点而可具抑制作用,且因此相较于经典抗体的功能,可以更加类似于经典低分子量药物的功能的能力来发挥作用。

[0315] 低分子量及紧凑尺寸进一步使骆驼科纳米抗体极其热稳定,对极端pH值及蛋白水解消化稳定,且具弱抗原性。另一结果为骆驼科纳米抗体容易自循环系统移至组织中,且甚至跨过血脑障壁且可治疗影响神经组织的病症。纳米抗体可进一步促进药物跨过血脑屏障输送。参见2004年8月19日公开的美国专利申请案20040161738。与对人的低抗原性组合的这些特征指示巨大治疗潜力。此外,这些分子可在诸如大肠杆菌(*E.coli*)的原核细胞中完全表达,且表达为具有噬菌体的融合蛋白且具功能性。

[0316] 因此,本发明的特征为一种对FXI和/或FXIa具高亲和力的骆驼科抗体或纳米抗体。在本文的某些实施方案中,骆驼科抗体或纳米抗体在骆驼科动物中天然产生,也即使用本文就其他抗体描述的技术由骆驼科接着用FXI和/或FXIa或其肽片段进行免疫接种而产生。或者,FXI和/或FXIa结合骆驼科纳米抗体经工程改造,也即由例如使用淘选程序用FXI和/或FXIa和/或其结构和/或肽片段作为如本文实施例中所述的目标自展示适当诱变的骆

驼科纳米抗体蛋白的噬菌体文库中选择产生。经工程改造的纳米抗体可进一步通过遗传工程改造定制以使其在接受个体中的半衰期为45分钟至2周。在一具体实施方案中,骆驼科抗体或纳米抗体是通过将本发明的人抗体的重链或轻链的CDR序列移植至纳米抗体或单域抗体构架序列中来获得,如PCT/EP93/02214中的实施例所述。

[0317] 双特异性分子及多价抗体

[0318] 在另一方面中,本发明的特征在于包含本发明的FXI和/或FXIa结合抗体或其片段的双特异性或多特异性分子。本发明抗体或其抗原结合区可衍生为或连接至另一功能分子,例如另一肽或蛋白(例如另一抗体或受体的配体)以产生结合至至少两个不同结合位点或目标分子的双特异性分子。本发明的抗体可实际上衍生为或连接至一个以上其他功能分子,以产生与两个以上不同结合位点和/或目标分子结合的多特异性分子;此类多特异性分子也意欲由如本文所使用的术语“双特异性分子”所涵盖。为产生本发明的双特异性分子,本发明的抗体可在功能上与一或多个其他结合分子(诸如另一抗体、抗体片段、肽或结合模拟剂)连接(例由化学偶联、遗传融合、非共价结合或以其他方式连接),从而产生双特异性分子结果。

[0319] 因此,本发明包括双特异性分子,其包含至少一个对FXI和/或FXIa的第一结合特异性,及对第二目标表位的第二结合特异性。例如,第二目标表位为FXI和/或FXIa的与第一目标表位不同的另一表位。

[0320] 另外,就本发明中双特异性分子具多特异性而言,除第一及第二目标表位之外,分子可进一步包括第三结合特异性。

[0321] 在一个实施方案中,本发明的双特异性分子包含作为结合特异性的至少一个抗体或其抗体片段,包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv。如Ladner等人美国专利第4,946,778号中所述,抗体也可为轻链或重链二聚体或其任何最小片段,诸如Fv或单链构建体。

[0322] 双抗体为二价双特异性分子,其中VH及VL结构域在单多肽链上表达,其由过短而不容许同一链上的两个域之间配对的接头连接。VH及VL结构域与另一链的互补域配对,由此产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人,1993Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448;Poljak等人,1994Structure 2:1121-1123)。双抗体可通过在同一细胞内表达具有结构VHA-VLB及VHB-VLA(VH-VL构象)或VLA-VHB及VLB-VHA(VL-VH构象)的两个多肽链来产生。其中大多数可在细菌中以可溶形式表达。单链双抗体(scDb)是通过约15个氨基酸残基的接头连接两个形成双抗体的多肽链来产生(参见Holliger及Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(3-4):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology,2(1):21-36)。scDb可以可溶性、活性单体形式表达于细菌中(参见Holliger及Winter,1997Cancer Immunol.Immunother.,45(34):128-30;Wu等人,1996Immunotechnology,2(1):21-36;Pluckthun及Pack,1997Immunotechnology,3(2):83-105;Ridgway等人,1996Protein Eng.,9(7):617-21)。双抗体可与Fc融合而产生“二-双抗体”(参见Lu等人,2004J.Biol.Chem.,279(4):2856-65)。

[0323] 可用于本发明的双特异性分子中的其他抗体为鼠类、嵌合及人源化单克隆抗体。

[0324] 双特异性分子可通过使用本领域中已知的方法,通过结合组成性结合特异性来制备。例如,双特异性分子各结合特异性可分别产生,且随后彼此结合。当结合特异物为蛋白或肽时,多种偶联剂或交联剂可用于共价结合。交联剂的实例包括蛋白A、碳化二亚胺、N-

丁二酰亚氨基-S-乙酰基-硫乙酸酯 (SATA)、5,5'-二巯基双(2-硝基苯甲酸) (DTNB)、邻仲苯基二顺丁烯二酰亚胺 (oPDM)、N-丁二酰亚氨基-3-(2-吡啶基二巯基) 丙酸酯 (SPDP) 及碘基丁二酰亚氨基-4-(N-顺丁烯二酰亚氨基甲基) 环己烷-1-甲酸酯 (碘基-SMCC) (参见例如 Karpovsky 等人, 1984 J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA 等人, 1985 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括描述于 Paulus, 1985 Behring Ins. Mitt. 第78期, 118-132; Brennan 等人, 1985 Science 229:81-83 及 Glennie 等人, 1987 J. Immunol. 139:2367-2375 中的方法。结合剂为 SATA 及碘基-SMCC, 两者均购自 Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0325] 当结合特异性为抗体时, 其可通过两条重链的C端铰链区的巯基 (sulfhydryl) 键结来结合。在一具体实施方案中, 在结合之前, 铰链区经修饰以含有奇数个巯基残基, 例如1个。

[0326] 或者, 两种结合特异性可在同一载体中编码, 且在同一宿主细胞中表达及组装。此方法尤其适用于双特异性分子为 $mAb \times mAb$ 、 $mAb \times Fab$ 、 $Fab \times F(ab')_2$ 或配体 $\times Fab$ 融合蛋白的情况。本发明的双特异性分子可为包含一个单链抗体及一个结合决定子的单链分子, 或包含两个结合决定子的单链双特异性分子。双特异性分子可包含至少两个单链分子。制备双特异性分子的方法描述于例如美国专利5,260,203号、美国专利第5,455,030号、美国专利第4,881,175号、美国专利第5,132,405号、美国专利第5,091,513号、美国专利第5,476,786号、美国专利第5,013,653号、美国专利第5,258,498号及美国专利第5,482,858号中。

[0327] 双特异性分子与其特异性目标的结合可通过例如酶联结免疫吸附剂分析 (ELISA)、放射免疫分析 (REA)、FACS分析、生物分析 (例如生长抑制) 或 Western 印记分析来确认。这些分析中的每一个大体上通过采用对目的复合物具特异性的标记试剂 (例如抗体) 来检测备受关注的蛋白-抗体复合物的存在。

[0328] 在另一方面中, 本发明提供包含结合至 FXIa 的本发明抗体的至少两个相同或不同抗原结合部分的多价化合物。抗原结合部分可通过蛋白质融合或共价或非共价键联接在一起。或者, 已描述双特异性分子的键联方法。四价化合物可例由本发明的抗体与结合至本发明抗体的恒定区 (例如 Fc 或铰链区) 的抗体的交联抗体来获得。

[0329] 三聚结构域描述于例如 Boreau 专利 EP 1 012 280 B1 中。五聚模块描述于例如 PCT/EP97/05897 中。

[0330] 半衰期延长的抗体

[0331] 本发明提供特异性结合至 FXIa 蛋白、体内半衰期延长的抗体。

[0332] 许多因素可影响蛋白体内半衰期。例如, 肾脏过滤、肝脏代谢、通过蛋白水解酶 (蛋白酶) 降解及免疫原性反应 (例由抗体中和蛋白及通过巨噬细胞及树突状细胞吸收)。多种策略可用于延长本发明抗体的半衰期。例如, 通过化学连接至聚乙二醇 (PEG)、reCODE PEG、抗体骨架、聚唾液酸 (PSA)、羟乙基淀粉 (HES)、结合白蛋白的配体及糖类遮蔽物; 通过与结合至血清蛋白的蛋白质 (诸如白蛋白、IgG、FcRn) 遗传融合且转移; 通过与结合至血清蛋白的其他结合部分 (诸如纳米抗体、Fab、DARPin、高亲和性多聚体 (avimer)、亲和抗体 (affibody) 及抗运载蛋白 (anticalin)) 偶联 (遗传方式或化学方式); 通过与 rPEG、白蛋白、白蛋白域、白蛋白结合蛋白及 Fc 遗传融合; 或通过并入纳米载体、缓释制剂或医学装置中。

[0333] 为了延长体内抗体的血清循环, 诸如高分子量 PEG 的惰性聚合物分子可通过 PEG 与抗体的 N 末端或 C 末端的位点特异性结合或通过存在于赖氨酸残基上的 ϵ 氨基、使用或不使

用多官能性接头连接至抗体或其片段。为使抗体发生聚乙二醇化,一般使抗体或其片段与聚乙二醇(PEG)(诸如PEG的反应性酯或醛衍生物)在其中使一或更多个PEG基团连接至抗体或抗体片段的条件下反应。聚乙二醇化可通过与反应性PEG分子(或类似的反应性水溶聚合物)的酰化反应或烷化反应来进行。如本文所用,术语“聚乙二醇”意欲涵盖已用于衍生其他蛋白质的任一种PEG形式,诸如单(C1-C10)烷氧基或芳氧基聚乙二醇或聚乙二醇-顺丁烯二酰亚胺。在某些实施方案中,待聚乙二醇化的抗体为无糖基化(aglycosylate)抗体。将使用使生物活性损失最小的直链或分支链聚合物衍生作用。结合程度可由SDS-PAGE及质谱严格监测以确保PEG分子与抗体的适当结合。未反应的PEG可通过尺寸排阻或通过离子交换层析而与抗体-PEG结合物分离。可使用本领域技术人员熟知的方法(例如本文所述的免疫分析)测试PEG衍生化抗体的结合活性以及体内功效。聚乙二醇化蛋白质的方法为本领域中已知,且可应用于本发明的抗体。参见例如Nishimura等人的EP 0 154 316及Ishikawa的EP 0 401 384。

[0334] 其他经修改的聚乙二醇化技术包括重建化学正交导引工程改造技术(ReCODE PEG),其通过包括tRNA合成酶及tRNA的重建系统将化学上特定的侧链并入生物合成蛋白质中。此技术能够将超过30种新氨基酸并入大肠杆菌、酵母及哺乳动物细胞的生物合成蛋白质中。tRNA将非原生氨基酸并入琥珀密码子所在的任何位置,从而将琥珀密码子从终止密码子转换为传递引入化学上特定氨基酸的信号密码子。

[0335] 重组聚乙二醇化技术(rPEG)也可用于延长血清半衰期。此技术包括以遗传方式将300至600个氨基酸非结构化蛋白尾与现有医药蛋白融合。由于此类非结构化蛋白链的表观分子量比其实际分子量大约15倍,因此蛋白的血清半衰期大大延长。与需要化学结合及再纯化的传统聚乙二醇化相比,此制造方法大大简化且产物为均质的。

[0336] 另一技术为聚唾液酸化,其使用天然聚合物聚唾液酸(PSA)延长有效寿命且改良治疗肽及蛋白的稳定性。PSA为唾液酸聚合物(一种糖)。当用于递送蛋白及治疗肽药物时,聚唾液酸为结合提供保护性微环境。此提高治疗性蛋白在循环中的有效寿命且防止其被免疫系统识别。PSA聚合物天然地见于人体中。进化超过数百万年的某些细菌采用其覆盖其细胞壁。这些天然聚唾液酸化细菌接着能够凭借分子拟态来阻挡人体防御系统。此类细菌中可容易产生大量且具有预定物理特征的PSA(天然的终极隐匿技术)。由于细菌PSA与人体中的PSA在化学上相同,因此细菌PSA完全不具免疫原性,即使与蛋白偶联。

[0337] 另一技术包括使用连接至抗体的羟乙基淀粉(“HES”)衍生物。HES为来源于糯性玉米淀粉的经修饰的天然聚合物,且可通过人体的酶代谢。通常施用HES溶液以取代血容量不足及改良血液的流变特性。抗体的羟乙基淀粉化(hesylation)通过提高分子的稳定性以及通过减小肾脏清除作用实现循环半衰期的延长,使得生物活性提高。根据改变不同参数,诸如HES的分子量,可定制广泛范围的HES抗体结合物。

[0338] 也可通过将一或更多个氨基酸修饰(也即取代、插入或缺失)引入IgG恒定域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链Fc域片段)中来产生体内半衰期延长的抗体。参见例如国际公开案第W0 98/23289号;国际公开案第W0 97/34631号;及美国专利第6,277,375号。

[0339] 此外,抗体可与白蛋白(例如人血清白蛋白;HSA)结合以便使得抗体或抗体片段在体内更稳定或在体内具有较长半衰期。该技术在领域中熟知,参见例如国际公开案第W0 93/15199号、第W0 93/15200号及第W001/77137号,及欧洲专利第EP 413,622号。另外,在如

上所述的双特异性抗体的情况下,抗体的特异性可经设计以使得抗体的一个结合结构域与FXIa结合,同时抗体的第二结合结构域与血清白蛋白(优选HSA)结合。

[0340] 增加半衰期的策略尤其适用于纳米抗体、基于纤连蛋白的结合剂及需要增加体内半衰期的其他抗体或蛋白。

[0341] 抗体结合物

[0342] 本发明提供特异性结合至FXIa蛋白的抗体或其片段,其与异源蛋白或多肽(或其片段,优选至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的多肽)以重组方式融合或以化学方式结合(包括共价与非共价结合)而产生融合蛋白。具体而言,本发明提供融合蛋白,其包含本文所述抗体的抗原结合片段(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH域、VH CDR、VL结构域或VL CDR)及异源蛋白、多肽或肽。使蛋白、多肽或肽与抗体或抗体片段融合或结合的方法在本领域中已知。参见例如美国专利第5,336,603号、第5,622,929号、第5,359,046号、第5,349,053号、第5,447,851号及第5,112,946号;欧洲专利第EP 307,434号及第EP 367,166号;国际公开案第W0 96/04388号及第W0 91/06570号;Ashkenazi等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539;Zheng等人,1995,J.Immunol.154:5590-5600;及Vil等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11337-11341。

[0343] 其他融合蛋白可通过基因改组、基序改组、外显子改组和/或密码子改组(统称为“DNA改组”)的技术产生。可采用DNA改组以改变本发明的抗体或其片段(例如具有较高亲和力及较低离解速率的抗体或其片段)的活性。一般而言,参见美国专利第5,605,793号、第5,811,238号、第5,830,721号、第5,834,252号及第5,837,458号;Patten等人,1997,Curr.Opinion Biotechnol.8:724-33;Harayama,1998,Trends Biotechnol.16(2):76-82;Hansson等人,1999,J.Mol.Biol.287:265-76;及Lorenzo及Blasco,1998,Biotechniques 24(2):308-313(这些专利及公开案中的每一个以全文引用的方式并入本文中)。抗体或其片段,或所编码的抗体或其片段在重组之前可如下改变:通过易错PCR进行随机突变诱发、随机核苷酸插入或其他方法。编码与FXIa蛋白特异性结合的抗体或其片段的多核苷酸可与一或多个异源分子的一或多个组份、基序、小段、部分、结构域、片段等重组。

[0344] 此外,抗体或其片段可与诸如肽的标记序列融合以促进纯化。在优选实施例中,标记氨基酸序列为六组氨酸肽(SEQ ID NO:48),诸如尤其pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,CA,91311)中提供的标签,其中许多为市售的。如Gentz等人,1989,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824中所述,例如六组氨酸(SEQ ID NO:48)便于纯化融合蛋白。适用于纯化的其他肽标签包括(但不限于)血凝素(“HA”)标签,其对应于来源于流感红血凝素蛋白的表位(Wilson等人,1984,Cell 37:767),及“旗标”标签。

[0345] 在其他实施例中,本发明的抗体或其片段与诊断剂或检测剂结合。作为临床测试程序的一部分,此类抗体可适用于监测或预后疾病或病症的发作、发展、进展和/或严重程度,诸如测定特定疗法的功效。此类诊断及检测可通过使抗体与可检测物质偶联来实现,可检测物质包括(但不限于)各种酶,诸如(但不限于)辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基,诸如(但不限于)抗生物素蛋白/生物素及抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,诸如(但不限于)伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、二甲氨基磺萘酰氯或藻红素;发光物质,诸如(但不限于)鲁米诺(鲁米诺);

生物发光物质,诸如(但不限于)荧光素酶、荧光素及水母素;放射性物质,诸如(但不限于)碘(131I、125I、123I及121I)、碳(14C)、硫(35S)、氚(3H)、铟(115In、113In、112In及111In)、镱(99Tc)、铪(201Tl)、镓(68Ga、67Ga)、钯(103Pd)、钼(99Mo)、氙(133Xe)、氟(18F)、153Sm、177Lu、159Gd、149Pm、140La、175Yb、166Ho、90Y、47Sc、186Re、188Re、142Pr、105Rh、97Ru、68Ge、57Co、65Zn、85Sr、32P、153Gd、169Yb、51Cr、54Mn、75Se、113Sn及117Tl;及使用各种正电子发射断层摄影的正电子发光金属,及非放射性顺磁金属离子。

[0346] 本发明进一步涵盖与治疗部分结合的抗体或其片段的用途。抗体或其片段可与治疗部分结合,诸如例如细胞生长抑制或杀细胞性试剂的细胞毒素、治疗剂或例如 α 发射体的放射性金属离子。细胞毒素或细胞毒性剂包括损害细胞的任何药物。

[0347] 此外,抗体或其片段可与治疗部分或药物部分结合,其修改给定生物学响应。治疗部分或药物部分不应解释为限于经典化学治疗剂。例如,药物部分可为具有所需生物活性的蛋白、肽或多肽。此类蛋白可包括例如毒素,诸如相思豆毒蛋白、蓖麻毒蛋白A、假单胞杆菌属外毒素、霍乱毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子、 α 干扰素、 β 干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤维蛋白溶酶原活化因子;细胞凋亡剂;抗血管生成剂;或生物反应调节剂,诸如淋巴因子。

[0348] 此外,抗体可与以下结合:治疗部分,诸如放射性金属离子,诸如 α -发射体,诸如213Bi;或适用于放射金属离子(包括但不限于131In、131Lu、131Y、131Ho、131Sm)与多肽的结合的巨环螯合剂。在某些实施例中,巨环螯合剂为1,4,7,10-四氮杂环十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA),其可通过接头分子附接至抗体。此类接头分子通常为本领域中已知,且描述于Denardo等人,1998,Clin Cancer Res.4(10):2483-90;Peterson等人,1999,Bioconjug.Chem.10(4):553-7;及Zimmerman等人,1999,Nucl.Med.Biol.26(8):943-50中,各文献皆以全文引用的方式并入本文中。

[0349] 熟知使治疗部分与抗体结合的技术,参见例如Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等人(编),第243-56页(Alan R.Liss, Inc.1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,Controlled Drug Delivery(第2版),Robinson等人(编.),第623-53页(Marcel Dekker, Inc.1987);Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,Monoclonal Antibodies84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等人(编.),第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy,Baldwin等人(编.),第303-16页(Academic Press 1985)及Thorpe等人,1982,Immunol.Rev.62:119-58。

[0350] 抗体也可附接至实心支撑物,其尤其适用于目标抗原的免疫分析或纯化。此类固体载体包括(但不限于)玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

[0351] 产生抗体的方法

[0352] 编码抗体的核酸

[0353] 本发明提供经基本上纯化的核酸分子,其编码包含上文所述的FXIa结合抗体链的区段或结构域的多肽。本发明的一些核酸包含编码展示于SEQ ID NO:10或30中的重链可变

区的核苷酸序列和/或编码展示于SEQ ID NO:20或40中的轻链可变区的核苷酸序列。在一具体实施方案中,核酸分子为表1中所识别的各个。一些其他本发明的核酸分子包含与表1中所识别的核苷酸序列基本上相同(例如至少65%、80%、95%或99%)的核苷酸序列。当自适当表达载体表达时,由这些多核苷酸编码的多肽能够展现FXI和/或FXIa抗原结合能力。

[0354] 本发明中也提供多核苷酸,其自编码上述的FXIa结合抗体的重链或轻链的至少一个CDR区且通常所有三个CDR区。一些其他多核苷酸编码上述的FXIa结合抗体的重链和/或轻链的所有或基本上所有可变区序列。因为编码的简并,所以多种核酸序列将编码免疫球蛋白氨基酸序列中的每一个。

