



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101932606 A

(43) 申请公布日 2010.12.29

(21) 申请号 200980102891.9

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009.01.22

*C07K 16/36* (2006.01)

(30) 优先权数据

*C12N 15/13* (2006.01)

61/023,025 2008.01.23 US

*A61K 39/395* (2006.01)

61/044,787 2008.04.14 US

*A61P 7/02* (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.07.23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2009/000124 2009.01.22

(87) PCT申请的公布数据

W02009/093138 EN 2009.07.30

(71) 申请人 格兰马克药品股份有限公司

地址 拉绍德封

(72) 发明人 E·拉扎里德斯 C·伍兹 X·范

S·侯 H·莫特爾 S·布莱恩

M·博特施格尔

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

权利要求书 7 页 说明书 78 页 序列表 101 页

附图 10 页

(54) 发明名称

对冯维勒布兰德氏因子特异的人源化抗体

(57) 摘要

本发明是关于具有冯维勒布兰德氏因子特异性的人源化抗体或其结合片段、其制备及用途,包含 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法。

1. 一种具有冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含:
  - (a) 如 SEQ ID NO:19 中所述的重链可变区序列; 及
  - (b) 如 SEQ ID NO:28 中所述的轻链可变区序列。
2. 一种具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 该人源化抗体包含:
  - (a) 如 SEQ ID NO:237 中所述的重链可变区序列; 及
  - (b) 如 SEQ ID NO:238 中所述的轻链可变区序列。
3. 一种具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 该人源化抗体包含:
  - (a) 重链及轻链互补决定区 (CDR), 其对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 的重链及轻链可变区 (分别为 SEQ ID NO:1 及 2) 中的 CDR; 以及
  - (b) 重链框架区和 / 或轻链框架区, 前者对应于存在于人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO:4) 的可变区中的框架区, 后者对应于存在于人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO:6) 的可变区中的框架区。
4. 一种具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 该人源化抗体包含:

选自于以下重链 CDR 其中一种或多种: HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO:7), HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO:8), 及 HCDR 3:DPADYGN DYALDY (SEQ ID NO:9); 和 / 或

选自于以下轻链 CDR 其中一种或多种: LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10), LCDR2:YTSSLHS (SEQ ID NO:11), 及 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)。
5. 一种具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 该人源化抗体包含:

重链 CDR:HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO:7), HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO:8), 及 HCDR3:DPADYGN DYALDY (SEQ IDNO:9); 和 / 或

轻链 CDR:LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10), LCDR2:YTSSLHS (SEQID NO:11), 及 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)。
6. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段, 还包含: 来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO:4) 的重链框架区; 和 / 或来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO:6) 的轻链框架区。
7. 权利要求第 6 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该重链框架区还包含一个或多个鼠类残基。
8. 权利要求第 6 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。
9. 权利要求第 6 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基。
10. 权利要求第 6 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。
11. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体包含选自以下的重链可变区: H2 (SEQ ID NO:13), H4 (SEQ ID NO:14), H5 (SEQ ID NO:15), H6 (SEQ ID NO:16), H7 (SEQ ID NO:17), H8 (SEQID NO:18), H9 (SEQ ID NO:19), H12 (SEQ ID NO:20), H13 (SEQ ID NO:21), H14 (SEQ ID NO:22), H15 (SEQ ID NO:145), 或 H16 (SEQ ID NO:146)。
12. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体包含选自以下的轻链可变区: L5 (SEQ ID NO:23), L4 (SEQ ID NO:24), L6 (SEQ ID NO:25), L7 (SEQ ID NO:

26), L8(SEQ ID NO :27), L9(SEQ ID NO :28), L10(SEQ ID NO :29), 或 L11(SEQ ID NO :30)。

13. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体包含:

选自以下的重链可变区: H2(SEQ ID NO :13), H4(SEQ ID NO :14), H5(SEQ ID NO :15), H6(SEQ ID NO :16), H7(SEQ ID NO :17), H8(SEQ ID NO :18), H9(SEQ ID NO :19), H12(SEQ ID NO :20), H13(SEQ ID NO :21), H14(SEQ ID NO :22), H15(SEQ ID NO :145), 或 H16(SEQ ID NO :146); 以及

选自以下的轻链可变区: L5(SEQ ID NO :23), L4(SEQ ID NO :24), L6(SEQ ID NO :25), L7(SEQ ID NO :26), L8(SEQ ID NO :27), L9(SEQ ID NO :28), L10(SEQ ID NO :29), 或 L11(SEQ ID NO :30)。

14. 权利要求第 5 项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体包含: 重链可变区序列, 其含有至少 80% 与 SEQ ID NO :19 的框架区相同的框架区; 和 / 或轻链可变区序列, 其含有至少 80% 与 SEQ ID NO :28 的框架区相同的框架区。

15. 权利要求第 5 项的人源化抗体或其结合片段, 还包含:

对应于人类抗体家族 VH4 中的框架区的重链框架区; 以及  
对应于人类抗体家族 VK1 中的框架区的轻链框架区。

16. 权利要求第 5 项的人源化抗体或其结合片段, 还包含:

对应于人类抗体重链种系序列 4-59 中的框架区的重链框架区 1、2 和 3, 其中重链框架区 1 为 QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVS(SEQ ID NO :171), 重链框架区 2 为 WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :172), 且重链框架区 3 为 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO :173); 以及

对应于存在于人类抗体轻链种系序列 018 中的框架区的轻链框架区 1、2 和 3, 其中轻链框架区 1 为 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :186), 轻链框架区 2 为 WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO :187), 且轻链框架区 3 为 GVPSRFGSGSGTDFFTISSLPEDIATY YC(SEQ ID NO :188)。

17. 权利要求第 5 项的人源化抗体或其结合片段, 还包含:

对应于人类抗体重链种系序列 4-34 中的框架区的重链框架区 1、2 和 3, 其中重链框架区 1 为 QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVY(SEQ ID NO :165), 重链框架区 2 为 WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :166), 且重链框架区 3 为 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO :167); 以及

对应于存在于人类抗体轻链种系序列 018 中的框架区的轻链框架区 1、2 和 3, 其中轻链框架区 1 为 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :186), 轻链框架区 2 为 WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO :187), 且轻链框架区 3 为 GVPSRFGSGSGTDFFTISSLPEDIATY YC(SEQ ID NO :188)。

18. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体以 10nM 或更小的亲和力 (Kd) 结合至 vWF。

19. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体用 100nM 或更小的亲和力 (Ki) 竞争结合至 vWF。

20. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体用 10nM 或更小的亲和力 (Kd) 结合至 vWF 的 A1 结构域。

21. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体用 100nM 或更小的亲和力 (Ki) 竞争结合至 vWF 的 A1 结构域。

22. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体具有大于 65°C 的 FAB 片段热稳定性温度。

23. 权利要求第 1-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体具有高于亲本非人源化抗体的 FAB 片段热稳定性温度。

24. 一种具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体包含:

重链 CDR1, 为 GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7);重链 CDR2, 为 MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8);重链 CDR 3, 为 DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9);轻链 CDR1 ;轻链 CDR2 ;及轻链 CDR3, 为 QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12), 条件为轻链 CDR1 非 SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10) 和 / 或轻链 CDR2 非 YTSSLHS (SEQ ID NO :11)。

25. 权利要求第 24 项的人源化抗体或其结合片段,还包含人类抗体重链框架区和 / 或人类抗体轻链框架区。

26. 权利要求第 25 项的人源化抗体或其结合片段,其中该重链框架区对应于存在于 4-59 衍生人类抗体中的重链框架区。

27. 权利要求第 26 项的人源化抗体或其结合片段,其中存在于 4-59 衍生人类抗体中的该重链框架区还包含一个或多个鼠类残基。

28. 权利要求第 26 项的人源化抗体或其结合片段,其中存在于 4-59 衍生人类抗体中的该重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

29. 权利要求第 25 项的人源化抗体或其结合片段,其中该轻链框架区对应于存在于 018 衍生人类抗体中的轻链框架区。

30. 权利要求第 29 项的人源化抗体或其结合片段,其中存在于 018 衍生人类抗体中的该轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基。

31. 权利要求第 29 项的人源化抗体或其结合片段,其中存在于 018 衍生人类抗体中的该轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