[0355] 本发明的核酸分子可编码抗体的可变区与恒定区。一些本发明的核酸序列包含编码与SEQ ID NO:11或31中所述的重链序列基本上相同(例如至少80%、90%或99%)的重链序列的核苷酸。一些其他核酸序列包含编码与SEQ ID NO:21或41中所述的轻链序列基本上相同(例如至少80%、90%或99%)的轻链序列的核苷酸。

[0356] 多核苷酸序列可通过重新固相DNA合成或通过编码FXIa结合抗体或其结合片段的现有序列(例如如下文实施例中所述的序列)的PCR突变诱发来产生。核酸的直接化学合成可通过本领域中已知的方法实现,诸如Narang等人,1979,Meth.Enzymol.68:90的磷酸三酯法;Brown等人,Meth.Enzymol.68:109,1979的磷酸二酯法;Beaucage等人,Tetra.Lett.,22:1859,1981的二乙基氨基磷酸酯法;及美国专利第4,458,066号的固体支撑物法。通过PCR向多核苷酸序列引入突变可如以下文献中所述进行:例如PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification,H.A.Erlich(编),Freeman Press,NY,NY,1992;PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications,Innis等人(编),Academic Press,San Diego,CA,1990;Mattila等人,Nucleic Acids Res.19:967,1991;及Eckert等人,PCR Methods and Applications 1:17,1991。

[0357] 本发明也提供产生上文所述FXI和/或FXIa结合抗体的表达载体及宿主细胞。各种表达载体可用于表达编码FXIa结合抗体链或结合片段的多核苷酸。基于病毒的表达载体与非病毒表达载体均可用于在哺乳动物宿主细胞中产生抗体。非病毒载体及系统包括质粒、游离型载体,其典型地具有用于表达蛋白或RNA及人人工染色体的表达盒(参见例如Harrington等人,Nat Genet 15:345,1997)。例如,适用于在哺乳动物(例如人)细胞中表达FXIa结合多核苷酸及多肽的非病毒载体包括pThioHis A、B及C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B及C(Invitrogen,San Diego,CA)、MPSV载体及本领域中已知用于表达其他蛋白的许多其他载体。适用的病毒载体包括基于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒的载体;基于SV40、乳头状瘤病毒、HBP埃-巴二氏病毒(HBP Epstein Barr virus)、痘苗病毒载体及胜利基森林病毒(Semliki Forest virus;SFV)的载体。参见Brent等人,前述;Smith,Annu.Rev.Microbiol.49:807,1995;及Rosenfeld等人,Cell 68:143,1992。

[0358] 表达载体的选择视待表达载体的预定宿主细胞而定。通常,表达载体含有可操作地连接于编码FXIa结合抗体链或片段的多核苷酸的启动子及其他调节序列(例如增强子)。在一些实施例中,诱导性启动子用于防止所插入的序列表达,除了在诱导条件下。诱导性启动子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金属硫蛋白启动子或热休克启动子。经转染的生物体培养物可在不偏向使该编码序列群体的表达产物被宿主细胞更耐受的非诱导条件下扩增。除启动子之外,其他调节元件也可为FXIa结合抗体链或片段的有效表达所必需或需要。这些元件

典型地包括ATG起始密码子及相邻的核糖体结合位点或其他序列。另外,表达效率可通过包含对使用的细胞系统合适的增强子来增强(参见例如Scharf等人,Results Probl.Cell Differ.20:125,1994;及Bittner等人,Meth.Enzymol.,153:516,1987)。例如,SV40增强子或CMV增强子可用于增强哺乳动物宿主细胞中的表达。

[0359] 表达载体也可提供分泌信号序列位置以与插入的FXIa结合抗体序列所编码的多肽形成融合蛋白。更通常,所插入的FXI和/或FXIa结合抗体序列在包含于载体中之前连接至信号序列。用以容纳编码FXI和/或FXIa结合抗体轻链及重链可变结构域的序列的载体有时也编码恒定区或其部分。此类载体允许可变区与恒定区呈融合蛋白表达,从而产生完整抗体或其片段。通常,此类恒定区为人恒定区。

[0360] 含有及表达FXI和/或FXIa结合抗体链的宿主细胞可为原核或真核细胞。大肠杆菌为一种适用于克隆及表达本发明多核苷酸的原核宿主。适用的其他微生物宿主包括杆菌(诸如枯草杆菌),及其他肠内菌科(诸如沙门氏菌、沙雷氏菌),及多种假单胞菌物种。在这些原核宿主中,也可制造表达载体,其通常含有与宿主细胞兼容的表达控制序列(例如复制起点)。另外,将存在任何数目的多种熟知启动子,诸如乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统或来自噬菌体 λ 的启动子系统。启动子通常控制表达(任选与操纵序列一起控制表达),且具有核糖体结合位点序列及其类似序列,用于起始且完成转录及转译。其他微生物(诸如酵母)也可用于表达本发明的FXIa结合多肽。也可使用昆虫细胞与杆状病毒载体组合。

[0361] 在一些优选实施例中,哺乳动物宿主细胞用于表达及产生本发明的FXI和/或FXIa结合多肽。这些细胞包括任何正常死亡或正常或异常永生动物或人细胞。例如,已开发出能够分泌完整免疫球蛋白的多种适合宿主细胞系,包括CHO细胞系、各种Cos细胞系、海拉细胞(HeLa cell)、骨髓瘤细胞系及经转染的B细胞。使用哺乳动物组织细胞培养物表达多肽大体上论述于例如Winnacker, FROM GENES TO CLONES, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987中。哺乳动物宿主细胞的表达载体可包括表达控制序列,诸如复制起点、启动子及增强子(参见例如Queen等人, Immunol.Rev.89:49-68,1986),及必需的处理信息位点(诸如核糖体结合位点、RNA剪接位点、聚腺苷酸化位点),及转录终止子序列。

[0362] 这些表达载体通常含有来源于哺乳动物基因或来源于哺乳动物病毒的启动子。适合启动子可为组成性、细胞类型特异性、阶段特异性和/或可调节或可调控的。适用启动子包括(但不限于)金属硫蛋白启动子、组成性腺病毒主要晚期启动子、地塞米松诱导性MMTV启动子、SV40启动子、MRP polIII启动子、组成性MPSV启动子、四环素诱导性CMV启动子(诸如人立即早期CMV启动子)、组成性CMV启动子及本领域中已知的启动子-增强子组合。

[0363] 引入含有目的多核苷酸序列的表达载体的方法视细胞宿主的类型而变化。例如,氯化钙转染通常用于原核细胞,而磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(大体上参见Sambrook等人,前述)。其他方法包括例如电穿孔、磷酸钙处理、脂质粒介导转染、注射及显微注射、冲击法、仿病毒颗粒(virosome)、免疫微脂囊、聚阳离子:核酸结合物、裸DNA、人工病毒颗粒、与疱疹病毒结构蛋白VP22的融合(Elliot及O'Hare, Cell 88:223,1997)、DNA的试剂增强摄取及体外转导。就长期高产量生产重组蛋白质而言,通常需要稳定的表达。例如,稳定表达FXIa结合抗体链或结合片段的细胞系可使用本发明的表达载体制备,其含有复制的病毒来源或内源性表达元件及可选标记基因。在引入载体之后,可使细胞在交换至

选择性培养基之前,于丰富培养基中生长1-2天。可选标记的目的为赋予抗选择性,且其存在允许成功表达所引入序列的细胞在选择性培养基中生长。经稳定转染的耐药性细胞可使用适合于该细胞类型的组织培养技术增殖。

[0364] 构架或Fc工程改造

[0365] 经工程改造的本发明抗体包括已对VH和/或VL内的构架残基进行修饰(例如以提高抗体特性)的那些。通常进行此类构架修饰以降低抗体的免疫原性。例如,一种方法为使一或多个构架残基”回复突变”成相应种系序列。更具体的,已经历体细胞突变的抗体可含有不同于抗体所来源的种系序列的构架残基。此类残基可通过比较抗体构架序列与获得抗体的种系序列来鉴别。为了使构架区序列恢复其种系构象,体细胞突变可通过例如定点突变诱发”回复突变”为种系序列。本发明也意欲涵盖此类”回复突变”抗体。

[0366] 构架修饰的另一类型包括使构架区内或甚至一或多个CDR区内的一或多个残基突变,以移除T细胞表位,藉此降低抗体的潜在免疫原性。此方法也称为”去免疫”,且进一步详细描述于Carr等人的美国专利公开案第20030153043号中。

[0367] 除构架区或CDR区内所作的修饰以外,或取而代之的,本发明的抗体可经工程改造以包括在Fc区内的修饰,通常以改变抗体的一或多个功能特性,诸如血清半衰期、补体结合、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。此外,本发明抗体可经化学修饰(例如可使一或多个化学部分连接至抗体),或经修饰以改变其糖基化,再改变抗体的一个多种功能特性。这些实施方案进一步详细描述于下文中。Fc区中的残基编号为Kabat EU索引编号。

[0368] 在一个实施方案中,CH1的铰链区经修饰以使得铰链区中的半胱氨酸残基数改变,例如增加或减少。此方法进一步描述于Bodmer等人的美国专利第5,677,425号中。CH1铰链区中的半胱氨酸残基数经改变以例如促进轻链与重链组装或提高或降低抗体的稳定性。

[0369] 在另一实施例中,抗体的Fc铰链区经突变以减少抗体的生物半衰期。更具体的,将一或多个氨基酸突变引入Fc铰链片段的CH2-CH3结构域界面区以使得抗体对葡萄球菌蛋白A(*Staphylococcal protein A*; SpA)的结合相对于天然Fc铰链结构域SpA结合减弱。此方法进一步详细描述于Ward等人的美国专利第6,165,745号中。

[0370] 在另一实施例中,抗体经修饰以增加其生物半衰期。可进行多种方法。例如,可使用如Ward的美国专利第6,277,375号中所述的突变中的一个或多个。或者,为了延长生物半衰期,抗体可在CH1或CL区内改变以含有获自IgG的Fc区的CH2域的两个环的补救受体结合表位,如Presta等人的美国专利第5,869,046号及第6,121,022号中所述。

[0371] 在其他实施例中,Fc区通过用不同氨基酸残基置换至少一个氨基酸残基来改变,以改变抗体的效应功能。例如,一或多个氨基酸可经不同氨基酸残基置换以使得该抗体具有改变的针对效应子配体的亲和力、但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变的效应子配体可为例如Fc受体或补体的C1组分。此方法进一步详细描述于Winter等人的美国专利第5,624,821号及第5,648,260号中。

[0372] 在另一实施例中,选自氨基酸残基的一或多个氨基酸可经不同氨基酸残基置换,以使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖细胞毒性(CDC)。此方法进一步详细描述于Idusogie等人的美国专利第6,194,551号中。

[0373] 在另一实施例中,一或多个氨基酸残基经改变以藉此改变抗体固定补体的能力。此方法进一步描述于Bodmer等人的PCT公开案W0 94/29351中。

[0374] 在一具体实施方案中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)包含有包含两个氨基酸取代D265A及P329A的人IgG(例如IgG1)Fc区,以减低由任何表面相关FXI所导致的ADCC或CDC的可能性。已展示这些丙氨酸取代会减低ADCC及CDC(参见例如Idosugie等人,J.Immunol.164:4178-4184,2000;Shields等人,J.Biol.Chem.276:6591-6604,2001)。

[0375] 在另一实施例中,Fc区经修饰以提高抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或通过修饰一或多个氨基酸来提高抗体对Fc γ 受体的亲和力。此方法进一步描述于Presta的PCT公开案W0 00/42072中。此外,已定位人IgG1上对Fc γ R1、Fc γ RII、Fc γ RIII及FcRn的结合位点且已描述具有改良的结合的变体(参见Shields,R.L.等人,2001J.Biol.Chem.276:6591-6604)。

[0376] 在另一实施例中,抗体的糖基化经修改。例如,可制得非糖基化抗体(也即,缺乏糖基化的抗体)。糖基化可经改变以例如提高抗体对“抗原”的亲和力。此类糖类修饰可通过例如改变抗体序列内的一或多个糖基化位点来完成。例如,可进行一或多个氨基酸取代,其使得一或多个可变区构架糖基化位点消除,以进而消除位于其位点的糖基化。此类去糖基化可提高抗体对抗原的亲和力。此类方法进一步详细描述于Co等人的美国专利第5,714,350号及第6,350,861号中。

[0377] 或者或另外,可制得具有改变类型的糖基化的抗体,诸如具有降低量的海藻糖基残基的低海藻糖基化抗体或具有增加的二分GlcNac结构的抗体。此类经改变的糖基化模式已证明会提高抗体的ADCC能力。此类糖类修饰可通过例如在糖基化机制改变的宿主细胞中表达抗体来实现。糖基化机制改变的细胞在本领域中已有描述且可用作表达本发明的重组抗体以藉此产生糖基化改变的抗体的宿主细胞。例如,Hang等人的EP 1,176,195描述具有经功能性破坏的FUT8基因的细胞系,其编码岩藻糖基转移酶,以使得在此细胞系中表达的抗体展示次岩藻糖基化。Presta的PCT公开案W0 03/035835描述海藻糖连接至Asn(297)-连接的糖类的能力降低的变体CHO细胞系、Lec13细胞,也导致彼宿主细胞中所表达的抗体的次岩藻糖基化(hypofucosylation,也参见Shields,R.L.等人,2002J.Biol.Chem.277:26733-26740)。Umana等人的PCT公开案W0 99/54342描述其经工程改造以表达糖蛋白修饰型糖基转移酶(例如 β (1,4)-N乙酰基葡萄糖胺转移酶III(GnTIII))的细胞系,使得经工程改造的细胞系内所表达的抗体展现增加的二分GlcNac结构,从而提高抗体的ADCC活性(也参见Umana等人,1999Nat.Biotech.17:176-180)。

[0378] 所改变的抗体工程改造方法

[0379] 如上文所论述,本文中展示的具有VH及VL序列或全长重链或轻链序列的FXIa结合抗体可用于通过修饰全长重链和/或轻链序列、VH和/或VL序列或附接至其上的恒定区来产生新颖FXIa结合抗体。由此,在本发明的另一方面中,本发明的FXIa结合抗体的结构特性用于产生结构上相关的FXIa结合抗体,其保留本发明的抗体的至少一个功能特性,诸如与人FXIa结合且也抑制FXIa的一或多种功能特性(例如,抑制FXIa结合FXIa受体、抑制FXIa依赖性细胞增殖)。

[0380] 如上文所论述,例如,本发明的抗体的一或多个CDR区或其突变可与已知构架区和/或其他CDR重组组合以产生本发明的其他经重组工程改造的FXIa结合抗体。其他修饰类型包括先前章节中所述的修饰。工程化方法的起始材料为本文中所提供的VH和/或VL序列

中的一个或多个,或其一或更多个CDR区。为产生经工程改造的抗体,不必实际上制备(也即以蛋白质形式表达)具有本文所提供的VH和/或VL序列中的一个或多个或其一或更多个CDR区的抗体。确切而言,序列中所含的信息用作起始物质以产生源自原始序列的“第二代”序列,且接着制备“第二代”序列且表示为蛋白。

[0381] 因此,在另一实施例中,本发明提供一种制备FXIa结合抗体的方法,其由以下组成:重链可变区抗体序列,其具有选自SEQ ID NO:3及23的CDR1序列、选自SEQ ID NO:4及24的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:5及25的CDR3序列;及轻链可变区抗体序列,其具有选自SEQ ID NO:13及33的CDR1序列、选自SEQ ID NO:14及34的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:15及35的CDR3序列;改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个经改变的抗体序列;且经改变的抗体序列表达为蛋白。

[0382] 因此,在另一实施例中,本发明提供一种制备FXIa结合抗体的方法,其由以下组成:重链可变区抗体序列,其具有选自SEQ ID NO:6及26的CDR1序列、选自SEQ ID NO:7及27的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:8及28的CDR3序列;及轻链可变区抗体序列,其具有选自SEQ ID NO:16及36的CDR1序列、选自SEQ ID NO:17及37的CDR2序列和/或选自SEQ ID NO:18及38的CDR3序列;改变重链可变区抗体序列和/或轻链可变区抗体序列内的至少一个氨基酸残基以产生至少一个经改变的抗体序列;且经改变的抗体序列表达为蛋白。

[0383] 因此,在另一实施例中,本发明提供一种制备在哺乳动物细胞中表达而言已经优化的FXIa结合抗体的方法,其由以下组成:全长重链抗体序列,其具有选自SEQ ID NO:11或31的序列;及全长轻链抗体序列,其具有选自21或41的序列;其在全长重链抗体序列和/或全长轻链抗体序列内改变至少一个氨基酸残基以产生至少一个经改变的抗体序列;且经改变的抗体序列表达为蛋白。在一个实施方案中,重链或轻链的改变在重链或轻链的构架区中。

[0384] 经改变的抗体序列也可通过筛选具有固定CDR3序列或最小主要结合决定子的抗体文库(如US2005/0255552中所述)以及CDR1及CDR2序列的多样性来制备。筛选可根据适于自抗体文库筛选抗体的任何筛选技术(诸如噬菌体展示技术)进行。

[0385] 标准分子生物学技术可用于制备及表达经改变的抗体序列。通过经改变的抗体序列编码的抗体为保留本文所述的FXIa结合抗体的一个、一些或所有功能特性的抗体,该功能特性包括(但不限于)与人、食蟹猴、大鼠和/或小鼠FXIa特异性结合;及在F36E和/或Ba/F3-FXIaR细胞增殖分析中抗体抑制FXIa依赖性细胞增殖。

[0386] 在工程改造本发明抗体的方法的某些实施方案中,突变可根据编码序列的FXIa结合抗体的所有或部分随机或选择性引入,且所得经修饰的FXIa结合抗体可就如本文所述的结合活性和/或其他功能特性来筛选。突变方法已描述于本领域中。例如,Short的PCT公开案W0 02/092780描述使用饱和突变诱发、合成连接组装或其组合来产生及筛选抗体突变的方法。或者,Lazar等人的PCT公开案W0 03/074679描述使用计算筛选方法以使抗体的理化特性优化的方法。

[0387] 在本发明的某些实施例中,抗体已经工程改造以移除去酰胺位点。去酰胺已知可促使肽或蛋白产生结构及功能变化。去酰胺可引起生物活性降低,以及蛋白医药的药物动力学及抗原性发生变化。(Anal Chem.2005Mar 1;77(5):1432-9)。

[0388] 在本发明的某些实施例中,抗体已经工程改造以提高pI且提高其类药物的特性。

蛋白的pI为分子的总体生物物理学特性的关键决定因素。已知具有低pI的抗体具较低可溶性、较低稳定性且易于凝集。此外,具有低pI的抗体的纯化具挑战性,且在临床用途的规模放大期间尤其成问题。提高本发明的抗FXI/FXIa抗体或Fab的pI会提高其溶解度,使得抗体能够在较高浓度(>100mg/ml)下配制。配制高浓度(例如>100mg/ml)的抗体提供能够施用较高剂量的抗体的优势,其又可能降低给药频率,一种治疗包括血栓性病症和/或血栓栓塞病症的慢性疾病的显著优势。较高pI也可提高抗体的IgG型的FcRn介导的再循环,由此使得药物能够在体内续存更长时间,需要较少注射。最后,因体内较高pI得到更长储存期限及生物活性,因而抗体的总稳定性显著提高。pI优选大于或等于8.2。

[0389] 经改变的抗体的功能特性可使用本领域中可获得和/或本文所述的标准分析法(诸如阐述于实施例中的分析法(例如ELISA))评定。

[0390] 预防及治疗用途

[0391] 结合如本文所述的FXI和/或FXIa(例如表1中所述的抗体,诸如包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体)的抗体可通过向有需要个体施用有效量的本发明的抗体或抗原结合片段以治疗有用的浓度用于治疗血栓栓塞疾病或病症(例如血栓性中风、心房纤维性颤动、心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF)、深层静脉血栓形成、静脉血栓栓塞、肺栓塞、急性冠状动脉综合征(ACS)、缺血性中风、急性肢体局部缺血、慢性血栓栓塞肺高血压或全身栓塞)。本发明提供一种通过向有需要个体施用有效量的本发明抗体来治疗血栓栓塞病症(例如血栓性病症)的方法。本发明提供一种通过向有需要个体施用有效量的本发明抗体治疗血栓栓塞病症(例如血栓性中风、心房纤维性颤动、心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF)、深层静脉血栓形成、静脉血栓栓塞、肺栓塞、急性冠状动脉综合征(ACS)、缺血性中风、急性肢体局部缺血、慢性血栓栓塞肺高血压或全身栓塞)的方法。

[0392] 可尤其使用本文所述的抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体)以预防治疗、预防及改良血栓栓塞病状或病症,包括(但不限于)血栓性病症,如本文中更详细描述。

[0393] 本文所提供的抗体(例如表1中所述的抗体,诸如包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体)也可与其他药物组合使用以预防、治疗或改良血栓栓塞病症。例如,抑制素疗法可与本发明的FXIa抗体及抗原结合片段组合使用以治疗血栓性和/或血栓栓塞病症患者。