32. 权利要求第 26 项的人源化抗体或其结合片段,其中该 4-59 衍生人类抗体为 AAC18165.1。

33. 权利要求第 29 项的人源化抗体或其结合片段,其中该 018 衍生人类抗体为 AAK94808。

34. 权利要求第 24 项的人源化抗体或其结合片段,其中 LCDR1 和 / 或 LCDR2 是来自于人类抗体。

35. 权利要求第 34 项的人源化抗体或其结合片段,其中 LCDR2 为 DASNLET (SEQ ID NO : 118)。

36. 权利要求第 1-17 及 24 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中 HCDR1 包含一个或多个选自 F27G, L29I, T30S 及 V34W 的氨基酸取代。

37. 权利要求第 1-17 及 24 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中 HCDR2 包含一个或多个选自 S61P 及 A62S 的氨基酸取代。

38. 权利要求第 1-17 及 24 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中 LCDR1 包含一个或多个选自 S24Q, N30S 及 K31N 的氨基酸取代。

39. 权利要求第 1-17 及 24 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中 HCDR1 包含一个或多个选自 F27G, L29I, T30S 及 V34W 的氨基酸取代, HCDR2 包含一个或多个选自 S61P 及 A62S 的氨基酸取代,且 LCDR1 包含一个或多个选自 S24Q, N30S 及 K31N 的氨基酸取代。

40. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段,还包含来自人类抗体的重链框架区,其中该人类重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

41. 权利要求第 4 或 5 项的人源化抗体或其结合片段,还包含来自人类抗体的轻链框架区,其中该人类轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

42. 权利要求第 15-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

43. 权利要求第 15-17 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

44. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体保留与亲本非人源化抗体、或包含来自亲本非人源化抗体的可变区及人类 Fc 区的嵌合体相同的活性。

45. 权利要求第 44 项的人源化抗体或其结合片段,其中该活性用瑞斯特霉素诱导血小板凝集活性加以测量。

46. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体缺乏效应子功能。

47. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体包含源自于 IgG4 的 Fc 区。

48. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该人源化抗体具有对人类 vWF 的 A1 结构域的特异性。

49. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体,其中该人源化抗体为全长抗体。

50. 权利要求第 1-43 项中任一项的结合片段,其中该结合片段为选自 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> 及双链抗体的抗体片段。

51. 权利要求第 50 项的结合片段,其中该抗体片段不为 Fab。

52. 一种分离核酸,编码权利要求第 1-43 项中任一项的抗体或其结合片段。

53. 一种分离核酸,其包含载体 GS264 的编码轻链的核酸序列,该载体 GS264 在 DSMZ 储藏于微生物中,其登记号为 DSM 21059。

54. 一种分离核酸,其包含载体 GS265 的编码重链的核酸序列,该载体 GS265 在 DSMZ 储藏于微生物中,其登记号为 DSM 21060。

55. 一种分离核酸,编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO:19 中所述的重链可变区序列及如 SEQ ID NO:28 中所述的轻链可变区序列。

56. 一种分离核酸,编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO:237 中所述的重链序列及如 SEQ ID NO:238 中所述的轻链序列。

57. 一种载体,其包含权利要求第 52-56 项中任一项的分离核酸。

58. 一种宿主细胞,其包含权利要求第 52-56 项中任一项的分离核酸或权利要求第 57

项的载体。

59. 一种人源化抗体或其结合片段的产生方法,包含:培养权利要求第 58 项的宿主细胞,使得核酸被表达并产生抗体。

60. 权利要求第 59 项的方法,还包含从宿主细胞培养物回收该抗体。

61. 权利要求第 59 项的方法,其中该抗体是回收自宿主细胞培养基。

62. 权利要求第 59 项的方法,其中,于该培养步骤之前,该宿主细胞用包含编码重链可变区的核酸的载体及包含编码轻链可变区的核酸的载体共转染。

63. 一种组合物,包含:权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段、及可药用的载体。

64. 一种组合物,包含:权利要求第 1-43 项中任一项的第一人源化抗体或其结合片段、及结合至 vWF 的 A1 结构域的第二抗体。

65. 权利要求第 64 项的组合物,其中该第二抗体为 AJW200。

66. 一种受试者中的 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法,该方法包含施用给该受试者治疗有效量的权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或结合片段。

67. 权利要求第 66 项的方法,其中该受试者为人类。

68. 权利要求第 66 项的方法,其中该 vWF 介导的疾病为血栓性疾病或紊乱

69. 权利要求第 68 项的方法,其中该血栓性疾病或紊乱为心血管疾病或脑血管疾病如缺血性卒中。

70. 权利要求第 69 项的方法,其中该心血管疾病为动脉粥样硬化症、再狭窄、心绞痛、急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合症、或与糖尿病相关联的心血管疾病。

71. 权利要求第 68 项的方法,其中该血栓性疾病或紊乱为血管发炎、静脉血栓、镰刀形细胞病、异种移植排斥、外周血管病、血栓性血小板减少性紫癜症、囊性纤维化、血管性痴呆、雷诺病、类风湿性关节炎、或糖尿病。

72. 权利要求第 69 项的方法,其中该脑血管疾病为血管性痴呆、缺血性卒中、或再发性中风。

73. 权利要求第 66-72 项中任一项的方法,其中该治疗有效量从约 0.001 至约 100mg/kg。

74. 权利要求第 73 项的方法,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 20mg/kg。

75. 权利要求第 73 项的方法,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 10mg/kg。

76. 权利要求第 66-75 项中任一项的方法,其中是将单一或多次小剂量的该治疗有效量的该人源化抗体或其结合片段施用给受试者。

77. 权利要求第 66-75 项中任一项的方法,其中该治疗有效量足以抑制血小板凝集,但不足以引发明显的临床出血迹象。

78. 权利要求第 66-72 项中任一项的方法,其中该治疗有效量从 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍,而不致引发明显的临床出血迹象。

79. 一种权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段作为药物的用途,包含以治疗有效量施用该人源化抗体或其结合片段。

80. 一种权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段的用途,其是用于制备 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗药物,包含以治疗有效量施用该人源化抗体或其结合片

段。

81. 权利要求第 79 项的用途,其中该药物被用来治疗 vWF 介导的疾病或紊乱。

82. 权利要求第 80 或 81 项的用途,其中该 vWF 介导的疾病或紊乱为血栓性疾病或紊乱。

83. 权利要求第 82 项的用途,其中该血栓性疾病为心血管疾病或脑血管疾病如缺血性卒中。

84. 权利要求第 83 项的用途,其中该心血管疾病为动脉粥样硬化症、再狭窄、心绞痛、急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合症、或与糖尿病相关联的心血管疾病。

85. 权利要求第 82 项的用途,其中该血栓性疾病包含:血管炎、静脉血栓、镰刀形细胞病、异种移植排斥、外周血管病、血栓性血小板减少性紫癜症、囊性纤维化、血管性痴呆、雷诺病、类风湿性关节炎、或糖尿病。

86. 权利要求第 83 项的用途,其中该脑血管疾病为血管性痴呆、缺血性卒中、或再发性中风。

87. 权利要求第 79-86 项中任一项的用途,其中该治疗有效量从约 0.001 至约 100mg/kg。

88. 权利要求第 87 项的用途,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 20mg/kg。

89. 权利要求第 87 项的用途,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 10mg/kg。

90. 权利要求第 79-89 项中任一项的用途,其中是将单一或多次小剂量的该治疗有效量的该人源化抗体或其结合片段施用给受试者。

91. 权利要求第 79-89 项中任一项的用途,其中该治疗有效量足以抑制血小板凝集,但不足以引发明显的临床出血迹象。

92. 权利要求第 79-86 项中任一项的用途,其中该治疗有效量从 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍,而不致引发明显的临床出血迹象。

93. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,用作药物时,包含以一治疗有效量施用该人源化抗体或其结合片段。

94. 权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,当其被用于治疗 vWF 介导的疾病或紊乱时,包含以一治疗有效量施用该人源化抗体或其结合片段。

95. 权利要求第 93 项的人源化抗体或其结合片段,其中该药物被用来治疗 vWF 介导的疾病或紊乱。

96. 权利要求第 94 或 95 项的人源化抗体或其结合片段,其中该 vWF 介导的疾病或紊乱为血栓性疾病或紊乱。

97. 权利要求第 96 项的人源化抗体或其结合片段,其中该血栓性疾病为心血管疾病或脑血管疾病如缺血性卒中。

98. 权利要求第 97 项的人源化抗体或其结合片段,其中该心血管疾病为动脉粥样硬化症、再狭窄、心绞痛、急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合症、或与糖尿病相关联的心血管疾病。