[0394] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗或预防心房纤维性颤动患者的中风的方法,其包含向有需要患者施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0395] 在一具体实施方案中,本文提供一种处理或预防心房纤维性颤动患者中的与心房纤维性颤动(AF)有关的风险或病状,诸如栓塞中风及全身栓塞的方法,其包含向有需要患者施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0396] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防心房纤维性颤动患者的与心房纤维性颤动(AF)有关的病状,诸如栓塞中风及全身栓塞的方法,其包含向有需要患者施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。在具体实施方案中,AF患者具

有高出血风险。

[0397] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体(例如发生深层静脉血栓形成或有发生深层静脉血栓形成风险的个体)的深层静脉血栓形成或与其相关的病状的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0398] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体(例如发生静脉血栓栓塞或有发生静脉血栓栓塞风险的个体)的静脉血栓栓塞(VTE)或与其相关的病状的方法,其包含向有需要患者施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。在具体实施方案中,用本文所提供的抗FXI/FXIa抗体治疗的个体经历1)具有低出血风险的第一无故VTE,2)无故VTE的复发或3)与包括癌症的血栓形成倾向患者有关的VTE。

[0399] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体(例如发生肺栓塞或有发生肺栓塞风险的个体)的肺栓塞或与其相关的病状的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0400] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体的急性冠状动脉综合征(ACS)或与其相关的病状的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0401] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体(例如发生缺血性中风或有发生缺血性中风风险的个体)的缺血性中风的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0402] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体的急性肢体局部缺血的方法,其包含向有需要患者施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0403] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体的慢性血栓栓塞肺高血压的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0404] 在一具体实施方案中,本文提供一种治疗、处理或预防个体(例如发生全身栓塞或有发生全身栓塞风险的个体)的全身栓塞的方法,其包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0405] 在某一实施例中,本文提供一种治疗、处理或预防作为导管相关病状(例如癌症患者中的希克曼导管)的血栓栓塞病状的方法,其中导管会形成血栓或体外膜式氧合(ECMO),其中管道会产生凝块,该方法包含向有需要个体施用有效量的本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体。

[0406] 在具体实施方案中,用本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa

抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体治疗的有需要个体可包括:

[0407] • 具有用于慢性抗凝治疗的适应症(例如AF、左心室血栓、先前心脏栓塞性中风)的个体

[0408] • 有中到高主要出血风险的个体;

[0409] • 经受可需要接受双重抗血小板治疗(阿司匹林及P2Y₁₂受体拮抗剂)以预防血管支架血栓的任选或原发经皮冠状动脉介入术(PCI)加入支架的个体。

[0410] 在具体实施方案中,以下病状之一可用本文所述的抗FXI/FXIa抗体,例如表1中所述的抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体治疗或处理:

[0411] • 怀疑或确诊有心律不整,诸如突发性、持久性或永久性心房纤维性颤动或心房颤动的个体的血栓栓塞;

[0412] • 心房纤维性颤动中的中风预防(SPAF),其亚群为经受经皮冠状动脉干预(PCI)的AF患者;

[0413] • 高出血风险的患者中急性静脉血栓栓塞事件(VTE)治疗及持久继发性VTE预防;

[0414] • 短暂局部缺血性发作(TIA)或非失能性中风后二级预防及并发窦性节律的心脏衰竭中血栓栓塞事件预防中的大脑及心脏血管事件;

[0415] • 经受针对心律不整的心脏复律的个体的左心房的凝块形成及血栓栓塞;

[0416] • 在针对心律不整的切除程序前、期间及后的血栓;

[0417] • 静脉血栓,此情况包括(但非独占式地)治疗及二级预防下部或上部的深层或表面静脉血栓、腹部及胸部静脉的血栓、窦血栓及颈静脉血栓;

[0418] • 静脉样导管或起搏器导线中的任何人工表面上的血栓;

[0419] • 有或无静脉血栓的患者的肺栓塞;

[0420] • 慢性血栓栓塞性肺高血压(CTEPH);

[0421] • 破裂动脉粥样硬化斑上的动脉血栓、动脉内辅具或导管上的血栓及表面上正常的动脉中的血栓,此病状包括(但非独占式地)急性冠状动脉综合征、ST抬高性心肌梗塞、非ST抬高性心肌梗塞、不稳定绞痛、支架血栓、动脉系统中任何人工表面的血栓及有或无肺高血压的个体的肺部动脉的血栓;

[0422] • 经受经皮冠状动脉干预(PCI)的患者的血栓及血栓栓塞;

[0423] • 心因性及隐性中风;

[0424] • 患有侵入性及非侵入性癌症恶性疾病的患者的血栓;

[0425] • 留置导管上的血栓;

[0426] • 严重疾病患者的血栓及血栓栓塞;

[0427] • 心脏血栓及血栓栓塞,此包括(但非独占式地)心肌梗塞后的心脏血栓、与诸如心脏动脉瘤、心肌纤维化、心脏增大及功能障碍、心肌炎及心脏中的人工表面的病状有关的心脏血栓;

[0428] • 有或无心房纤维性颤动的心脏瓣膜病患者的血栓栓塞;

[0429] • 瓣膜机械或生物辅具上的血栓栓塞;

[0430] • 在简单或复杂心脏畸形的心脏修复之后具有天然或人工心脏补片、动脉或静脉

导管的患者的损伤或创伤；

[0431] • 膝置换手术、髌置换手术及矫形外科手术、胸部或腹部手术后的静脉血栓及血栓栓塞；

[0432] • 包括颅内及脊髓干预的神经外科手术后的动脉或静脉血栓；

[0433] • 先天性或获取性血栓形成倾向，包括（但非独占式地）凝血因子V莱顿、凝血酶原突变、抗凝血酶III、蛋白C及蛋白S缺乏、凝血因子XIII突变、家族纤维蛋白原不良血症、先天性纤维蛋白溶酶原缺乏、凝血因子XI含量增加、镰状细胞疾病、抗磷脂综合征、自身免疫性疾病、慢性肠病肾病溶血性尿骨髓增生疾病、散播性血管内凝血、阵发性夜间血红蛋白尿症及肝素诱导的血小板减少症；

[0434] • 慢性肾病中的血栓及血栓栓塞；及

[0435] • 经受血液透析及体外膜氧化的患者的血栓及血栓栓塞。

[0436] 在一具体方面中，本文提供一种处理经治疗或施用本文所提供的抗FXI/FXIa抗体（例如表1中所述的抗体，诸如包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体）的患者出血，例如与创伤、手术、月经或产后有关的出血的方法，该方法包含逆转抗促凝剂作用。FXI缺乏很少与自发性出血现象有关；在具体方面中，出血最通常与创伤、手术、月经或产后有关。长期出血可在严重创伤之后或在涉及具有高纤维蛋白溶解区域（诸如经颊、经鼻、生殖器或泌尿黏膜）的器官的手术之后出现。拔牙、扁桃体切除及子宫或前列腺切除为引起高出血风险的手术的实施例。病症患者也具有呈现鼻出血及瘀斑及更罕见出血至尿液或肠中的强烈倾向。在FXI缺乏患者中自发性肌肉或关节及颅内出血频率不增加。静脉穿刺通常不与长期出血有关。与FXI缺乏有关的其他遗传突变可有助于重度FXI缺乏患者的非均质及不可预测的出血倾向。伴随使用抗血小板剂、其他抗促凝剂及纤维蛋白溶解剂可使出血风险增加。

[0437] 在具体实施方案中，本文提供一种处理用本文所提供的抗FXI/FXIa抗体（例如表1中所述的抗体，诸如包含NOV1401的VL CDR及VHCDR的抗FXI/FXIa抗体）治疗的患者的出血的方法，该方法包含暂时逆转抗促凝剂影响维持一定时间以足以处理出血。在具体实施方案中，逆转抗促凝剂影响的步骤包含(i)使用胶体、类晶体、人血浆或血浆蛋白（诸如白蛋白）的体液置换；或(ii)输注浓缩红细胞或全血。在一具体实施方案中，逆转抗促凝剂影响的治疗剂，例如在重度紧急情况下，包括（但不限于）止血血液组分（诸如新鲜冷冻血浆（FFP）、凝血酶原复合浓缩物（PCC）及活化PCC[（APCC）；例如凝血因子VIII抑制剂旁路活性（FEIBA）]及重组活化凝血因子VII（rFVIIa）。在一个实施方案中，包含施用30μg/kg剂量的rFVIIa，之后每2-4小时施用15-30μg/kg剂量的rFVIIa维持24-48小时，外加每6小时施用胺甲环酸1g维持5至7天的疗法可使经受重大手术的用本文所提供的抗FXI/FXIa抗体（例如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体）治疗的个体及具有活性不可接近出血点的患者回复止血且终止出血。例如，Riddell等人报导经受手术的4位不使用抑制剂的重度FXI缺乏患者的经历（Riddell等人，2011，Thromb.Haemost.；106:521-527）；患者在诱导麻醉下施用rFVIIa 30μg/kg及胺甲环酸1g（静脉内）。每间隔2至4小时施用后续单次剂量的rFVIIa 15-30μg/kg，如旋转血栓形成（ROTEM）结果所引导。患者用上文所提及剂量的rFVIIa治疗24-48小时。每六小时胺甲环酸1g持续五天。在此小系列中，在此研究中，剂量低至15-30μg/kg的rFVIIa以及胺甲环酸在校正重度FXI缺乏的止血缺陷中安全且有效。在

包含经历5次手术的4位使用抑制剂的重度FXI缺乏患者的另一研究中,(自体中和通常在向重度FXI缺乏患者输注或施用血液制品之后获取的FXI抗体),作者(Livnat等人,2009, *Thromb.Haemost.*;102:487-492)应用以下方案:在手术之前两小时经口1g胺甲环酸,接着患者在干预之前立即再静脉内接受1g胺甲环酸。手术完成时灌注15至30 μ g/kg范围内剂量的重组FVIIa。随后,每6小时口服胺甲环酸1g维持至少7天。在一个患者中,在切除的胆囊床处喷雾纤维蛋白胶。在使用抑制剂的重度FXI缺乏患者中此方案促成正常止血。

[0438] 在一个方面中,纤维蛋白胶可在牙科手术期间用以恢复FXI缺乏患者的局部止血(Bolton-Maggs (2000) *Haemophilia*;6 (S1):100-9)。在关于处理用本文所提供的抗FXI/FXIIa抗体(例如NOV1401)治疗的患者出血的方法的某一实施例,与使用纤维蛋白胶有关的由每6小时胺甲环酸1g维持5至7天组成的疗法可用以产生经受微小手术的个体及具有可及出血部位(包括口服及经鼻出血事件)的个体的局部止血。

[0439] 药物组合物

[0440] 本发明提供药物组合物,其包含与可药用载体一起配制的FXIIa结合抗体(完整或结合片段)。组合物可另外含有一或多种适用于治疗或预防例如血栓栓塞病症(例如血栓性病症)的其他治疗剂。可药用载体会使组合物增强或稳定,或可用于促进组合物的制备。可药用载体包括生理上相容的溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂及抗真菌剂、等渗剂及吸收延迟剂及其类似物。

[0441] 本发明的药物组合物可通过本领域中已知的多种方法施用。施用途和/或方式根据所需结果而变化。优选静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)、腹膜内(i.p.)或皮下(s.c.)施用或接近目标部位施用。可药用载体应适用于静脉内、肌肉内、皮下、非经肠、脊椎或表皮施用(例如注射或输注)。视施用途而定,活性化合物(也即抗体、双特异性及多特异性分子)可用保护化合物不受酸作用及可使化合物不活化的其他天然条件影响的物质涂布。

[0442] 在具体方面中,本文所述的抗FXI/FXIIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的LCDR及HCDR的抗体)以大约75mg/mL至大约200mg/mL的浓度配制于液体小瓶中用于皮下注射。在具体实施方案中,药物组合物包含医药载体或赋形剂,例如蔗糖及聚山梨醇酯20。在具体实施方案中,药物组合物包含L-组氨酸和/或组氨酸HCl单水合物。在某些实施例中,药物组合物的pH为大约4至7、或5至6。

[0443] 在具体方面中,本文所述的抗FXI/FXIIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的LCDR及HCDR的抗体)以150mg/mL的浓度配制于液体小瓶中用于皮下注射。在一个实施方案中,150mg/mL液体制剂含有150mg抗FXI/FXIIa抗体、L-组氨酸、组氨酸HCl单水合物、蔗糖及聚山梨醇酯20,其中pH=5.5 $\pm$ 0.5。组合物应为无菌流体。例如,可通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散液的情况下维持必要粒度及通过使用界面活性剂来维持适当流动性。在许多情况下,组合物中优选包括等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露糖醇或山梨糖醇)及氯化钠。通过使组合物中包括延迟吸收剂(例如单硬脂酸铝或明胶),可达成可注射组合物的长期吸收。

[0444] 本发明的药物组合物可根据本领域中熟知且常规实践的方法制备。参见例如Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, Mack Publishing Co., 第20版, 2000;及 *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson编, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。药物组合物优选根据GMP条件制造。通常,在本发明

的药物组合物中采用治疗上有效剂量或有作用剂量的FXIa结合抗体。FXIa结合抗体通过本领域技术人员已知的常规方法配制成可药用剂型。调节剂量方案以得到最佳所需响应(例如治疗响应)。例如,可施用单一浓注,可随时间施用若干分次剂量,或可依治疗情况的紧急性所指示按比例减少或增加剂量。就易施用性及剂量的均一性而言,将非经肠组合物配制成单位剂型尤其有利。如本文所用的单位剂型是指适合作为单一剂量用于待治疗的个体的物理上分散单位;各单位含有与所需医药载体结合的经计算以产生所需治疗性效应的预定量活性化合物。

[0445] 可改变本发明药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,以便使得活性成分的量有效达成针对特定患者、组合物及施用模式的所需治疗反应,而不会对患者产生毒性。所选剂量浓度视多种药物动力学因素而定,其包括本发明所用的特定组合物的活性、施用途径、施用时间、所用特定化合物的排泄速率、治疗持续时间、与所用特定组合物组合使用的其他药物、化合物和/或物质、所治疗患者的年龄、性别、体重、病状、一般健康状况及先前病史及其类似因素。

[0446] 医生可以比获得所需治疗作用所需水平更低的水平的以药物组合物形式采用的本发明抗体的剂量起始且逐渐增加剂量直至达成所需效果。一般而言,治疗本文所述的血栓性和/或血栓栓塞病症的本发明组合物的有效剂量视许多不同因子而变化,包括施用手段、目标部位、患者的生理状态、施用的其他药物及治疗是否为预防性或治疗性的。需要滴定治疗剂量以使安全性及功效达最佳。对于全身施用抗体,剂量在每公斤宿主体重约0.01至约15mg/kg范围内。对于施用(例如皮下施用)抗体,剂量可在0.1mg至5mg或1mg至600mg的范围内。例如,本文所述的抗FXI/FXIa抗体可以以下剂量施用:0.1mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg或5.0mg/kg。例示性治疗方案需要每两周全身施用一次或一月一次或每3至6个月一次。一种示例性治疗方案需要每周一次、每两周一次、每三周一次、一月一次或每3至6个月一次或视需要(PRN)全身施用。

[0447] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下以3mg/kg的剂量施用。

[0448] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下以10mg/kg的剂量施用。

[0449] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下以30mg/kg的剂量施用。

[0450] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下以50mg/kg的剂量施

用。

[0451] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下以100mg/kg的剂量施用。

[0452] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下途径以5mg至600mg范围内的剂量施用。

[0453] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下途径以以下剂量施用:大约5mg、10mg、15mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、90mg、100mg、120mg、150mg、180mg、200mg、210mg、240mg、250mg、270mg、300mg、330mg、350mg、360mg、390mg、400mg、420mg、450mg、480mg、500mg、510mg、540mg、550mg、570mg或600mg。

[0454] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以5mg的剂量施用。

[0455] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以15mg的剂量施用。

[0456] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以50mg的剂量施用。

[0457] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以150mg的剂量施用。

[0458] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以300mg的剂量施用。

[0459] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由皮下途径以600mg的剂量施用。

[0460] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下途径以足以一定剂量施用,以使平均aPTT延长持续时间达到2倍或大于2倍维持不超过30天、35天、36天、37天、38天、39天、40天、41天、42天、43天、44天、45天或50天的时段。

[0461] 在某一实施例中,本文所述的抗FXI/FXIa抗体(例如表1中所述的抗体,诸如NOV1401或包含NOV1401的VL CDR及VH CDR的抗体)例由静脉内或皮下途径以足以一定剂量施用,以使平均aPTT延长持续时间达到2倍或大于2倍维持不超过42天的时段。

[0462] 抗体通常多次施用。单次剂量之间的时间间隔可为每周、两周一次、每月或每年。时间间隔也可为不规则的,如测定患者的FXI和/或FXIa结合抗体的血液含量所指示。另外,替代给药时间间隔可由医师测定,且每月或视需要施用以具灵验性。在一些全身施用的方法中,调节剂量以达成1-1000 μ g/mL或1-1200 μ g/mL的血浆抗体浓度,且在一些方法中为25-500 μ g/mL。或者,抗体可以持续释放制剂的形式施用,在此情况下,降低所需施用的频率。剂量及频率视患者中抗体或其目标的半衰期而变化。一般而言,人及人源化抗体在人中展示比嵌合抗体及非人抗体更长的半衰期。施用物量及频率可视治疗是否为预防性或治疗性的而变化。在预防性应用中,通常在长时间段内,在相对不频繁的间隔时间施用相对低的剂

量。一些患者在其余生中持续接受治疗。在治疗性应用中,有时需要以相对较短的间隔施用相对较高的剂量,直至疾病的进展降低或终止,且优选直至患者展示疾病的症状的部分或完全改善。此后,可向患者施用预防性疗法。

实施例

[0463] 提供以下实施例以进一步说明本发明,然而不限其范畴。本发明的其他变化形式对于本领域技术人员而言显而易见且涵盖于随附权利要求范围中。

[0464] 实施例1

[0465] 人Fab噬菌体文库淘选

[0466] 为选择识别人凝血因子XI的抗体,采用多个淘选策略。对抗人凝血因子XI及兔凝血因子XIa催化结构域蛋白的不同变体的治疗性抗体由使用市售噬菌体展示文库即Morphosys HuCAL **PLATINUM**[®]文库作为抗体来源选择结合至凝血因子XI克隆产生。噬菌粒文库是基于**HuCAL**[®]概念(Knappik等人,2000,J Mol Biol 296:57-86)且采用展示噬菌体表面上的Fab的CysDisplay[™]技术(W001/05950)。对于分离抗凝血因子XI抗体,采用液相淘选策略。

[0467] 交叉反应性分析

[0468] 在ELISA中测试纯化Fab与人凝血因子XI(凝血因子XI、凝血因子XIa及凝血因子XIa催化结构域)及兔凝血因子XIa催化结构域生物素标记的蛋白的不同变体的结合。出于此目的,在4℃下Maxisorp[™](Nunc)384孔板涂布10μg/ml于PBS中的NeutrAvidin隔夜。在室温(RT)下通过生物素经NeutrAvidin捕获抗原30分钟。使用Attophos荧光底物(Roche,目录号11681982001)通过缀合至碱性磷酸酶(1:5000稀释)的F(ab)₂特异性山羊抗人IgG检测Fab的不同浓度的结合。在430nm激发下记录535nm的荧光发射。

[0469] IgG的转化及IgG表达

[0470] 为在CAP-T细胞中表达全长IgG,重链(VH)及轻链(VL)的可变结构域片段自Fab表达载体亚克隆至适用于人IgG1的**pMorph**[®]**_hIg**载体中。两个氨基酸取代(D265A及P329A)引入Fc部分中以减低由任何表面相关的FXI所致的ADCC或CDC的可能性。已展示这些丙氨酸取代会减低ADCC及CDC(参见例如Idosugie等人,J.Immunol.164:4178-4184,2000;Shields等人,J.Biol.Chem.276:6591-6604,2001)。转染后7天收集细胞培养清液层。在无菌过滤之后,使用液体处理站使溶液经受蛋白A亲和性层析。样品用50nM柠檬酸酯、140nM NaOH洗脱且用1M Tris缓冲液进行pH值中和且进行无菌过滤(0.2μm孔径)。通过UV分光光度法在280nm下测定蛋白浓度且在SDS-PAGE中、在变性、还原条件下分析IgG的纯度。

[0471] 实施例2

[0472] 结合数据

[0473] FXI催化结构域的表面等离子共振(SPR)分析。

[0474] 经BIACORE[™] T200基于表面等离子共振的光学生物传感器(BIACORE[™],GE Healthcare,Uppsala)进行SPR测定。S系列感测子芯片(CM5)、固定试剂盒及再生缓冲液购自GE Healthcare(Uppsala)。两种不同分析设定视配体形式IgG或Fab而进行。首先,表面通过N-羟基丁二酰亚胺(NHS)及N-(3-二甲氨基丙基)-N-乙基碳化二亚胺盐酸盐(EDC)活化。

NOV1401-Fab通过标准胺偶联方法 (GE Healthcare, Uppsala) 共价连接至CM5芯片上的活化葡聚糖基质。对于NOV1401-IgG, 进行捕获分析且将山羊抗人IgG-Fc抗体 (JIR) 以14000个RU固定于芯片上。用乙醇胺 (EA) 使剩余活性表面基团失活。制备无固定配体的参考细胞且用1×HBS-EP+缓冲液 (10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% P20、pH 7.4, Teknova H8022) 平衡系统。