99. 权利要求第 96 项的人源化抗体或其结合片段,其中该血栓性疾病包含:血管炎、静脉血栓、镰刀形细胞病、异种移植排斥、外周血管病、血栓性血小板减少性紫癜症、囊性纤维化、血管性痴呆、雷诺病、类风湿性关节炎、或糖尿病。

100. 权利要求第 97 项的人源化抗体或其结合片段,其中该脑血管疾病为血管性痴呆、缺血性卒中、或再发性中风。

101. 权利要求第 93-100 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该治疗有效量从约 0.001 至约 100mg/kg。

102. 权利要求第 101 项的人源化抗体或其结合片段,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 20mg/kg。

103. 权利要求第 101 项的人源化抗体或其结合片段,其中该治疗有效量从约 0.002 至约 10mg/kg。

104. 权利要求第 93-103 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中是将单一或多次小剂量的该治疗有效量的该人源化抗体或其结合片段施用该受试者。

105. 权利要求第 93-103 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该治疗有效量足以抑制血小板凝集,但不足以引发明显的临床出血迹象。

106. 权利要求第 93-100 项中任一项的人源化抗体或其结合片段,其中该治疗有效量从 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍,而不致引发明显的临床出血迹象。

107. 一种具有冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人类抗体或其结合片段,其用范围自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍的治疗有效量加以投药,而不致引发明显的临床出血迹象。

108. 权利要求第 107 项的人类抗体或其结合片段,其中该抗体或其结合片段具有人类 vWF 的 A1 结构域的特异性。

109. 一种将权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段施用有此需要的受试者的方法,包含:施用一治疗有效量的该人源化抗体或其结合片段,其足以抑制血小板凝集而不致引发明显的临床出血迹象。

110. 权利要求第 66 或 109 项的方法,其中该人源化抗体或其结合片段是经由皮下方式加以施用。

111. 权利要求第 66 或 109 项的方法,其中该人源化抗体或其结合片段是经由静脉方式加以施用。

112. 权利要求第 66 或 109 项的方法,其中该人源化抗体或其结合片段是经由静脉方式结合放射性治疗法加以施用。

113. 权利要求第 66 或 109 项的方法,其中该人源化抗体或其结合片段的该治疗有效量从 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍。

114. 权利要求第 79 项的用途,其中该人源化抗体或其结合片段用自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍的治疗有效量加以施用。

115. 一种制品,其是用以治疗 vWF 介导的疾病或紊乱,该制品包含权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段。

116. 一种试剂盒,其是用以治疗 vWF 介导的疾病或紊乱,该试剂盒包含权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段。

117. 一种权利要求第 1-43 项中任一项的人源化抗体或其结合片段的用途,其是用于非治疗性应用上。

118. 权利要求第 117 项的用途,其中该非治疗性应用为诊断性测定。



## 对冯维勒布兰德氏因子特异的人源化抗体

### 技术领域

[0001] 本公开基本涉及具有冯维勒布兰德氏 (von Willebrand) 因子特异性的人源化抗体或其结合片段。更特别地,本公开基本涉及包含 CDR 的具有冯维勒布兰德氏因子特异性的人源化抗体或其结合片段,该 CDR 对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的 CDR。

### 背景技术

[0002] 血小板附着至血管创伤部位的调节涉及若干蛋白质的协调良好的相互作用,且其在止血及血栓形成两方面均扮演重要角色。一种促成血小板附着的此类蛋白质为冯维勒布兰德氏因子 (vWF),其为存在于血浆中的大型多体 (multimeric) 糖蛋白。假说认为:vWF 可经由其 A1 结构域而与血小板受体 GPIIb- $\alpha$  产生相互作用,从而促进血小板滚动及附着 (Moake 等, (1986) J. Clin. Invest. 78 :1456-61)。在血小板滚动及附着之后,可形成导致出血停止的血小板/纤维蛋白栓 (plug);然而,过度的血小板及/或凝血反应可能导致病理性血栓状态。

[0003] 由于现今针对抑制血小板活化(例如 GPIIbIIIa、ADP 受体、环加氧酶 (cyclo-oxygenase) 或磷酸二酯酶拮抗剂 (phosphodiesterase antagonist)) 或凝血(例如凝血酶及 Xa 因子抑制剂)的治疗方式与出血并发症相关联,有需要开发出在不严重削弱止血反应的情况下而能够实质上抑制血栓形成的物质。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明基本涉及具有人类冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人源化抗体或其结合片段、其制备及使用方法,包含 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法。具有人类 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段可包含来自非人类抗体的互补决定区 (CDR) (例如小鼠 CDR) 及人类框架区。

[0006] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含如 SEQ ID NO :19 中所示的重链可变区序列及如 SEQ ID NO :28 中所示的轻链可变区序列。

[0007] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含如 SEQ ID NO :237 中所示的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所示的轻链序列。

[0008] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含:(a) 重链及轻链互补决定区 (CDR),其对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 重链及轻链可变区(分别为 SEQ ID NO :1 及 2) 中的 CDR;(b) 重链框架区和/或轻链框架区,前者对应于存在于 VH 4-59 衍生人类抗体(例如抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4)) 的可变区中的框架区,后者对应于存在于人类抗体 AAK94808 (VL 018) (SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区。

[0009] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列重链 CDR 其中一种或多种:HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8),和/或 HCDR3:DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9)。

[0010] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8),HCDR3:

DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9)。在一些实施方案中,该人源化抗体或其结合片段还可包含来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0011] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、和/或 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。

[0012] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、及 LCDR 3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。在某些实施方案中,人源化抗体或其结合片段还可包含 :来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区。

[0013] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :重链 CDR, HCDR1 :GFSLTDYGVV (SEQ ID NO :7)、HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8)、及 HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9);及轻链 CDR, LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。在某些实施方案中,人源化抗体或其结合片段还可包含来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区、和/或来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0014] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列重链可变区其中一种或多种 :H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :145)、或 H 16 (SEQ ID NO :146)。

[0015] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链可变区其中一种或多种 :L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30)。

[0016] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 (1) 下列重链可变区其中一种或多种 :H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :145)、或 H16 (SEQ ID NO :146); 及 (2) 下列轻链可变区其中一种或多种 :L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30)。

[0017] 举例而言,人源化抗体或其结合片段可包含 :L5 (SEQ ID NO :23) 和 H2 (SEQ ID NO :13); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H4 (SEQ ID NO :14); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H5 (SEQ ID NO :15); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H6 (SEQ ID NO :16); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H7 (SEQ ID NO :17); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H8 (SEQ ID NO :18); L4 (SEQ ID NO :24) 和 H2 (SEQ ID NO :13); L6 (SEQ ID NO :25) 和 H2 (SEQ ID NO :13); L11 (SEQ ID NO :30) 和 H2 (SEQ ID NO :13); L7 (SEQ ID NO :26) 和 H2 (SEQ ID NO :13); L9 (SEQ ID NO :28) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L8 (SEQ ID NO :27) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L7 (SEQ ID NO :26) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L6 (SEQ ID NO :25) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L4 (SEQ ID NO :24) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L5 (SEQ ID NO :23) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L10 (SEQ ID NO :29) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L9 (SEQ ID NO :28) 和 H9 (SEQ ID NO :19); L9 (SEQ ID NO :28) 和 H12 (SEQ ID NO :20); L9 (SEQ ID NO :28) 和 H13 (SEQ ID NO :

21) ;L9(SEQ ID NO :28) 和 H14(SEQ ID NO :22) ;L11(SEQ ID NO :30) 和 H 9(SEQ ID NO :19) ;或 L11(SEQ ID NO :30) 和 H14(SEQ ID NO :22)。

[0018] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 (1) 下列重链 CDR 其中一种或多种 :HCDR1 :GFSLTDYGV D(SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS(SEQ ID NO :8),和 / 或 HCDR 3 :DPADYGN YDYALDY(SEQ ID NO :9) ;及 (2) 下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDI NKYLN(SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS(SEQ ID NO :11),和 / 或 LCDR3 :QQYEKLPWT(SEQ ID NO :12)。在某些实施方案中,人源化抗体或其结合片段还可包含来自人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区、和 / 或来自人类抗体 AAC18165.1(SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0019] 本发明提供如此处所述的结合至 vWF 的人源化抗体或结合片段,其对 vWF 具有 10nM 或更小的亲和力 (Kd),优选为 5nM 或更小,更优选 1nM 或更小,最优选为至少约 0.2nM 至约 0.4nM。本发明还提供如此处所述的可竞争结合至 vWF 的人源化抗体或结合片段,其具有 100nM 或更小的亲和力 (Ki),优选为 50nM 或更小,更优选 10nM 或更小,最优选为至少约 0.2nM 至约 5.0nM。