[0475] 所有结合实验在25℃下使用HBS-EP+缓冲液在50μL/min的流动速率下进行。对于捕获分析, 捕获NOV1401-IgG直至达到80的RU含量。对于动力学研究, 使用于HBS-EP+缓冲液中的浓度在0-200nM范围内的一系列FXI催化结构域稀释液。结合时间为120s且解离时间为180s。表面用单次注射10mM甘氨酸 (pH 1.5) 再生 (接触时间60s, 稳定化时间120s)。用T200 BiaEvaluation软件1.0版实现数据处理以及 k_{on} 、 k_{off} 及 K_D 测定。应用双重参比 (减去参比及空白注射) 以校正体效应及其他系统人工制品。通过应用1:1结合模型 (全局下设定的 R_{max}) 拟合传感图。

[0476] FXI及FXIa的溶液平衡滴定 (SET)

[0477] 用样品缓冲液 (PBS pH 7.4, 含有0.5% BSA及0.02% Tween 20) 制备22份抗原的连续1.6n稀释液且将恒定浓度的NOV1401-Fab (对于huFXI为200pM且对于huFXIa为500pM) 或NOV1401-抗体 (对于huFXI及huFXIa为10pM) 添加至各抗原浓缩物中。抗原稀释液系列的起始浓度对于huFXIa为100nM, 及20nM huFXI (Fab分析) 或1nM (IgG分析)。60μl/孔的各稀释液混合物一式两份分布于384孔聚丙烯MTP中。样品缓冲液充当阴性对照且不含抗原的样品充当阳性对照 (B_{max})。将板密封, 且在室温下在振荡器上培育隔夜。标准384孔MSD阵列MTP涂布有30μl/孔用PBS稀释的0.1μg/ml huFXIa (对于huFXIa及huFXI), 密封且在4℃下培育隔夜。

[0478] 在培育且用TBST (TBS含有0.05% Tween 20) 洗涤三次之后, 用50μl/孔阻断缓冲液 (PBS含有5% BSA) 阻断涂有抗原的MSD板且在室温下在振荡器上培育1小时。重复洗涤步骤且将30μl/孔的Fab/IgG抗原制剂从聚丙烯MTP转移至涂有抗原的MSD板且在室温下在振荡器上培育20分钟。在其他洗涤步骤之后, 将30μl 0.5μg/ml用样品缓冲液稀释的ECL标记的山羊抗人IgG/Fab检测抗体 (MSD) 添加至各孔中且在室温下在振荡下培育30分钟。在又洗涤板三次之后, 将35μl读取缓冲液 (MSD) 添加至各孔中。产生电化学发光 (ECL) 信号且用MSD Sector Imager 6000检测。

[0479] 在各分析内由重复测定计算平均ECL信号。数据通过自所有数据点减去最低值进行基线调节且针对对应抗原浓度绘图。 K_D 值通过曲线拟合以下1:1 (对于Fab) 或1:2 (对于IgG) 拟合模型确定 (根据Piehler等人, 1997)。

[0480] 结果

[0481] 结果概述于表3及4中。对于两种NOV1401形式Fab与IgG, 如BIAcore™所确定, 获得FXI催化结构域的 K_D 值为大约20nM。Fab与活化FXI及酶原FXI的亲合力在pM范围内且分别为与催化结构域的亲合力66及300倍。根据其高亲合力, 这些相互作用通过SET分析测定。NOV1401-Fab展示与酶原FXI的亲合力 (62pM) 为活化FXI (305pM) 的五倍。NOV1401-IgG与二聚合酶原及活化FXI的亲合力标记为表观 K_D 值, 因为交互作用可受亲合力作用影响。

[0482] 为确定NOV2401也结合至食蟹猴FXI, 用活化食蟹猴FXI及食蟹猴FXI酶原进行SET实验, 分别产生 12.5 ± 6.6 pM ($N=2$) 及 5.0 ± 0.7 pM ($N=2$) 的表观 K_D 值。因此, NOV1401与食蟹

猴FXI蛋白(活性形式及酶原)的亲和力与结合至人FXI(表3)相当。

[0483] 表2. 如BIAcore™所确定的人FXI催化结构域的NOV1401-Fab/IgG的 K_D 值及动力学结合参数。

[0484]	催化结构域	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)	n
	NOV1401-Fab	$3.2 \pm 0.5E+4$	$6.1 \pm 1.8E-4$	19 ± 6	3
	NOV1401-IgG	$4.2 \pm 1.6E+4$	$8.8 \pm 2.2E-4$	21 ± 3	2

[0485] 表3. 通过溶液平衡滴定(SET)确定的人活化FXI及FXI酶原的NOV1401-Fab/IgG的 K_D 值.*仅值表观 K_D 值, 因为交互作用可受亲合力作用影响。

[0486]	NOV1401-Fab	K_D [pM]	n
	人活化FXI	305 ± 8	3
	人FXI酶原	62 ± 18	3
	NOV1401-IgG		
	人活化FXI	$4.7 \pm 2.1^*$	3
	人FXI酶原	$1.3 \pm 0.3^*$	3

[0487] 参考文献: Piehler等人 Assessment of affinity constants by rapid solid phase detection of equilibrium binding in a flow system, J. Immunol. Meth. 1997. 189-206

[0488] 实施例3

[0489] 生物化学分析: 在活性分析中使用荧光肽作为底物抑制FXIa

[0490] 人FXIa (Kordia Life Science NL, 目录号HFXIa 1111a) 的活性通过监测具有序列D-Leu-Pro-Arg*^{Rh110}-D-Pro的荧光标记的肽(产品号BS-2494; Biosyntan GmbH, Berlin, 德国)的裂解确定。在上文所写的底物序列中,*指示易切断键,D-Leu: D-亮氨酸, Pro: 脯氨酸, Arg: 精氨酸, ^{Rh110}: 罗丹明110, D-Pro: D-脯氨酸)。当分别使用485nm及535nm的激发及发射波长时, 肽底物的易切断键的FXIa介导的裂解导致罗丹明110的荧光强度增加。在室温(RT)下使用微量滴定板读取器Safire2 (TECAN, Maennedorf, 瑞士)连续测定荧光强度。分析缓冲液含有50mM HEPES (pH 7.4)、125mM NaCl、5mM CaCl₂及0.05% (w/v) CHAPS。在最终活性分析中, 人FXIa及底物BS-2494的分析浓度分别为0.1nM及0.5μM。在这些条件下, 荧光强度随时间推移的增加为线性的, 维持至少60分钟。

[0491] 对于测试抗体的抑制活性, 用含有0.05% (w/v) CHAPS的PBS缓冲液(137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na₂HPO₄、1.8mM KH₂PO₄)制备抗体的连续稀释液。在室温下2μL的抗体溶液与10μL FXIa溶液(于分析缓冲液中)一起预培育60分钟。在预培育步骤之后, 添加10μL底物BS-2494(用分析缓冲液稀释), 且使酶反应进行60分钟, 其后测定荧光强度。荧光强度值转化为抑制百分比, 通过使用对照反应(不受抑制反应的信号相当于0%抑制, 且不含酶的反应相当于100%抑制)及以下关于转移值的式:

[0492] $y = 100\% - [FI(x) - FI(\min)] / [FI(\max) - FI(\min)]$,

[0493] 其中y为抗体浓度x下的抑制百分比, FI(x)为抗体浓度x下测定的荧光强度, FI(min)为不存在抗体的对照反应中测定的荧光强度且FI(max)为不受抑制的对照反应中测定的荧光强度。使用程序Origin 7.5SR6 (OriginLab Corporation, USA)分析资料。使用数理逻辑函数计算平均数据的IC50值:

[0494] $y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x / IC50)^p)$,

[0495] 其中y为抗体浓度x下的抑制百分比,A1为最低抑制值,且A2为最大抑制值。指数p为希尔系数。

[0496] 图6A展示抗体NOV1401抑制全长人FXIa的酶活性的代表性化合物反应曲线。结果展示NOV1401以浓度相关方式抑制人全长FXIa的酶活性(图6A)。拟合对数拟合模型产生大约160pM的IC₅₀值。

[0497] 实施例4

[0498] 抗FXIa Ab的抗凝血活性

[0499] 抗体NOV1401及NOV1090的抗血栓剂活性通过使用活化部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)分析及凝血酶产生分析(TGA)测试。

[0500] aPTT分析:

[0501] 冻干正常人血浆‘凝血对照N’(参考号5020050)购自Technoclone GmbH(Vienna, 奥地利)。其收集自所选健康供体的柠檬酸化血浆。由此正常血浆获得的凝血时间反映涉及凝血的凝血因子的正常浓度。冻干血浆储存于4℃下。在其使用之前,通过小心旋转小瓶且接着将其保持于室温下10分钟使血浆再悬浮于1mL蒸馏水中。

[0502] 内在途径触发试剂‘aPTT-s’(参考号TE0350)购自SYCOmed (Lemgo, 德国)且含有于缓冲溶液(氯化钠、聚乙二醇20000;蔗糖、叠氮化钠)中的磷脂及硅酸酯(胶态)。溶液储存于4℃下。

[0503] 用双蒸馏水制备25mM储备浓度的氯化钙(参考号C1016-500G;Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Steinheim,德国)。

[0504] UltraPure Tris/HCl缓冲液(pH 7.5)(参考号15567-027;Life Technologies Corporation,NY,USA)及磷酸盐缓冲盐水(PBS,参考号P4417-100TAB;Sigma-Aldrich Chemie GmbH,Steinheim,德国)为化合物稀释液。

[0505] 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙磺酸酯水合物(CHAPS,参考号C3023-25G)及无水二甲亚砜(DMSO,参考号276855-100ML)购自Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim,德国)。

[0506] 凝血时间的测定在Amelung滚珠凝血计模型KC4A(通过SYCOmed,Lemgo,德国购买)中进行,其为半自动化机械凝血检测系统。系统利用特定样品池(参考号AI4000;SYCOmed),其中置放不锈钢滚珠(参考号AI5000;SYCOmed)。

[0507] 将样品添加至样品池中。在适当孵育期之后,将样品池置放于滚珠凝血计的测定孔中。测定孔缓慢旋转,从而使样品池沿其纵向轴线旋转。因为样品池成微小角度,重力及惯性使滚珠始终置于样品池的最低点。与滚珠位置恰好相对的为磁传感器。在添加触发试剂下,起始定时器。当凝血进行时,纤维蛋白链在反应混合物中形成。纤维蛋白链将滚珠拉离触发磁传感器中的脉冲的其惯性位置。此脉冲会以电子方式使定时器停止。吸液流程如下(表4a):

[0508] 表4a

	• 分析步骤	• 溶液	• aPTT 分析 • 体积[μL]
[0509]	• 1	• 化合物稀释液或稀释剂	• 50
	• 2	• 人血浆	• 50
	• 3	• aPTT-s 试剂	• 50
	• 4	•	• 在 37℃下在旋转下培育 3 分钟
	• 5	• 25 mM 氯化钙	• 50
	• 6	•	• 立即起始定时器
	• 7	•	• 当凝块形成时定时器停止

[0510] 在37℃的温度下于Amelung滚珠凝血计中一式两份测定样品。

[0511] 图6B展示导致aPTT凝血时间的浓度相关性延长的抗体NOV1401的代表性化合物反应曲线。结果表明NOV1401导致人血浆的aPTT凝血时间以浓度相关性方式延长。与NOV1401浓度大约14nM的基线相比,aPTT凝血时间加倍。 IC_{50} 值计算为大约13nM。

[0512] 凝血酶产生分析(TGA):

[0513] TGA冻干正常人血浆(凝血对照N)购自Technoclone GmbH(参考号5020040,批号1P37B00)且用蒸馏水以制造商所推荐的体积复原。

[0514] 底物溶液使用来自Technoclone GmbH(参考号5006230,批号8F41B00)的荧光底物Z-Gly-Gly-Arg-AMC制备。冻干底物的等分试样保持于4℃。将底物在其用于分析之前20分钟新近溶解于以小瓶所示的体积的蒸馏水中。复原的底物溶液含有浓度为1mM的荧光肽及浓度为15mM的 $CaCl_2$ 。

[0515] 分别触发内在及外来途径的两种不同试剂‘TGA RD’(参考号500622)及‘低TGA RC’(参考号5006213)购自Technoclone GmbH(Vienna,Austria)。触发试剂‘低贫血小板血浆(PPP)-试剂’购自Thrombinoscope(TS31.00,批号PPL1409/01)且用如所小瓶指示的蒸馏水复原。‘低PPP试剂’含有极低浓度的磷脂及组织因子的混合物。试剂在即将使用之前用80mM Tris/HCl(pH 7.4)、0.05%(w/v)CHAPS 8倍稀释。

[0516] 将样品在购自Costar(产品号3603)的96孔黑色/透明底板中等分且测定。对于自动转移,将样品置放于V底96孔板(Costar,3894)中且使用CyBio自动系统(Alytix Jena US,Woburn,MA,USA)进行转移。

[0517] 在水浴中在37℃下将复原的人血浆、触发试剂‘低PPP试剂’及底物预温热10分钟。以5μM的NOV1401浓度为起始($5 \times$ 最高最终浓度1μM),在96孔板中制备于PBS中的连续1:3抗体稀释液,总计8次稀释。将222μl触发试剂与1108μl底物溶液混合以产生10+50触发试剂底物混合物。以每孔80μl添加至V底96孔板中以用于使用自动系统后续转移。将板保持于37℃下。根据表4b中指定的流程添加试剂。

[0518] 表4b

	• 分析步骤	• 溶液	• 体积[μl]
[0519]	• 1	• 抗体溶液(8次稀释)	• 20
	• 2	• 血浆储备溶液	• 20
	•	• 在 37℃下于热混合器中在 300 转/分钟下培育 5 分钟	
	• 3	• 触发试剂/底物混合物	• 10 + 50

[0520] 触发/底物混合物使用自动方式转移。在添加混合物之后,立即使用Synergy Neo 仪器(BioTek Instrument Inc.,Winooski,VT,USA)分别记录360nm、460nm的激发及发射。

于板读取器中在37℃的温度下以55秒的时间间隔一式两份测定样品90分钟。

[0521] 为产生峰值凝血酶浓度值,使用由Technoclone提供的TGA评估软件文件处理数据。为产生峰值凝血酶浓度相对于抗体浓度的曲线,使用GraphPad软件拟合数据。这些数据拟合GraphPad Prism5软件(GraphPad Software Inc.,La Jolla,CA,美国)中的非线性回归模型。 IC_{50} 值使用内建式四参数剂量-反应曲线等式(可变斜率)确定: $y = \text{底值} + (\text{顶值} - \text{底值}) / (1 + 10^{-(\text{LogIC}_{50} - x) * \text{希尔斜率}})$,其中y为抑制剂浓度x下形成的凝血酶的最大浓度,且顶值及底值分别表示无抑制剂下及在最高抑制剂浓度下凝血酶的浓度。

[0522] 图6C展示呈现TGA中凝血酶产生的浓度相关性抑制的抗体NOV1401的代表性化合物反应曲线。计算此化合物反应曲线的24nM的 IC_{50} 值及159nM的残余凝血酶浓度(点线)。

[0523] 实施例5

[0524] NOV1401 (Fab) -FXI (催化结构域)的蛋白表达、复合物形成、结晶及结构确定

[0525] 通过与凝血因子XI催化结构域的复合物中木瓜蛋白酶裂解获得的抗体NOV1401的Fab部分的结构,通过在**2.04Å**的分辨率下共结晶获得。

[0526] 蛋白表达:

[0527] FXI催化结构域的表达构建体由氨基酸残基388-625 (Swissprot P03951) 组成,其中不成对半胱氨酸C500突变为半胱氨酸,其中N端延伸包含氨基酸MGSS (SEQ ID NO:49),八组氨酸标签 (SEQ ID NO:50)、PreScission™裂解位点,之后为肠激酶裂解位点。构建体通过基因合成装配,克隆至pET24a表达载体中且在于LB-培养基中生长的大肠杆菌菌株BL21 (DE3) 中表示为包涵体。将包涵体溶解于50mM Tris/HCl pH 8.0、6.0M氯化胍、50mM DTT中2小时,从而使重组蛋白完全变性。将大量再折叠缓冲液(0.5M Tris pH 8.0、0.9M精氨酸HCl、5mM GSH、0.5mM GSSG、1mM EDTA)快速添加至IB溶液中,得到最终蛋白质浓度为50ug/ml且在4℃下培育5天。再折叠及二硫桥键形成通过用缓冲液A(50mM Tris pH 8.0)透析三天来实现。

[0528] 将再折叠蛋白上样于用缓冲液A平衡且洗涤的含有**Q-Sepharose®FF** (GE Healthcare)的阴离子交换层析柱上。从流动及洗涤级分收集未结合重组蛋白。通过用50mM Tris (pH 7.4)透析将pH值调节至7.4,之后使用肠激酶(肠激酶:重组蛋白比率1:100,2.5h培育时间)移除N端标签序列。裂解反应通过将样品上样于用缓冲液B(50mM Tris pH 7.4、0.5M NaCl)平衡且洗涤的含有苯甲脒琼脂糖4FF high sub (GE Healthcare)的苯甲脒(Benzamidine)亲和力柱上终止,且用缓冲液C(含有50mM苯甲脒的缓冲液B)洗脱。将活性FXI催化结构域上样于用20mM乙酸钠(pH 5.3)、75mM NaCl平衡的XK 26/600Superdex 75尺寸排阻柱(GE Healthcare)上。最终蛋白浓度为1.07mg/ml。

[0529] NOV1401的Fab部分通过IgG的木瓜蛋白酶裂解获得。最终于PBS中的Fab浓度为11mg/ml。在37℃下使用以1:100比率(w/w)添加至抗体中的木瓜蛋白酶(Roche Diagnostics 108 014;10mg/ml)且在存在1mM半胱氨酸(添加至原始IgG溶液)下消化过夜。通过添加50μM特异性木瓜蛋白酶抑制剂E64((N-[N-(L-3-反式-carboxirane-2-羰基)-L-白胺酰基]-胍丁胺)终止消化且消化物流过小蛋白A柱(5mL)以移除Fc部分。在流过物中回收Fab,用PBS透析,通过超滤浓缩至其最终浓度且进行无菌过滤(0.22μm)。

[0530] 复合物形成、结晶及结构解析:

[0531] FXI催化结构域及Fab以等摩尔比混合且浓缩至最终浓度为大约9mg/ml。

[0532] 用于数据收集的结晶在277K下利用沉滴式气相扩散、混合0.3 μ L储层溶解(0.2M氯化铵,20%PEG 3350)、0.2 μ L Fab-FXI复合物及0.1 μ L来自第一轮结晶筛检中所获得的结晶的结晶晶种获得。

[0533] 对于数据收集,使晶体在液氮中直接急骤冷冻。用Swiss Light Source光束线X10SA在**1.00002Å**的波长下使用Pilatus像素检测器(Dectris)在100K下收集资料。数据处理及换算用XDS及XSCALE进行(Kabsch,W. (2010) Acta Cryst.D66,125-132)。结晶衍射至分辨率为**2.04Å**,其中单位晶胞尺寸为 $a=191.27, b=53.22, c=65.164, \alpha=90.0, \beta=94.56, \gamma=90.0$ (空间群C2),每个不对称单元一个复合物复本。

[0534] 复合物的结构通过分子置换,使用先前内部解析为搜寻模型的FXI催化结构域及截短Fab的结构使用PHASER来解析(McCoy,A.J.等人(2007) J.Appl.Cryst.40,658-674)。使用勃斯特风(buster)及coot rsp进行优化及改造交替循环。(Bricogne,G.等人(2010) BUSTER版本2.9.Cambridge,英国:Global Phasing Ltd.;Emsley,P.及Cowtan,K. (2004) .Acta Crystallogr.D60,2126-2132)。数据收集及优化统计资料概述于表5中。

[0535] 表5.数据收集及优化统计资料

资料收集	
空间群	C2
细胞尺寸	
a, b, c (Å)	191.27, 53.22, 65.16
α, β, γ (°)	90, 94.56, 90
分辨率(Å)	64.96 - 2.04 (2.09 - 2.04)
R_{sym}	0.099 (0.571)
$I / \sigma \ I$	10.8 (2.7)
完整性(%)	95.9 (98.4)
冗余度	3.2
[0536]	
优化	
分辨率(Å)	64.96 - 2.03
反射量	40088
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$	0.217 / 0.282
原子量	
蛋白质	5071
水	413
R.m.s. 偏差	
键长度(Å)	0.01
键角(°)	1.19

[0537] *圆括号中的值是针对最高分辨率外壳。

[0538] 结构的描述:

[0539] 结构显示抗体NOV1401的结合表位结合至活性位点表面,其中重链CDR3环覆盖S3、S2、S1- β 及S1'子位点(subsite)的部分。相邻重链CDR1及CDR2环(胰凝乳蛋白酶编号)诱导FXI 145及220环中的构象变化。另外,四个N端FXI残基以及Asp189周围的残基无序;两者为

对FXI的催化活性具有关键功能的部分。145环的构象变化导致Arg144阻塞S1穴及Tyr143阻塞S2'子位点。因此,抗体结合通过多种机制产生抑制的构象。

[0540] 观察到的抑制形式与针对全长酶原形式的FXI (PDB 2F83) 共享所述特征。FXI催化结构域的具有变化的构象或由于抗体结合而无序的部分在酶原中也无序。此情况解释NOV1401也与酶原形式的FXI强力结合。

[0541] 发现NOV1401并不抑制FXI酶原活化与结合表位距FXIa酶原活化裂解位点的距离一致。NOV1401结合至FXI与FXIa。Fab-FXI CD复合物的X射线结构显示特有结合模式及FXIa抑制机制。NOV1401结合至FXIa的活性位点(图4)且诱导四个N端残基及催化结构域环的构象变化,从而产生非活性构象。此非活性构象与酶原中的非活性催化结构域结构有共同特征(图5),从而解释FXI与FXIa可以高亲和力结合NOV1401的方式。例如,酶原结构中无序的三个催化位点环(例如环220、环188及环145)在NOV1401 Fab-FXI CD复合物结构中也无序或发生移动,且在酶原与NOV1401 Fab-FXI CD复合物结构中活性构象中观察到的N端盐桥不存在(表6)。因此,NOV1401似乎会诱导CD内的构象变化,从而产生非活性酶原样构象。

[0542] 表6:FXIa CD、与NOV1401复合的FXIa CD及FXI-酶原(CD)的结构性特征:

	FXIa CD	NOV1401-FXI CD 复合物	FXI 酶原
[0543] 盐桥 Ile16-Asp194	+	-	-
环 145	有序	发生移动	无序
环 188	有序	无序	无序
环 220	有序	发生移动	无序

[0544] 实施例6

[0545] 基于表位定位的X射线结构

[0546] 使用AREAIMOL分析与Fab接触的FXI的残基 (Briggs,P.J. (2000) CCP4 Newsletter No.38),从而确定当无结合Fab下及在复合物中有Fab下计算时残基表面积差异,如下表7及表8a中所述 (Swissprot编号):

[0547] 表7:FXI表位

[0548] 表位(加下划线:轻链及重链接触):

轻链接触	重链接触
Pro410 Arg413 <u>His431</u> <u>Tyr434</u> Gly435 Glu437 <u>Tyr472</u> Lys473 Met474 <u>Glu476</u> <u>Tyr521</u> <u>Leu524</u> <u>Arg525</u> <u>Asp526</u> His552	Leu415 Cys416 <u>His431</u> Cys432 <u>Tyr434</u> <u>Tyr472</u> <u>Met474</u> Ala475 <u>Glu476</u> <u>Tyr521</u> Arg522 Lys523 <u>Leu524</u> <u>Arg525</u> <u>Asp526</u> Lys527 Arg548 Ser575 Ser594 Trp595 Gly596 Glu597 Arg602 Glu603 Arg604

[0550] FXI表位由以下残基形成：

[0551] Pro410、Arg413、Leu415、Cys416、His431、Cys432、Tyr434、Gly435、Glu437、Tyr472-Glu476、Tyr521-Lys527、Arg548、His552、Ser575、Ser594-Glu597、Arg602-Arg604。

[0552] 表8a：与NOV1401接触的FXI的残基（表位）

残基	面积差异
PRO A 410	-11.0
ARG A 413	-36.3
LEU A 415	-3.6
CYS A 416	-2.1
HIS A 431	-36.5
CYS A 432	-0.6
TYR A 434	-108.1
GLY A 435	-31.6
GLU A 437	-3.7
TYR A 472	-13.0
LYS A 473	-40.1
MET A 474	-73.1

[0554]

ALA A 475	-12.0
GLU A 476	-40.4
TYR A 521	-18.5
ARG A 522	-46.6
LYS A 523	-74.7
LEU A 524	-147.1
ARG A 525	-212.6
ASP A 526	-17.7
LYS A 527	-0.2
ARG A 548	-11.6
HIS A 552	-4.0
SER A 575	-7.7
SER A 594	-8.7
TRP A 595	-20.9
GLY A 596	-17.5
GLU A 597	-49.0
ARG A 602	-18.5
GLU A 603	-2.0
ARG A 604	-41.0

[0555] X射线表位定位于催化结构域序列上(形成表位的残基加粗且加下划线):

388 391
 IVG GTASVRGEWP WQVTLHTTSP TQRHLCGGSI IGNQWILTAA HCFYGVESPK
 441
 ILRVYSGILN QSEIKEDTSF FGVQEIIHD QYKMAESGYD IALLKLETTV
 491
 NYTDSQRPIC LPSKGDRNVI YTDCWVTGWG YRKLRDKIQN TLQKAKIPLV
 541
 TNEECQKRYR GHKITHKMIC AGYREGGKDA CKGDSGGPLS CKHNEVWHLV
 591 625
 GITSWGEGCA QRERPGVYTN VVEYVDWILE KTQAV (SEQ ID NO: 51)

[0557] 表8b展示与FXI接触的抗体的残基(互补位)。

[0558] 表8b:与FXI接触的NOV1401的残基(互补位)。

[0559] L,轻链;H,重链

[0560]

残基差异	面积
SER L 27	-1.80
GLY L 30	-5.00
SER L 31	-52.60
ASN L 32	-21.00
ASP L 33	-22.00
TYR L 50	-36.00
LYS L 51	-54.20
TYR L 53	-41.40
ASN L 54	-25.50
LYS L 67	-6.90
TRPL 92	-44.30
GLN L 94	-72.00

[0561]

ARG L 95	-5.70
PHE L 97	-54.70
ASP L 98	-2.70
VAL L 99	-0.10
PHE H 27	-2.00
THR H 28	-20.50
SER H 30	-13.80
THR H 31	-78.90
ALA H 33	-10.80
TRP H 47	-12.70
SER H 52	-2.20
TYR H 59	-62.00
TYR H 60	-0.80
GLU H 99	-1.70
SER H 101	-51.30
TYR H 102	-116.60
LEU H 103	-175.00
TYR H 104	-140.20
SER H 105	-1.30

[0562] 实施例7

[0563] FXI抗体对小鼠中FeCl₃诱导的血栓形成的影响

[0564] 缺乏FXI的小鼠 (FXI^{-/-}小鼠) 在C57Bl背景上在Novartis (E.Hanover, NJ) 下培育且用以评定NOV1401的抗血栓疗效。当用人FXI (hFXI) 静脉内重构时, 这些小鼠在暴露于形成血栓的刺激时采集野生型易栓表达型。在本文中的研究中, 在颈动脉中血栓通过施用氯化铁 (FeCl₃) 至动脉表面来诱导。

[0565] NOV1401在诱导血栓形成之前15分钟通过麻醉小鼠的颈静脉快速浓注。抗体的剂量在0.24mg/kg-0.47mg/kg的范围内。FXI^{-/-}小鼠通过在FeCl₃攻击之前10分钟通过颈静脉注入0.47mg/kg人FXI用人FXI复原。接着将两个用3.5%FeCl₃饱和的1mm×1.5mm滤纸片施加至颈动脉的相对侧, 与其外膜表面接触, 且3分钟之后移除, 之后用生理食盐水彻底洗涤。用跨音速流动探针 (Transonic flow probe) 测定通过颈动脉的血流。在FeCl₃施用之前5分钟且接着在施用FeCl₃之后30分钟 (也即在形成血栓时段期间) 获得基线血流。在实验结束时, 自腔静脉取样血液至含有3.8%柠檬酸钠的注射器中, 制备血浆且经受aPTT分析。

[0566] 图1A展示用人FXI复原的FXI^{-/-}小鼠 (人源化FXI小鼠模型) 中NOV1401对FeCl₃诱导的血栓形成的作用。图1B展示相同小鼠模型中, NOV1401对aPTT的作用。图1C展示与野生型小鼠相比, FXI^{-/-}小鼠中的aPTT延长。

[0567] NOV1401以0.24mg/kg起始完全抑制重构的FXI^{-/-}小鼠中FeCl₃诱导的血栓形成 (图1A)。观察到陡峭剂量反应, 可能反映化学计量的全有或全无抗血栓反应。在高剂量组中aPTT延长至相比于载体对照的1.6倍 (图1B), 对应于通过FXI的遗传消耗得到的相同延长程度 (图1C), 也即最大作用。这些结果展示NOV1401在小鼠FeCl₃血栓模型中具有抗血栓活性。

[0568] 实施例8

[0569] FXI抗体对食蟹猴中游离FXI及aPTT的影响

[0570] 为评估抗FXI/FXIa抗体 (诸如NOV1401) 的药物动力学 (PK) 概况及药理效应, 在递

增量研究中抗体通过皮下 (s.c.) 或静脉内 (i.v.) 注射施用到食蟹猴中。

[0571] NOV1401的抗凝血作用在食蟹猴中通过在单次静脉内 (N=2) 或皮下 (N=2) 给药 3mg/kg之后测试抗体延长aPTT及减低游离FXI (FXI_f) 含量的能力来表征。向所有动物施用第二剂量10mg/kg, 之后第三剂量30mg/kg, 以判定在3mg/kg下观察到的作用是否可通过较高剂量增强。这些结果展示NOV1401在食蟹猴中具有持续抗凝血活性。接着使由如由aPTT及FXI_f含量所确定的其抗凝血作用表征的NOV1401的药效动力学 (PD) 与PK概况相比。比较结果指示存在良好PK/PD相关性。

[0572] 动物经静脉内 (N=2) 或皮下 (N=2) 给药在研究第1天3mg/kg, 第85天10mg/kg及第114天30mg/kg的NOV1401。对于静脉内给药动物在给药后15分钟及2小时, 且对于所有动物在测试前、给药后6、24、48、72及96小时 (第1、85及114天) 及在给药后8、11、15、18、22、25、29、32、36、39、43、46、50、53、57、60、64、66、71、75及78天 (仅第1天), 将血液样品收集至柠檬酸钠凝血管中。也在第92、95、99、102、107、110、121、124、128天及在第114天给药之前收集血液。将所有血液样品离心; 获得血浆样品且冷冻于大约-70℃或低于-70℃下。

[0573] 总NOV1401血浆浓度通过ELISA的标准人IgG检测方法使用夹心免疫分析用小鼠抗人IgG单克隆抗体作为捕捉抗体及具有HRP标记的山羊抗人IgG作为检测抗体来测定。

[0574] 对于含有FXI与NOV1401的血浆样品中的游离FXI测定, 用固定的NOV1401捕获未结合FXI且洗掉已与NOV1401复合的FXI。接着用小鼠含Fc抗体14E11, 一种结合至FXI的A2结构域且描述于文献 (Cheng等人, Blood, 116:3981-3989, 2010) 中的单克隆抗体检测板结合FXI。NOV1401与FXI及FXIa的极高亲和力及NOV1401的不同结合位点及检测抗体14E11使得精确确定游离FXI。

[0575] ELISA板 (384孔LUMITRAC™600HB) 涂布有NOV1401 (于PBS中5μg/mL) 以结合游离FXI。在阻断 (乳汁阻断剂: KPL号50-82-01, 1:20稀释) 及用洗涤缓冲液 (PBS; 0.05% Tween 20) 洗涤板之后, 在室温下培育用分析缓冲液 (50mM HEPES (pH 7.4)、125mM NaCl、5mM CaCl₂、5mM EDTA及0.05% (w/v) CHAPS) 1:40稀释的血浆样品30分钟, 且用洗涤缓冲液洗涤3次。添加1μg/mL于含有0.7%酪蛋白的稀释缓冲液 (1.7mM单碱磷酸钠、8.1mM磷酸氢二钠七水合物、0.15M氯化钠、0.7% Triton X-100及0.1%叠氮化钠, pH 7) 中的检测抗体14E11。在用洗涤缓冲液洗涤板之后, 添加0.5μg/mL于含有0.4%酪蛋白的稀释缓冲液中的二级检测抗体, 过氧化酶标记的抗小鼠IgG (Sigma号A5278)。在用洗涤缓冲液洗涤板之后, 添加50μL 过氧化酶化学发光底物溶液 (LumiGLO, KPL号54-61-01) 且经多模式微量板读取器 (SPECTRAMAX M5E) 立即读取发光信号。各样品中的游离FXI浓度使用由来自Enzyme Research Laboratories的人FXI (酶原) (目录号HFXI 1111) 产生的标准曲线以100nM FXI为起始物质来确定, 其中稀释因子为2及22个稀释步骤。考虑在测定之前1:40稀释, 定量分析的下限 (LLOQ) 为0.24nM FXI。

[0576] 来自所有时间点的血浆样品经受aPTT分析且将aPTT结果与总血浆NOV1401浓度及游离FXI含量相比。图2A及2B展示对于静脉内及皮下给药动物, 与总血浆NOV1401含量相关的aPTT凝血时间的变化。图3A及3B展示对于静脉内及皮下给药动物, 与游离FXI含量相关的aPTT凝血时间的变化。

[0577] 对于静脉内施用的NOV1401, 在给药后15min观察到最高血浆总NOV1401含量 (图2A)。此时, 在两种动物中aPTT相对于基线大约加倍, 且维持此含量平均5-6周。对于各动物,

自给药后15min经测定过程在向基线下降前的平均aPTT延长为 2.0 ± 0.02 倍及 1.9 ± 0.03 倍。

[0578] 第85天,在施用第二剂量之前,aPTT达到基线含量且NOV1401血浆浓度降落至低于10nM。在第85天施用第二剂量10mg/kg,从而使总NOV1401的血浆浓度增至约至少3倍且产生与第一剂量后所观察到类似的aPTT延长。在第114天施用第三剂量30mg/kg,同时aPTT仍延长,但不会导致任何显著其他aPTT延长,但总NOV1401血浆浓度再增加至至少3倍(图2A)。因此,高于3mg/kg的NOV1401剂量实现与3mg/kg剂量类似的aPTT延长,但似乎不会使aPTT延长的量值增加。正如所料,皮下施用NOV1401致使aPTT升高比静脉内施用慢,但延长程度与静脉内组相当(图2B)。在两种动物中aPTT相对于基线延长维持平均5-6周。自给药后6小时通过测定过程在朝向基线下降之前平均aPTT倍数延长与静脉内治疗的动物类似: 2.0 ± 0.03 及 1.8 ± 0.02 。如在静脉内施用中,较高剂量不会引起较高aPTT反应,但会有较高NOV1401血浆暴露。

[0579] 图2A-2B中的结果表明在食蟹猴中NOV1401会延长aPTT。

[0580] 平均基线血浆FXI_f浓度在静脉内组中为 10.9 ± 0.3 nM且在注射NOV1401后快速下降(15min)(图3A)。血浆FXI_f含量仍保持低直至总NOV1401血浆含量降至15nM与25nM之间(图2A、图3A)。在皮下组中,平均基线FXI_f浓度为 14.3 ± 1.0 nM。治疗后6小时FXI_f相对于基线急剧降低(图3B),且保持低直至血浆NOV1401含量下降至15nM与25nM之间(图2B、图3B)。在所有动物中FXI_f在10mg/kg的第二剂量之后又急剧降低,且仍保持低直至研究结束。两个较高剂量不会使FXI_f相对于基线进一步降低。

[0581] 在所有经治疗的动物中,FXI_f含量的降低及恢复与NOV1401诱导的aPTT延长按时序且成反比相关,从而确定NOV1401会通过降低FXI_f抑制内在凝血途径(延长aPTT)的功能。

[0582] 这些结果(例如图3A及3B)表明在食蟹猴中NOV1401会降低血浆FXI_f含量。在食蟹猴研究中,在静脉穿刺位置或通过尸检时的总观察结果未观察到过量出血迹象。此外,在整个研究中在粪便中未检测到潜血。

[0583] 在食蟹猴中在13周皮下/4周静脉内重复剂量毒性研究中也观察到NOV1401的持续抗凝血作用。在此研究中,每周皮下施用剂量为10mg/kg(N=3,雄性 & 雌性组合)及100mg/kg(N=5,雄性 & 雌性组合)的NOV1401维持13周(14个剂量)或静脉内施用50mg/kg(N=3,雄性 & 雌性组合)维持4周(5个剂量)。对照组(N=5,雄性 & 雌性组合)分别皮下及静脉内接受载体13及4周。FXI:C通过在人FXI缺乏血浆存在下测定食蟹猴血浆样品的凝血时间来评定(一级aPTT)。对于皮下组在研究第2、23及79天及对于静脉内组在第2及23天测定aPTT及FXI:C。在所有动物及所有治疗组上,观察到aPTT延长2.1至3倍(图7A)。该作用持续于整个研究的给药阶段中,且与先前递增剂量研究中观察到类似,未观察到剂量依赖性。在动物及治疗组上FXI:C降低88-95%且在整个研究的给药阶段中仍维持这些含量(图7B)。FXI:C的作用在这些剂量上也为剂量无关的。

[0584] 在静脉穿刺位置(包括皮下及静脉内注射及血液取样位置)或尸检时通过总观察结果未观察到包括过量出血的出血的宏观或微观适应症的迹象。此外,在研究结束时在粪便中未检测到潜血。另外,未出现死亡且不存在对临床症状、体重、食物消耗、眼科及心电图参数、血液病、临床化学方法或尿分析的测试物品相关的作用。未鉴别出具有毒性的目标器官。

[0585] 在雄性中在100mg/kg皮下观察到甲状腺重量增加。然而,此研究结果的毒理学显著性不确定,因为不存在组织学相关性。在动物中存在甲状腺重量的较大变化,且该研究结果仅存在于一种性别中。在两种性别中在10及100mg/kg/周皮下注射下,用显微镜在皮下注射位置下观察到剂量依赖性纤维化。不会将这些研究结果视为不良。

[0586] 在食蟹猴中,在单次递增剂量或重复剂量的通用毒性研究中,长达13周均未观察到显著毒性研究结果。因此,13周GLP毒性研究(100mg/kg/周)中施用的最高皮下剂量定义为NOAEL。

[0587] 实施例9

[0588] 食蟹猴中的药物动力学-单次剂量

[0589] 食蟹猴(雌性,N=2)静脉内或皮下施用单次3mg/kg剂量的NOV1401,且进行观察直至血浆FXI_f浓度及aPTT返回至给药前值。动物接着静脉内或皮下施用单次10mg/kg剂量的NOV1401,2周后静脉内或皮下施用30mg/kg剂量且另外2周观察期。NOV1401的PK通过测定总NOV1401来评定。由最大观察总NOV1401浓度($C_{\max}$)或总NOV1401浓度-时间曲线下面积(AUC_{0-14d})所测定,在各组的个别动物之间对于总NOV1401的暴露类似。对于各给药途径,暴露($C_{\max}$ 或 AUC_{0-14d})大约与剂量成比例(表9)。与皮下组相比,在静脉内组中, $C_{\max}$ 大约高达3倍。然而,在两个组中在起始分布阶段之后,血浆总NOV1401浓度类似。在施用3mg/kg剂量后使用二室模型估计各动物的最终消除半衰期($t_{1/2}$)。 $t_{1/2}$ 在14-15天的范围内(N=2)。皮下注射后的绝对生物可用性在61%-66%的范围内(3次剂量)。在任何动物中在静脉内或皮下施用之后未检测到抗NOV1401抗体。

[0590] 表9:雌性食蟹猴中单次(递增)剂量施用后的平均药物动力学参数

[0591]	剂量(mg/kg)	途径	$t_{\max}$ (hr)*	$C_{\max}$ (μg/mL)	AUC_{0-14d} (μg · d/mL)
	3	静脉内	0.25	96.0	544
	3	皮下	168	36.0	360
	10	静脉内	0.25	325	1,810
	10	皮下	132	101	1,160
	30	静脉内	1.08	1,170	6,770
	30	皮下	132	344	4,140

[0592] * $t_{\max}$ 报导为中间值。

[0593] 实施例10

[0594] 食蟹猴中的药物动力学-重复剂量

[0595] 食蟹猴每周皮下施用剂量10或100mg/kg的NOV1401维持13周(14个剂量)或静脉内每周施用剂量50mg/kg的NOV1401维持4周(5个剂量)。在该研究的给药阶段期间用NOV1401治疗的动物暴露于NOV1401;在对照动物中未注意到暴露。在暴露于血浆总NOV1401中未观察到性别相关的差异。在雄性与雌性动物中暴露的增加($C_{\max}$ 与 AUC_{0-7d})与剂量成比例(表10)。在皮下10mg/kg/周下在6只动物中的5只中,在皮下100mg/kg/周下在10只动物中的1只中及在静脉内50mg/kg/周下在6只动物中的1只中检测到抗NOV1401抗体。在任一皮下剂量组中,对总NOV1401的暴露不受损。仅一只抗药物抗体(ADA)阳性动物在研究第22天的 AUC_{0-7d} 低于相同组中的其他动物(50mg/kg/周,静脉内)。在此动物中对aPTT延长无影响且未观察到毒性。

[0596] 表10:食蟹猴(雄性+雌性组合)中13周/4周GLP适应毒性研究的倒数第二剂量(皮下组研究第85天,静脉内组研究第22天)的平均毒理动力学参数

[0597]	剂量 (mg/kg/周)	途径	$t_{\max}$ (hr)*	$C_{\max}$ (μg/mL)	$AUC_{0-14\text{天}}$ (μg • d/mL)
	10	皮下	24-120	719	3,100
	100	皮下	72-120	5,630	23,400
	50	静脉内	0.25-96	1,990	10,700

[0598] * $t_{\max}$ 为报导为观察到的值的范围。

[0599] 实施例11

[0600] 人中的剂量递增研究

[0601] 在健康个体中单次剂量施用之后,进行人研究以评定抗FXI/FXIa抗体,诸如NOV1401的安全性及耐受性。总计大约60个18与55岁之间的健康雄性及绝经后/以手术方式不育的雌性个体进入此研究。良好健康状况通过以往病史、身体检查、神经研究、生命体征、心电图(ECG)及筛检时的实验室测试来确定。所选个体重量为至少50kg,且身体质量指数(BMI)在18-35kg/m²的范围内。 $BMI = \text{体重 (kg)} / [\text{身高 (m)}]^2$ 。

[0602] 在人研究中测试六个皮下剂量5mg、15mg、50mg、150mg、300mg及600mg,其限制条件为在任何测试剂量下aPTT延长的预测平均持续时间 ≥ 2 倍不会保持 ≥ 42 天。进行两次临时分析(IA)以确定2种最高剂量的剂量选择。若在300mg或600mg剂量下模型预测的平均aPTT延长持续时间 ≥ 2 倍维持比42天更长,则剂量可例如根据模型仿真降低以确保平均aPTT延长持续时间不超过2倍维持 ≥ 42 天。非限制性例示性剂量调节可包括使用10mg、20mg、30mg、40mg或50mg的递减量使剂量降低。

[0603] 前三个剂量递增步骤以约1/2的对数增量出现。最后2个剂量递增步骤 ≤ 2 倍增量,以降低目标饱和度和aPTT延长延伸的风险。

[0604] 用治疗目标FXI使aPTT延长2倍维持数天的最大持续时间(例如30天、35天、40天、42天等)可根据展示重度FXI缺乏患者的轻度出血现象型的遗传资料、来自获取抑制剂的FXI缺乏患者的资料以及来自人研究的数据来评定,(例如FXI-ASO)(参见例如Liu等人,(2011)“ISIS-FXIRx, a novel and specific antisense inhibitor of factor XI, caused significant reduction in FXI antigen and activity and increased aPTT without causing bleeding in healthy volunteers.”第53界美国血液学学会年度会议和博览会(American Society of Hematology annual meeting and exposition)上提出, San Diego, California. Blood; 118: Abstract 209),其中经6周多剂量施用FXI-ASO产生超过6周(42天)的稳固且持续的FXI消耗,但无出血事件。在某些实施例中,基于模型的分析预测约2.7倍(相对于给药前)的最大aPTT延长可在50mg皮下剂量的NOV1401下瞬时实现(60kg个体)。在某些实施例中,预测较高剂量会使此2.7倍的最大aPTT延长的持续时间延伸。

[0605] 在整个研究中监测个体的安全性参数和/或端点,诸如身体检查、神经检查、生命体征、心电图(ECG)、安全性实验室、及包括严重AE(SAE)的不良事件(AE),直至且包括给药后106天。

[0606] 抗FXI/FXIa抗体(例如NOV1401)对aPTT的作用根据与基线的相对变化来评定。测定总抗FXI/FXIa抗体(例如NOV1401)的血浆浓度以评定这些个体中单次剂量的PK。

[0607] 为评定抗FXI/FXIa抗体(例如NOV1401)的免疫原性(IG),进行ADA的筛检及确认。

[0608] 测定游离及总FXI及FXI凝血活性 (FXI:C) 以评定抗FXI/FXIa抗体 (例如NOV1401) 对目标接合及目标相关PD参数的作用。

[0609] 评定D-二聚体、凝血酶原片段1.2 (F1.2) 及凝血酶原抗凝血酶复合物 (TAT) 以确定抗FXI/FXIa抗体 (例如NOV1401) 对血栓形成参数的作用。

[0610] 为研究抗FXI/FXIa抗体 (例如NOV1401) 对其他凝血参数的作用,可评定以下各者: 凝血酶原时间 (PT)、凝血酶时间 (TT) 及探索性凝血实验室参数 (诸如凝血酶可活化纤维蛋白溶解抑制剂、血纤维蛋白原、组织纤维蛋白溶酶原活化因子 (tPA) 及个体中的TGA)。

[0611] 所研究的生物标记可包括 (但不限于): D-二聚体、FXI活性、PT/INR、TT、F1.2、血纤维蛋白原、TGA、TAFI活性、TAT、PAI-1抗原、TFPi活性、tPA活性及vWF活性。

[0612] 参考文献的并入

[0613] 本文中所引用的全部参考文献 (包括专利、专利申请案、论文、公开、教科书及类似者) 及其中引用的参考文献就其尚未引用的程度而言是以全文引用的方式特此并入本文中。

[0614] 等效物

[0615] 前述书面说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。前述说明及实施例详述本发明的某些优选实施例且描述本发明人所预期的最佳方式。然而,将了解无论前述在本文中如何详述呈现,本发明可以许多方式实施,且本发明应根据所附申请专利范围及其任何等效物解释。

序列表

<110> 诺华股份有限公司 (NOVARTIS AG)

<120> 凝血因子XI抗体及使用方法

<130> PAT056955-W0-PCT

<140>

<141>

<150> 62/341,568

<151> 2016-05-25

<150> 62/184,955

<151> 2015-06-26

<160> 51

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 625

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

Met Ile Phe Leu Tyr Gln Val Val His Phe Ile Leu Phe Thr Ser Val
1           5           10           15
Ser Gly Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly
          20           25           30
Gly Asp Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val
          35           40           45
Val Cys Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu
          50           55           60
Ser Pro Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp
65           70           75           80
Ser Val Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ser
          85           90           95
Gly Tyr Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys
          100          105          110
Asp Ile Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser
          115          120          125
Val Ala Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val
          130          135          140
His Cys His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu
145           150           155           160
His Arg Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr

```

				165				170				175			
Arg	Ile	Thr	Lys	Leu	Asp	Lys	Val	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Lys	Ser
				180				185				190			
Cys	Ala	Leu	Ser	Asn	Leu	Ala	Cys	Ile	Arg	Asp	Ile	Phe	Pro	Asn	Thr
				195				200				205			
Val	Phe	Ala	Asp	Ser	Asn	Ile	Asp	Ser	Val	Met	Ala	Pro	Asp	Ala	Phe
				210				215				220			
Val	Ser	Gly	Arg	Ile	Cys	Thr	His	His	Pro	Gly	Cys	Leu	Phe	Phe	Thr
225				230				235				240			
Phe	Phe	Ser	Gln	Glu	Trp	Pro	Lys	Glu	Ser	Gln	Arg	Asn	Leu	Cys	Leu
				245				250				255			
Leu	Lys	Thr	Ser	Glu	Ser	Gly	Leu	Pro	Ser	Thr	Arg	Ile	Lys	Lys	Ser
				260				265				270			
Lys	Ala	Leu	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Gln	Ser	Cys	Arg	His	Ser	Ile	Pro
				275				280				285			
Val	Phe	Cys	His	Ser	Ser	Phe	Tyr	His	Asp	Thr	Asp	Phe	Leu	Gly	Glu
				290				295				300			
Glu	Leu	Asp	Ile	Val	Ala	Ala	Lys	Ser	His	Glu	Ala	Cys	Gln	Lys	Leu
305				310				315				320			
Cys	Thr	Asn	Ala	Val	Arg	Cys	Gln	Phe	Phe	Thr	Tyr	Thr	Pro	Ala	Gln
				325				330				335			
Ala	Ser	Cys	Asn	Glu	Gly	Lys	Gly	Lys	Cys	Tyr	Leu	Lys	Leu	Ser	Ser
				340				345				350			
Asn	Gly	Ser	Pro	Thr	Lys	Ile	Leu	His	Gly	Arg	Gly	Gly	Ile	Ser	Gly
				355				360				365			
Tyr	Thr	Leu	Arg	Leu	Cys	Lys	Met	Asp	Asn	Glu	Cys	Thr	Thr	Lys	Ile
				370				375				380			
Lys	Pro	Arg	Ile	Val	Gly	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Gly	Glu	Trp	Pro
385				390				395				400			
Trp	Gln	Val	Thr	Leu	His	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Arg	His	Leu	Cys
				405				410				415			
Gly	Gly	Ser	Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Trp	Ile	Leu	Thr	Ala	Ala	His	Cys
				420				425				430			
Phe	Tyr	Gly	Val	Glu	Ser	Pro	Lys	Ile	Leu	Arg	Val	Tyr	Ser	Gly	Ile
				435				440				445			
Leu	Asn	Gln	Ser	Glu	Ile	Lys	Glu	Asp	Thr	Ser	Phe	Phe	Gly	Val	Gln
				450				455				460			
Glu	Ile	Ile	Ile	His	Asp	Gln	Tyr	Lys	Met	Ala	Glu	Ser	Gly	Tyr	Asp
465				470				475				480			

Ile Ala Leu Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln		
485	490	495
Arg Pro Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr		
500	505	510
Asp Cys Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile		
515	520	525
Gln Asn Thr Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu		
530	535	540
Cys Gln Lys Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys		
545	550	555
Ala Gly Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly		
565	570	575
Gly Pro Leu Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile		
580	585	590
Thr Ser Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr		
595	600	605
Thr Asn Val Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala		
610	615	620

Val

625

<210> 2

<211> 3278

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

aggcacacag gcaaaatcaa gttctacatc tgtccctgtg tatgtcactt gtttgaatac	60
gaaataaaat taaaaaata aattcagtgt attgagaaag caagcaattc tctcaaggta	120
tattttctgac atactaagat ttttaacgact ttcacaaata tgctgtactg agagagaatg	180
ttacataaca ttgagaacta gtacaagtaa atattaaagt gaagtgacca tttcctacac	240
aagctcattc agaggaggat gaagaccatt ttggaggaag aaaagcaccc ttattaagaa	300
ttgcagcaag taagccaaca aggtcttttc aggatgattt tcttatatca agtggtacat	360
ttcatTTTTat ttacttcagt ttctggtgaa tgtgtgactc agttgttgaa ggacacctgc	420
tttgaaggag gggacattac tacggtcttc acaccaagcg ccaagtactg ccaggtagtc	480
tgcaacttacc acccaagatg tttactcttc actttcacgg cggaatcacc atctgaggat	540
cccacccgat ggtttacttg tgtcctgaaa gacagtgtta cagaaacact gccaaagatg	600
aataggacag cagcgatttc tgggtattct ttcaagcaat gctcacacca aataagcgt	660
tgcaacaaag acatttatgt ggacctagac atgaagggca taaactataa cagctcagtt	720
gccaaagatg ctcaagaatg ccaagaaaga tgcacggatg acgtccactg ccactttttc	780
acgtacgcca caaggcagtt tcccagcctg gagcatcgta acatttgtct actgaagcac	840

acccaaacag	ggacaccaac	cagaataacg	aagctcgata	aagtgggtgc	tggattttca	900
ctgaaatcct	gtgcactttc	taatctggct	tgtattaggg	acattttccc	taatacgggtg	960
tttgcagaca	gcaacatcga	cagtgtcatg	gctcccgatg	cttttgtctg	tggccgaatc	1020
tgcactcatc	atcccggttg	cttgtttttt	accttctttt	cccaggaatg	gccccaaagaa	1080
tctcaaagaa	atctttgtct	ccttaaaaca	tctgagagtg	gattgcccag	tacacgcatt	1140
aaaaagagca	aagctctttc	tggtttcagt	ctacaaagct	gcaggcacag	catcccagtg	1200
ttctgccatt	cttcatttta	ccatgacact	gatttcttgg	gagaagaact	ggatattgtt	1260
gctgcaaaaa	gtcacgaggc	ctgccagaaa	ctgtgcacca	atgccgtccg	ctgccagttt	1320
tttacctata	ccccagccca	agcatcctgc	aacgaaggga	agggcaagtg	ttacttaaag	1380
ctttcttcaa	acggatctcc	aactaaaata	cttcacggga	gaggaggcat	ctctggatac	1440
acattaaggt	tgtgtaaaaat	ggataatgag	tgtaccacca	aatcaagcc	caggatcggt	1500
ggaggaactg	cgtctgttcg	tggtgagtgg	ccgtggcagg	tgaccctgca	cacaacctca	1560
cccactcaga	gacacctgtg	tggaggetcc	atcattggaa	accagtggat	attaacagcc	1620
gctcactgtt	tctatggggg	agagtcacct	aagattttgc	gtgtctacag	tggcatttta	1680
aatcaatctg	aaataaaaaga	ggacacatct	ttctttgggg	ttcaagaaat	aataatccat	1740
gatcagtata	aaatggcaga	aagcgggtat	gatattgcct	tgttgaaact	ggaaaccaca	1800
gtgaattaca	cagattctca	acgacccata	tgctgcctt	ccaaaggaga	tagaaatgta	1860
atatacactg	attgctgggt	gactggatgg	gggtacagaa	aactaagaga	caaaatacaa	1920
aatactctcc	agaaagccaa	gataccctta	gtgaccaacg	aagagtgcc	gaagagatac	1980
agaggacata	aaataaccca	taagatgac	tgtgccggct	acagggaagg	agggaaggac	2040
gcttgcaagg	gagattcggg	aggccctctg	tcctgcaaac	acaatgaggt	ctggcatctg	2100
gtaggcatca	cgagctgggg	cgaaggctgt	gctcaaaggg	agcggccagg	tgtttacacc	2160
aacgtggtcg	agtacgtgga	ctggattctg	gagaaaactc	aagcagtgtg	aatgggttcc	2220
caggggccat	tggagtccct	gaaggaccca	ggatttgctg	ggagagggtg	ttgagttcac	2280
tgtgccagca	tgcttcctcc	acagtaacac	gctgaagggg	cttggtgttt	gtaagaaaat	2340
gctagaagaa	aacaaactgt	cacaagttgt	tatgtccaaa	actcccgttc	tatgatcggt	2400
gtagtttggt	tgagcattca	gtctctttgt	ttttgatcac	gcttctatgg	agtccaagaa	2460
ttaccataag	gcaatatttc	tgaagattac	tatataggca	gatatagcag	aaaataacca	2520
agtagtgga	gtggggatca	ggcagaagaa	ctggtaaaag	aagccacat	aaatagattt	2580
gttcgatgaa	agatgaaaac	tgggaagaaag	gagaacaaag	acagtcttca	ccatttttgc	2640
ggaatctaca	ctctgcctat	gtgaacacat	ttcttttgta	aagaaagaaa	ttgattgcat	2700
ttaatggcag	attttcagaa	tagtcaggaa	ttcttgtcat	ttccatttta	aaatatatat	2760
taaaaaaaaat	cagttcgagt	agacacgagc	taagagtga	tgtgaagata	acagaatttc	2820
tgtgtggaag	aggattacaa	gcagcaattt	acctggaagt	gataccttag	gggcaatctt	2880
gaagatacac	tttctgaaa	aatgatttgt	gatggattgt	atatttat	aaaatatctt	2940
gggaggggag	gctgatggag	ataggagca	tgctcaaacc	tcctaagac	aagctgctgc	3000
tgtgactatg	ggctcccaaa	gagctagatc	gtatatttat	ttgacaaaaa	tcaccataga	3060
ctgcatccat	actacagaga	aaaaacaatt	agggcgcaaa	tggatagtta	cagtaaagtc	3120
ttcagcaagc	agctgcctgt	attctaagca	ctgggatttt	ctgtttcgtg	caaataattta	3180

tctcattatt gttgtgatct agttcaataa cctagaattt gaattgtcac cacatagctt 3240
tcaatctgtg ccaacaacta tacaattcat caagtgtg 3278
<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 3
Thr Ala Ala Met Ser
1 5
<210> 4
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 4
Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly
<210> 5
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 5
Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
<210> 6
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 6

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala

1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 7

Ser Gly Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 8

Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 9

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 9

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr 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 Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 10			
<211> 366			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"			
<400> 10			
cagggtgcaat tgctggaaaag cggcggtggc ctggtgcagc cgggtggcag cctgcgtctg		60	
agctgcgcgg cgtccggatt caccttttct actgctgcta tgtcttgggt gcgccaggcc		120	
ccgggcaaag gtctcgagtg ggtttccggt atctctggtt ctggttcttc tacctactat		180	
gcggatagcg tgaaaggccg cttaccatc agccgcgata attcgaaaaa caccctgtat		240	
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgaactg		300	
tcttacctgt actctgggta ctacttcgat tactggggcc aaggcaccct ggtgactgtt		360	
agctca		366	
<210> 11			
<211> 452			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 来源			
<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"			
<400> 11			
Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala			
	20	25	30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr 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
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp		
100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro		
115	120	125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr		
130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
165	170	175
Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr		
180	185	190
Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn		
195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser		
210	215	220
Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala		
225	230	235
Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu		
245	250	255
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu		
275	280	285
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr		
290	295	300
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn		
305	310	315
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro		
325	330	335
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln		
340	345	350
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val		
355	360	365

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 370 375 380
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 385 390 395 400
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 405 410 415
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 420 425 430
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 435 440 445
 Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 12

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 12

caggtgcaat tgctggaaag cggcgggtggc ctggtgcagc cgggtggcag cctgcgtctg	60
agctgcgcgg cgtccggatt caccttttct actgctgcta tgtcttgggt gcgccaggcc	120
ccgggcaaaag gtctcgagtg ggtttccggt atctctgggt ctggttcttc tacctactat	180
gcggatagcg tgaaaggccg ctttaccatc agccgcgata attcgaaaa caccctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgcg tgcggaagat acggccgtgt attattgcgc gcgtgaactg	300
tcttacctgt actctggtta ctacttcgat tactggggcc aaggcaccct ggtgactgtt	360
agctcagcct ccaccaaggg tccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc	420
tctgggggca cagcggccct gggtgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	480
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca cttccccggc tgtcctacag	540
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	600
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt	660
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagcagcg	720
gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctcccgg	780
acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagtgc	840
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	900
tacaacagca cgtaccgggt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggtgaat	960
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1020
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccgg	1080
gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc	1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200
cccgtgctgg actccgacgg ctctttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1260
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa 1356

<210> 13

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 13

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp Val Ser

1 5 10

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 14

Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 15

Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln Phe Asp Val Val

1 5 10

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 16

Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp

1 5

<210> 17

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 17

Lys Asn Tyr

1

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 18

Trp Asp Gln Arg Gln Phe Asp Val

1 5

<210> 19

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 19

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln

1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20 25 30

Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln
 85 90 95
 Phe Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105 110

<210> 20

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 20

gatatcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcgggtgcac cgggccagcg cgtgaccatt 60
 agctgtagcg gcagcagcag caacattgggt tctaacgacg tgtcttggtta ccagcagctg 120
 ccgggcacgg cgccgaaact gctgatctac aaaaactaca accgcccagag cggcgtgccg 180
 gatcgcttta gcggatccaa aagcggcacc agcggccagcc tggcgattac cggcctgcaa 240
 gcagaagacg aagcggatta ttactgctct gcttgggacc agcgtcagtt cgacgttggtg 300
 tttggcggcg gcacgaagtt aaccgtccta 330

<210> 21

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 21

Asp Ile Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30
 Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln

65	70	75	80
Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln			
	85	90	95
Phe Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	110
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu			
	115	120	125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr			
	130	135	140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys			
145	150	155	160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr			
	165	170	175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His			
	180	185	190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys			
	195	200	205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
	210	215	

<210> 22

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 22

gatatcgtgc tgaccagcc gccgagcgtg agcgggtgcac cgggccagcg cgtgaccatt	60
agctgtagcg gcagcagcag caacattggt tctaacgacg tgtcttggtta ccagcagctg	120
ccgggacacg cgccgaaact gctgatctac aaaaactaca accgcccagag cggcgtgccg	180
gacgccttta gcggatccaa aagcggcacc agcggccagcc tggcgattac cggcctgcaa	240
gcagaagacg aagcggatta ttactgctct gcttgggacc agcgtcagtt cgacgttggtg	300
tttggcggcg gcacgaagtt aaccgtccta ggtagccca aggctgcccc ctcggtcact	360
ctgttccgc cctcctctga ggagcttcaa gccacaagg ccacactggt gtgtctcata	420
agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag	480
gcgggagtg agaccaccac accctccaaa caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc	540
tatctgagcc tgacgcctga gcagtggaag tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg	600
catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg gccctacag aatgttca	648

<210> 23

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 23

Thr Ala Ala Met Ser

1 5

<210> 24

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 24

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 25

Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala

1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 27

Ser Gly Ser Gly Ser Ser

1 5

<210> 28

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 28

Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 29

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 29

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala

20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr 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 Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 30

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 30

caggtgcagc tgctggaatc aggcggcgga ctggtgcagc ctggcggtag cctgagactg	60
agctgcgctg ctagtggtt cacctttagc accgccgcta tgagctgggt tcgacaggcc	120
ccagggaag gcctcgagt ggtctcagg attagcgta gcggctctag cacctactac	180
gccgatagcg tgaagggcc gttcactatc tctaggata actctaagaa caccctgtac	240
ctgcagatga atagcctgag agccgaggac accgccgtct actactgcgc tagagagctg	300
agctacctgt atagcggcta ctacttcgac tactggggtc aaggcaccct ggtcaccgtg	360
tctagc	366

<210> 31

<211> 452

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 31

Gln Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
1 5 10 15	
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala	
20 25 30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val	
35 40 45	
Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr 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	Leu	Ser	Tyr	Leu	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	
				100					105					110		
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
				115					120					125		
Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
				130					135					140		
Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
				145					150					155		
Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165					170					175		
Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
				180					185					190		
Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
				195					200					205		
His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
				210					215					220		
Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
				225					230					235		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
				245					250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Ala	Val	Ser	
				260					265					270		
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
				275					280					285		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
				290					295					300		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
				305					310					315		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Ala	Ala	Pro	
				325					330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340					345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
				355					360					365		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
				370					375					380		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	

385	390	395	400
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr			
	405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val			
	420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu			
	435	440	445
Ser Pro Gly Lys			
450			

<210> 32

<211> 1356

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 32

cagggtgcagc	tgctggaatc	aggcggcgga	ctggtgcagc	ctggcggtag	cctgagactg	60
agctgcgctg	ctagtggcct	cacctttagc	accgccgcta	tgagctgggt	tcgacaggcc	120
ccagggaag	gcctcgagt	ggtctcagg	attagcggt	gcggctctag	cacctactac	180
gccgatagcg	tgaaggccg	gttactatc	tctaggata	actctaagaa	cacctgtac	240
ctgcagatga	atagcctgag	agccgaggac	accgccgtct	actactgcgc	tagagagctg	300
agctacctgt	atagcggcta	ctacttcgac	tactggggtc	aaggcaccct	ggtcaccgtg	360
tctagcgcta	gcactaagg	cccctccgt	ttccctctgg	ccccttccag	caagtctacc	420
tccggcgcca	cagctgctct	gggctgcctg	gtcaaggact	acttccctga	gcctgtgaca	480
gtgtcctgga	actctggcgc	cctgacctct	ggcgtgcaca	ccttccctgc	cgtgctgcag	540
tcctccggcc	tgtactccct	gtcctccgtg	gtcacagtgc	cttcaagcag	cctgggcacc	600
cagacctata	tctgcaacgt	gaaccacaag	ccttccaaca	ccaaggtgga	caagcgggtg	660
gagcctaagt	cctgcgacaa	gacccacacc	tgtctccct	gccctgctcc	tgaactgctg	720
ggcgccctt	ctgtgttct	gttccctcca	aagcccaagg	acacctgat	gatctcccg	780
accctgaag	tgacctgcgt	ggtggtggcc	gtgtcccacg	aggatcctga	agtgaagttc	840
aattggtacg	tggacggcgt	ggaggtgcac	aacgccaaga	ccaagcctcg	ggaggaacag	900
tacaactcca	cctaccgggt	ggtgtccgtg	ctgacctgc	tgcaccagga	ctggctgaac	960
ggcaaagagt	acaagtgcaa	agtctccaac	aaggccctgg	ccgcccctat	cgaaaagaca	1020
atctccaagg	ccaaggcca	gcctagggaa	ccccaggtgt	acacctgcc	accagccgg	1080
gaggaaatga	ccaagaacca	ggtgtccctg	acctgtctgg	tcaagggtt	ctacccttcc	1140
gatatcgccg	tggagtggga	gtctaacggc	cagcctgaga	acaactacaa	gaccaccct	1200
cctgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctgtactcca	aactgaccgt	ggacaagtcc	1260
cggtggcagc	agggaacgt	gttctcctgc	tccgtgatgc	acgaggccct	gcacaaccac	1320

tacacccaga agtccctgtc cctgtctccc ggcaag 1356

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 33

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp Val Ser

1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 34

Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 35

Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln Phe Asp Val Val

1 5 10

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 36

Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp

1 5

<210> 37

<211> 3

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 37

Lys Asn Tyr

1

<210> 38

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 38

Trp Asp Gln Arg Gln Phe Asp Val

1

5

<210> 39

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 39

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln

1

5

10

15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn

20

25

30

Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

35

40

45

Ile Tyr Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln

65	70	75	80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln			
	85	90	95
Phe Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
	100	105	110

<210> 40

<211> 330

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 40

cagtcagtcc tgactcagcc ccctagcgct agtggcaccc ctggtcaaag agtgactatt	60
agctgtagcg gctctagctc taatatcggc tctaacgacg tcagctggta tcagcagctg	120
cccggcacccg cccctaagct gctgatctat aagaactata ataggcctag cggcgtgccc	180
gataggttta gcggatctaa atcagggact tctgctagtc tggctattag cggcctgcag	240
tcagaggacg aggccgacta ctactgtagc gcctgggatc agcgtcagtt cgacgtgggtg	300
ttcggcggag gcactaagct gaccgtgctg	330

<210> 41

<211> 216

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 41

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln	
1	5 10 15
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn	
	20 25 30
Asp Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu	
	35 40 45
Ile Tyr Lys Asn Tyr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser	
	50 55 60
Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln	
65	70 75 80
Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Gln Arg Gln	
	85 90 95

Phe Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln	
100	105 110
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu	
115	120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr	
130	135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys	
145	150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr	
	165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His	
	180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys	
	195 200 205
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
210	215

<210> 42

<211> 648

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多核苷酸"

<400> 42

cagtcagtc tgactcagcc ccctagcgct agtggcaccc ctggtcaaag agtgactatt	60
agctgtagcg gctctagctc taatatcggc tctaacgacg tcagctggta tcagcagctg	120
cccggcacccg cccctaagct gctgatctat aagaactata ataggcctag cggcggtgccc	180
gataggttta gcggtatctaa atcagggact tctgctagtc tggctattag cggcctgcag	240
tcagaggacg aggccgacta ctactgtagc gcctgggacg agcgtcagtt cgacgtggtg	300
ttcggcggag gactaagct gaccgtgctg ggtcaaccta aggctgcccc cagcgtgacc	360
ctgttcccc ccagcagcga ggagctgcag gccacaagg ccaccctggt gtgcctgac	420
agcgacttct acccaggcgc cgtgaccgtg gcctggaagg ccgacagcag ccccgtaag	480
gccggcgtgg agaccaccac cccagcaag cagagcaaca acaagtacgc cgccagcagc	540
tacctgagcc tgacccccga gcagtgggaag agccacaggt cctacagctg ccaggtgacc	600
cacgagggca gcaccgtgga aaagaccgtg gcccacaccg agtgcagc	648

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 43

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Ala

1 5

<210> 44

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 44

Ile Ser Gly Ser Gly Ser Ser Thr

1 5

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 45

Ala Arg Glu Leu Ser Tyr Leu Tyr Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 46

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"

<400> 46

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Ala Ala Met Ser

1 5 10

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 47
Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Asp
1 5
<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的6xHis标记"
<400> 48
His His His His His His
1 5
<210> 49
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的肽"
<400> 49
Met Gly Ser Ser
1
<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述：合成的 8xHis标记"
<400> 50
His His His His His His His
1 5
<210> 51
<211> 238

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成的多肽"

<400> 51

Ile Val Gly Gly Thr Ala Ser Val Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln Val

1 5 10 15

Thr Leu His Thr Thr Ser Pro Thr Gln Arg His Leu Cys Gly Gly Ser

20 25 30

Ile Ile Gly Asn Gln Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Tyr Gly

35 40 45

Val Glu Ser Pro Lys Ile Leu Arg Val Tyr Ser Gly Ile Leu Asn Gln

50 55 60

Ser Glu Ile Lys Glu Asp Thr Ser Phe Phe Gly Val Gln Glu Ile Ile

65 70 75 80

Ile His Asp Gln Tyr Lys Met Ala Glu Ser Gly Tyr Asp Ile Ala Leu

85 90 95

Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln Arg Pro Ile

100 105 110

Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr Asp Cys Trp

115 120 125

Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile Gln Asn Thr

130 135 140

Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu Cys Gln Lys

145 150 155 160

Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys Ala Gly Tyr

165 170 175

Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu

180 185 190

Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile Thr Ser Trp

195 200 205

Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn Val

210 215 220

Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala Val

225 230 235

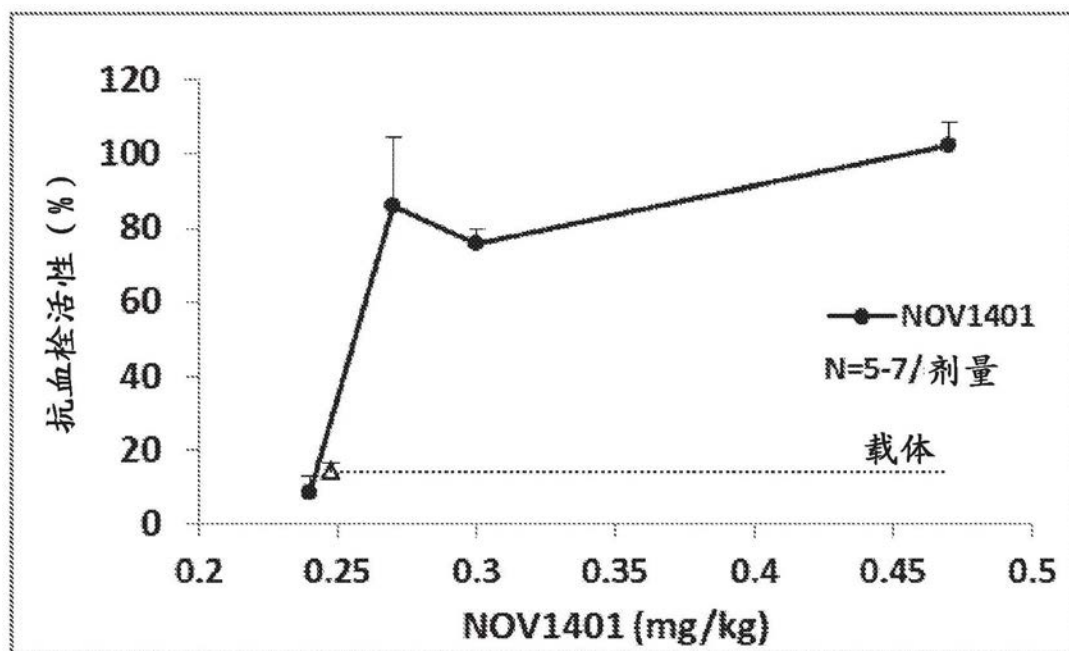


图1A

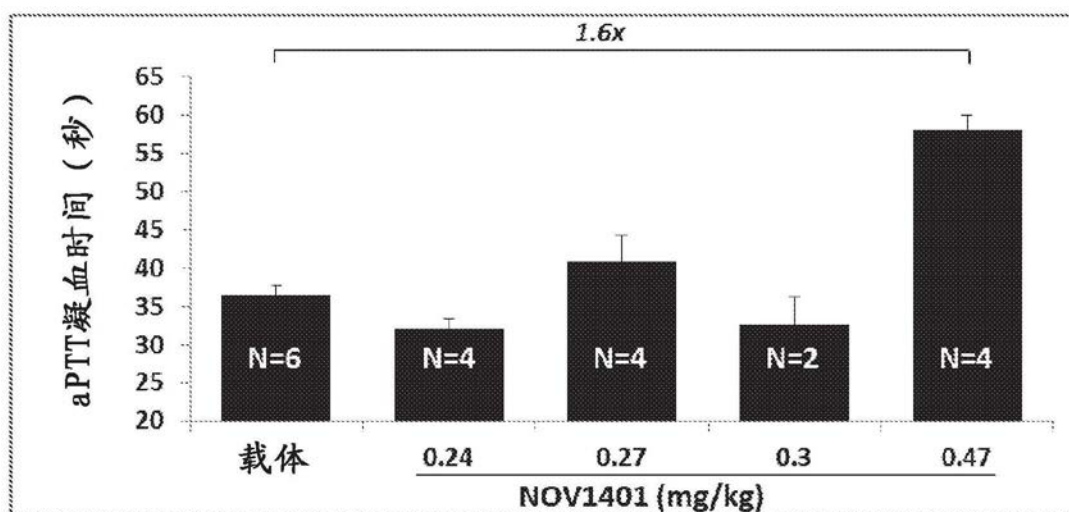


图1B

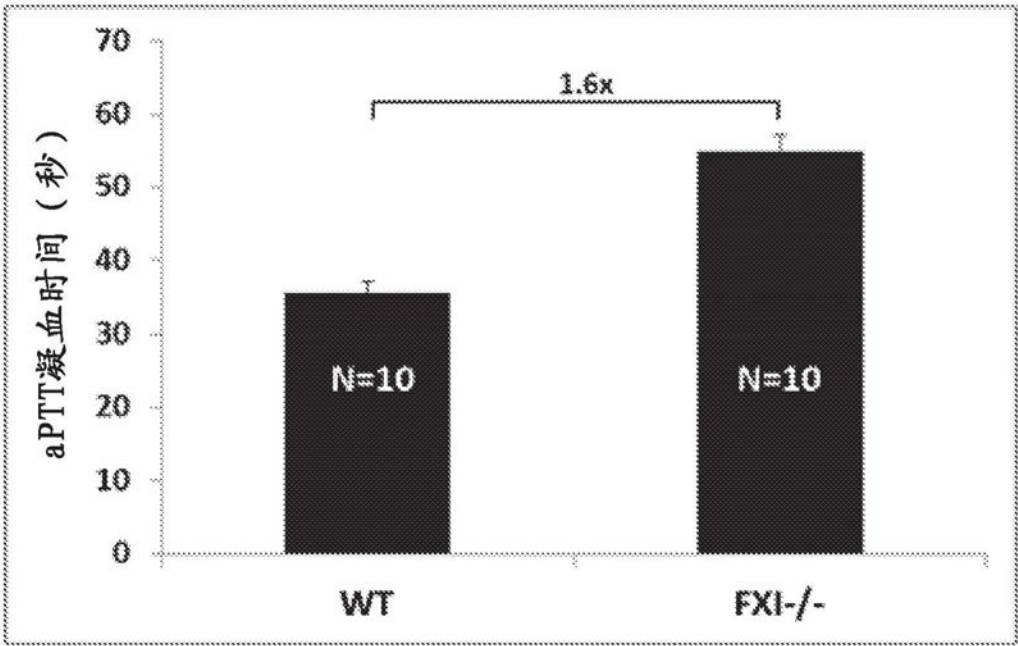


图1C

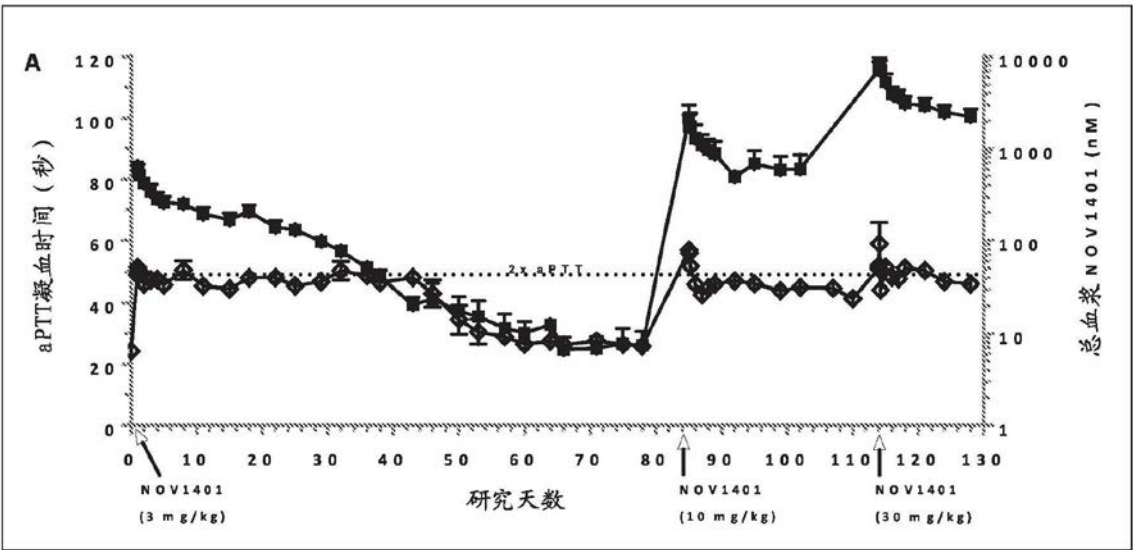


图2A

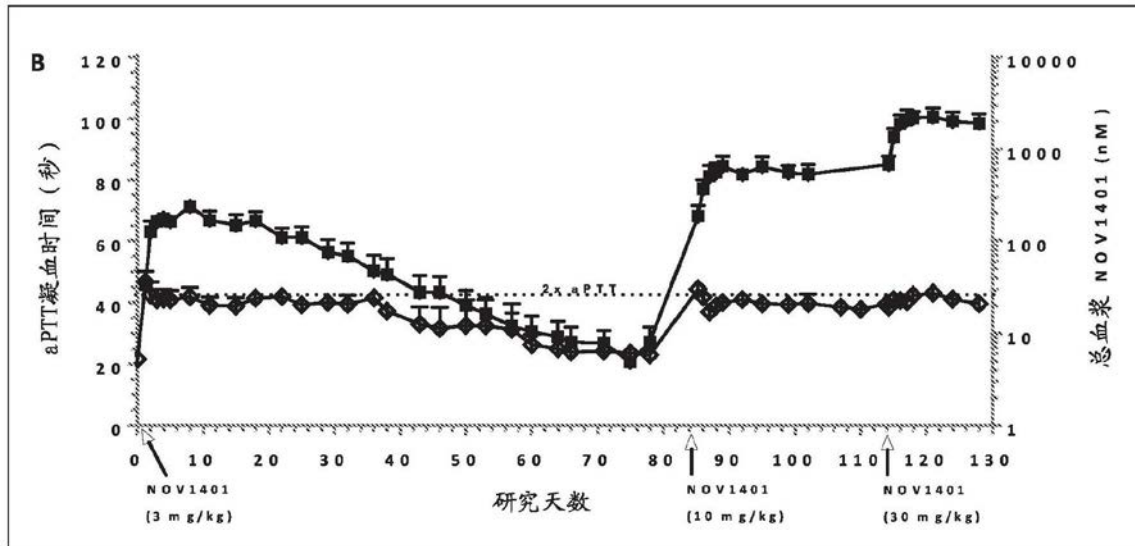


图2B

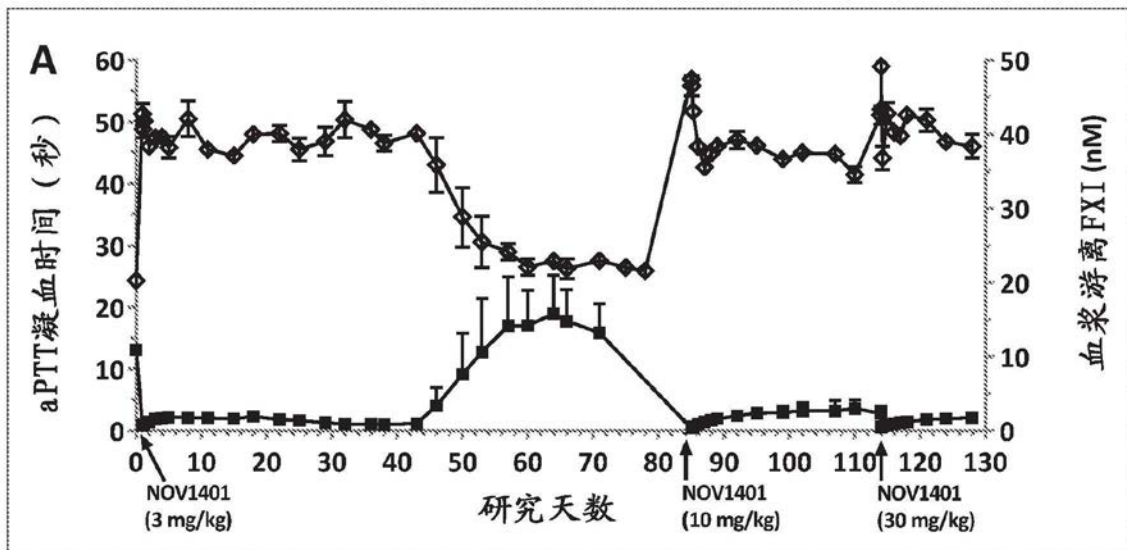


图3A

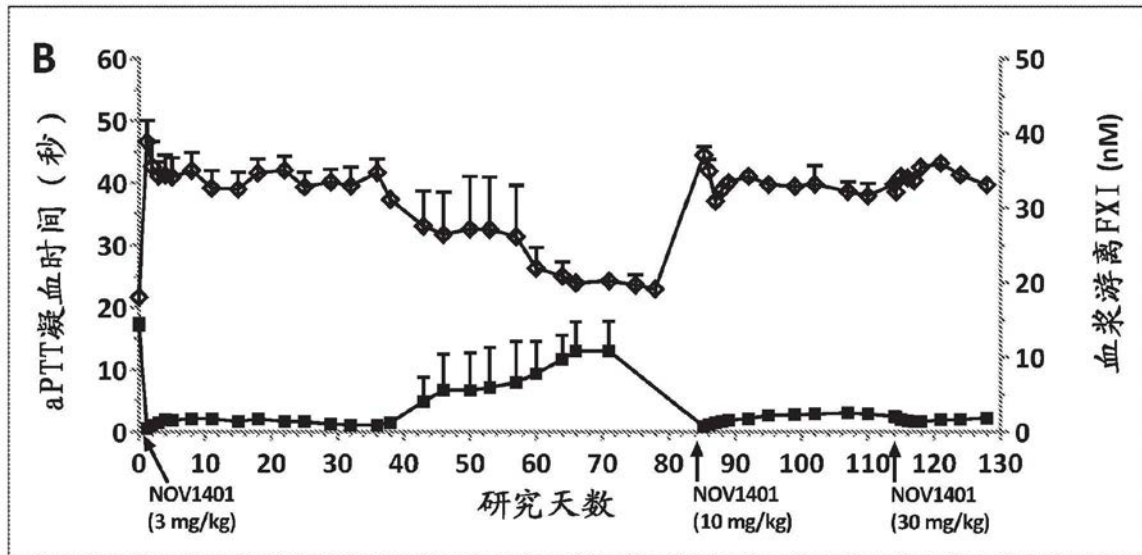


图3B

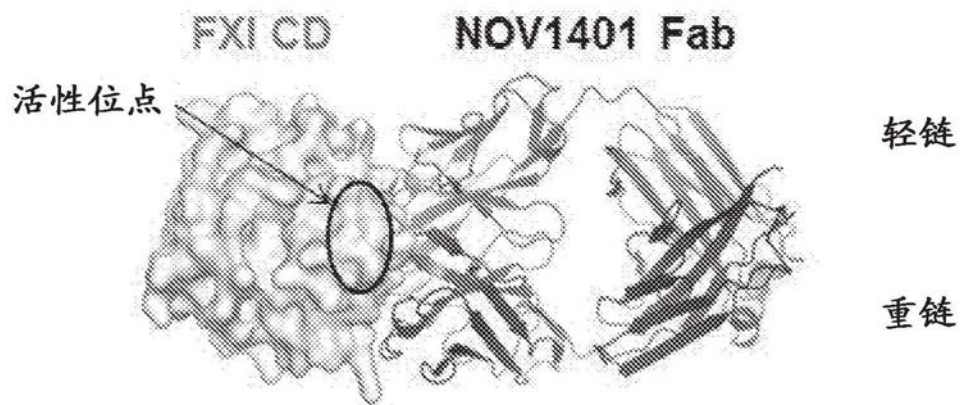


图4A

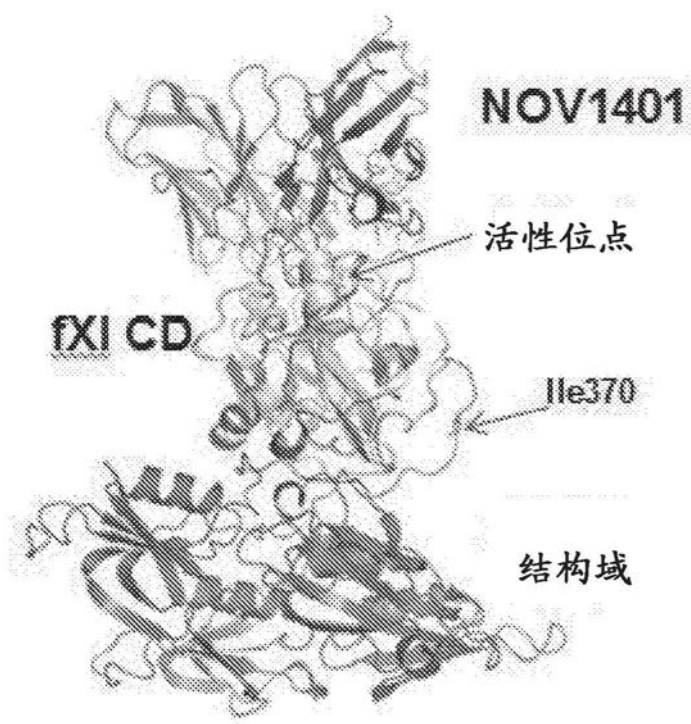


图4B

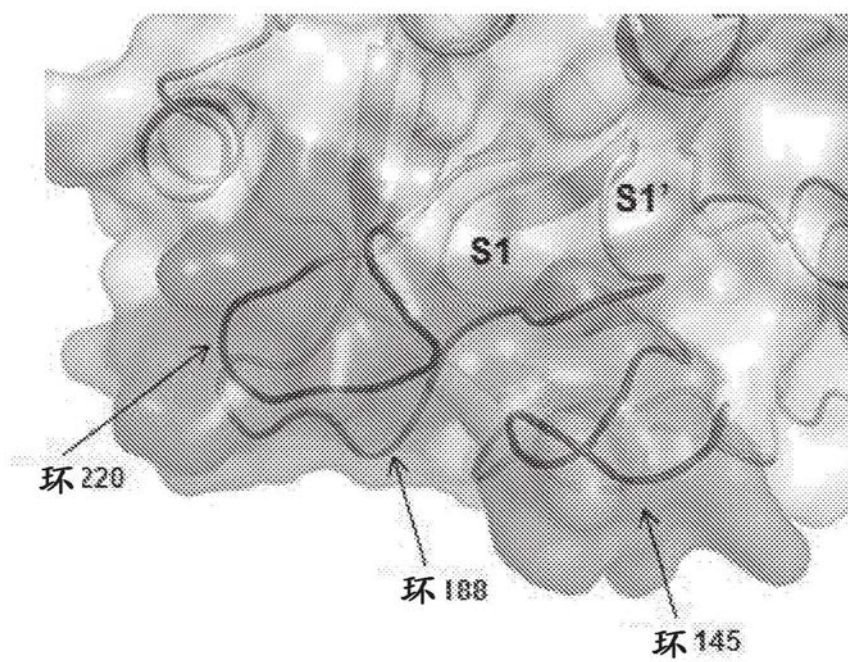


图5A

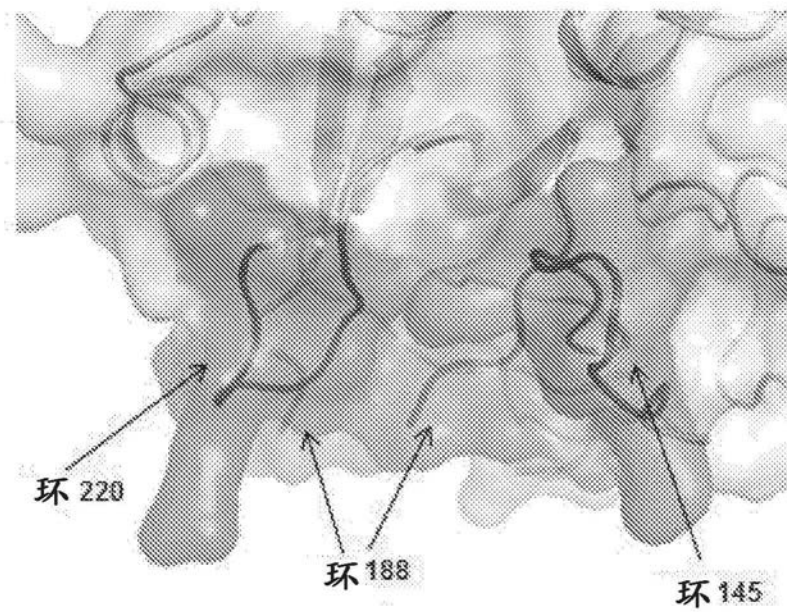


图5B

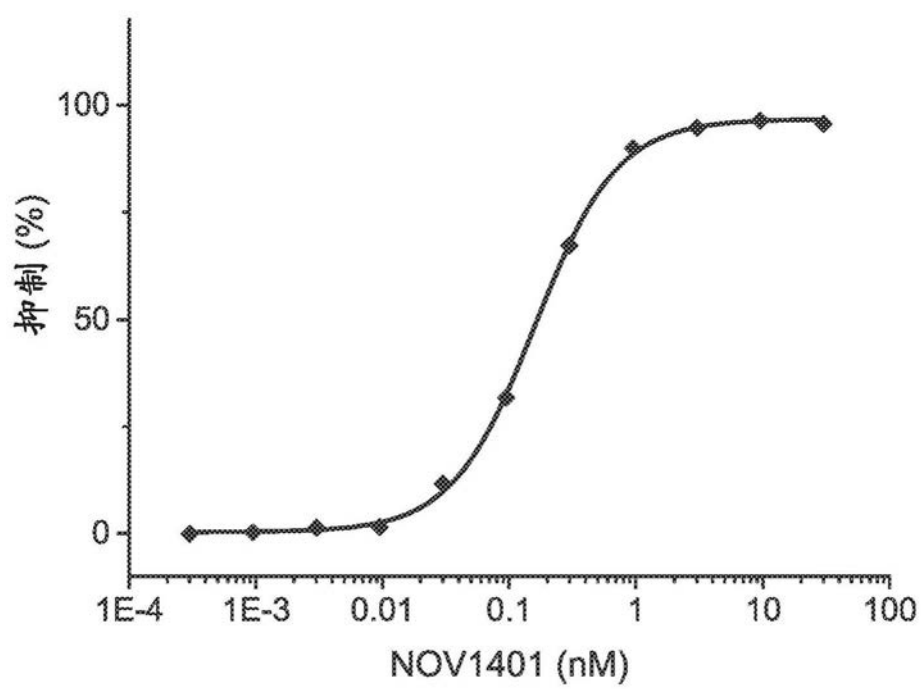


图6A

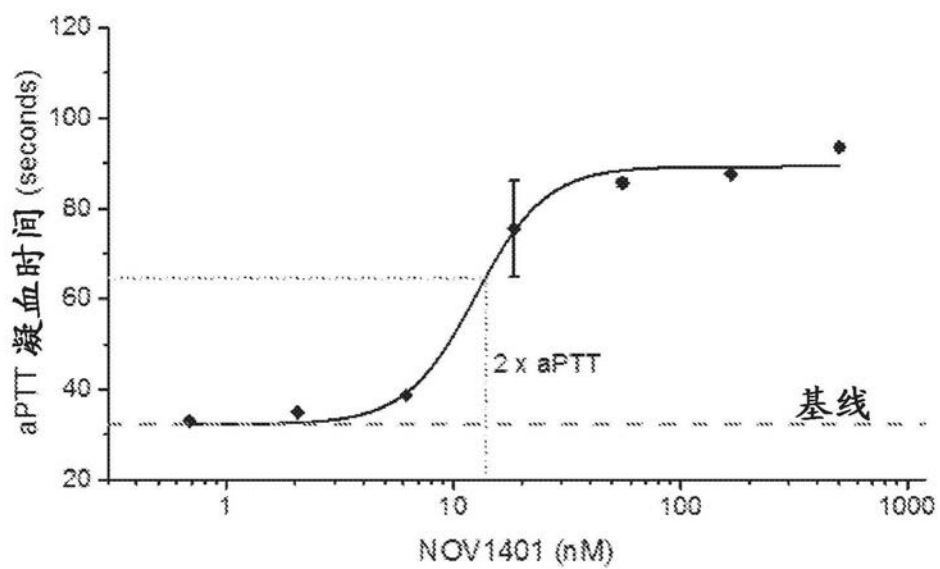


图6B

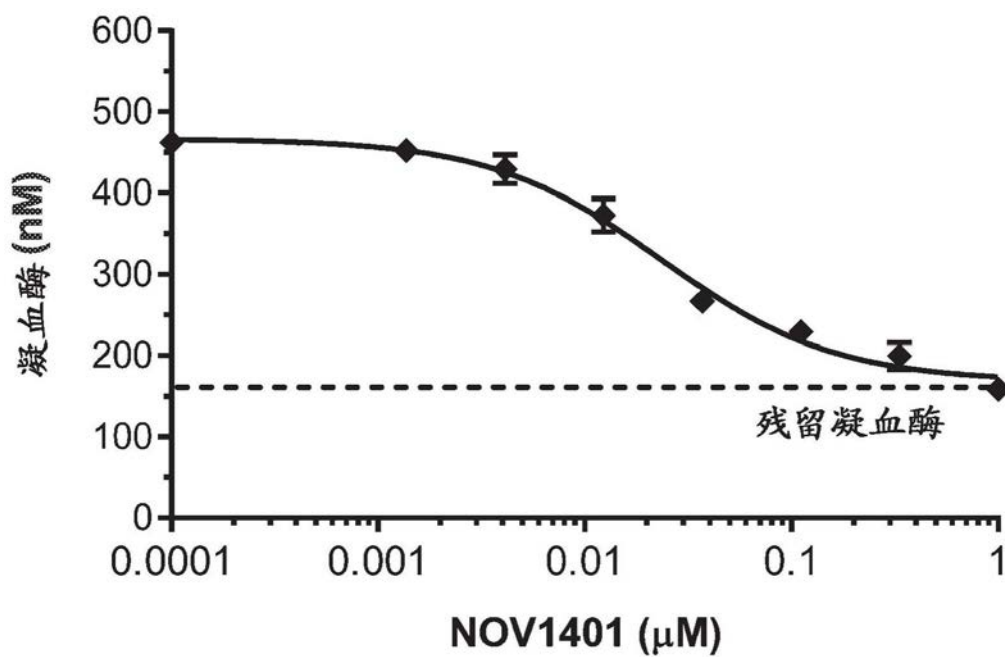


图6C

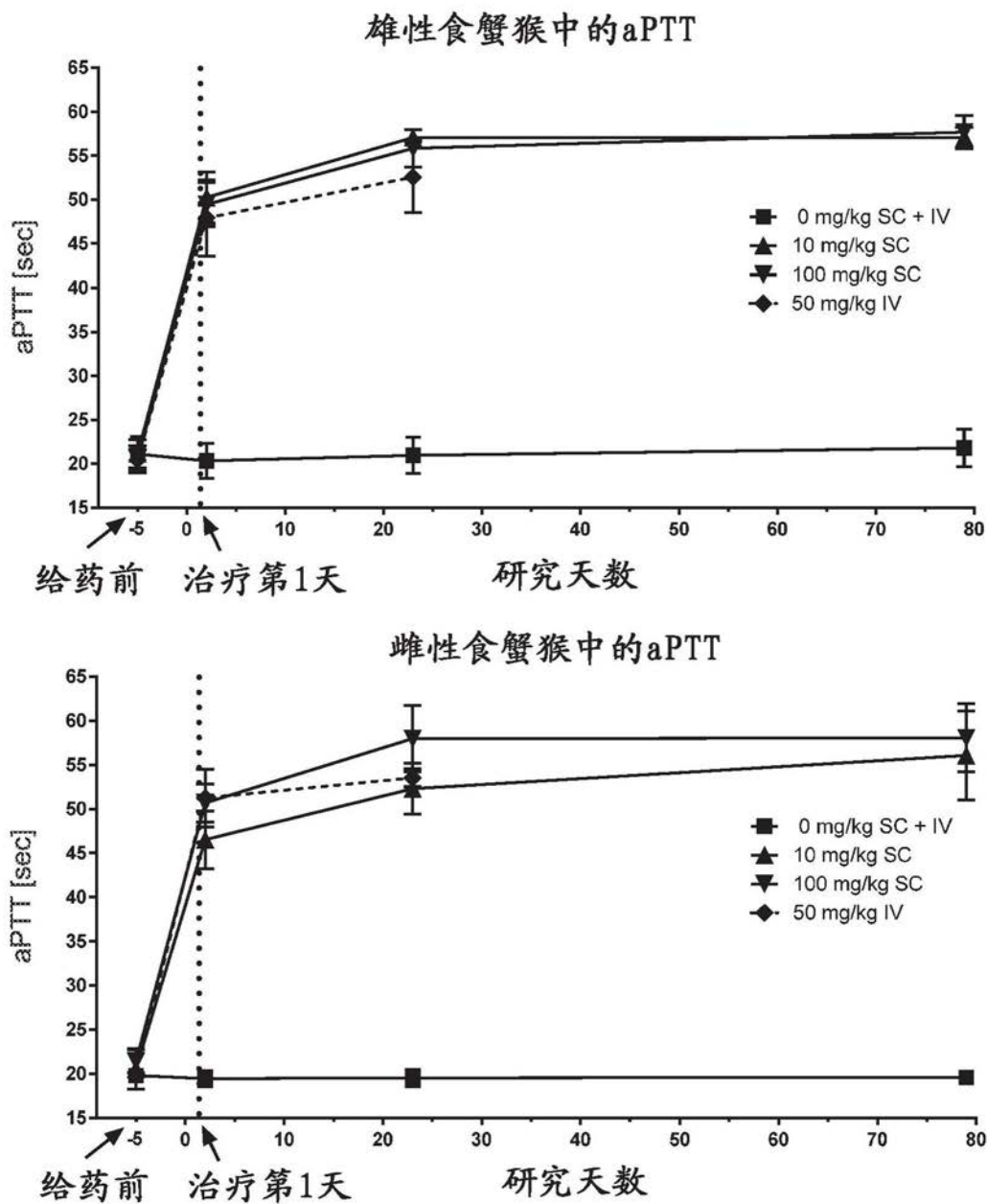


图7A

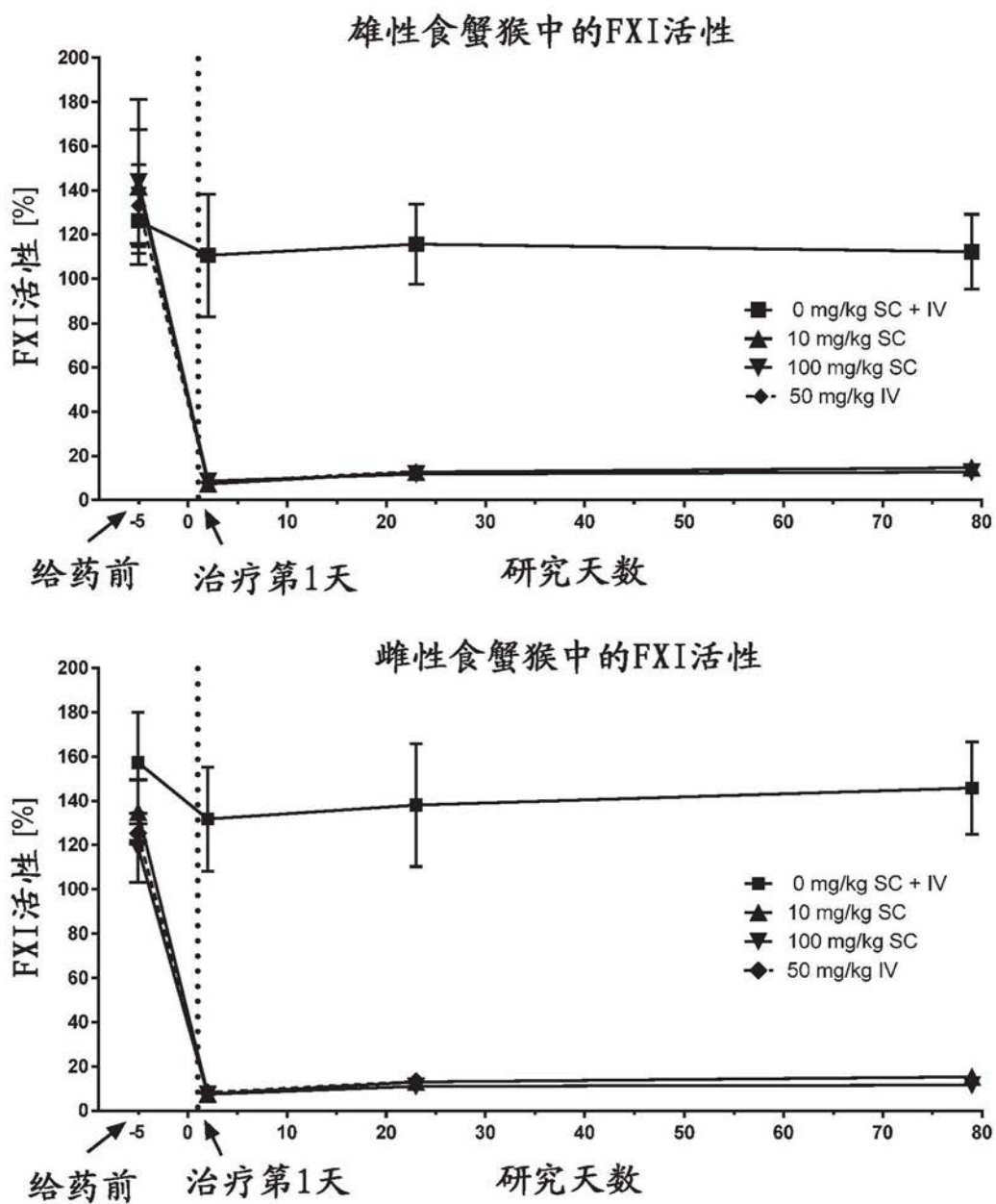


图7B