[0020] 本发明还提供结合至 vWF 的 A1 结构域的人源化抗体或结合片段,其具有 10nM 或更小的亲和力 (Kd),优选为 5nM 或更小,更优选 1nM 或更小,最优选为至少约 0.2nM 至约 0.4nM。本发明还提供可竞争结合至 vWF 的 A1 结构域的人源化抗体或其结合片段,其对 vWF 具有 100nM 或更小的亲和力 (Ki),优选为 50nM 或更小,更优选 10nM 或更小,最优选为至少约 0.2nM 至约 5.0nM。

[0021] 本发明还提供 Fab 片段热稳定温度大于 65°C 的人源化抗体或结合片段。

[0022] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 (GFSLTDYGV D ;SEQ ID NO :7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS ;SEQ ID NO :8), HCDR3 (DPADYGN YDYALDY ;SEQ ID NO :9) ;及轻链 CDR1、轻链 CDR2 及 LCDR3 (QQYEKLPWT ;SEQ ID NO :12),附带条件为 LCD1 和 / 或 LCD2 至少其中一者分别不为 SASQDINKYLN(SEQ ID NO :10) 或 YTSSLHS(SEQ ID NO :11)。

[0023] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 (GFSLTDYGV D ;SEQ ID NO :7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS ;SEQ ID NO :8), HCDR3 (DPADYGN YDYALDY ;SEQ ID NO :9), LCDR1 (SASQDINKYLN ;SEQ ID NO :10), LCDR2 (YTSSLHS ;SEQ ID NO :11) 及 LCDR 3 (QQYEKLPWT ;SEQ ID NO :12) ;对应于人类抗体种系家族 VH4 的框架区 1、2 和 3 的重链框架区 1、2 和 3 ;以及对应于人类抗体种系家族 VK1 的框架区 1、2 和 3 的轻链框架区 1、2 和 3。

[0024] 本发明总体还涉及分离核酸,其编码本发明所公开的具有人类 vWF 特异性的人源化抗体。在某些实施方案中,载体可包含本发明所公开的核酸 ;在另一实施方案中,宿主细胞可包含所公开的核酸。

[0025] 本发明总体还涉及具有 vWF 特异性的人源化抗体的制造方法,包含 :培养本发明的宿主细胞,使得核酸被表达并产生抗体。在某些实施方案中,该方法还包含自宿主细胞培养物回收抗体 ;在某些实施方案中,抗体从宿主细胞培养基 (medium) 中回收 ;在某些实施方案中,于培养之前,用包含编码重链可变区的核酸的载体及包含编码轻链可变区的核酸的载体共同转染宿主细胞。

[0026] 本发明基本涉及包含具有 vWF 特异性的人源化抗体及可药用载体的组合物。

[0027] 本发明还提供这样的组合物,其包含如此处所述的第一人源化抗体或其结合片段、及结合至 vWF 的 A1 结构域的第二抗体。在某些实施方案中,第二抗体为 AJW200。

[0028] 本发明总体还涉及对受试者(例如病患)的 vWF 介导的疾病或紊乱(例如血栓病或紊乱)的治疗方法,其通过给予该受试者有效治疗量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其片段进行。在某些实施方案中,受试者为人类;在某些实施方案中,治疗有效量足以抑制血小板聚集但并不足以引发明显的临床出血迹象。

[0029] 本发明还提供如此处所述的人源化抗体或其结合片段作为药物的用途;本发明还提供如此处所述的人源化抗体或其结合片段在制备治疗 vWF 介导的疾病或紊乱的药物中的用途。在某些实施方案中,治疗有效量足以抑制血小板聚集但并不足以引发明显的临床出血迹象。

[0030] 在某些实施方案中,vWF 介导的疾病或紊乱为血栓性疾病或紊乱;在某些实施方案中,血栓性异常为心血管疾病或例如局部缺血性中风(ischemic stroke)的脑血管疾病;在某些实施方案中,心血管疾病为动脉粥样硬化症、再狭窄、心绞痛(angina)、急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合症(acute coronary syndrome)、或与糖尿病相关联的血管异常;在某些实施方案中,血栓性疾病或紊乱为血管炎、静脉血栓形成、镰刀形细胞病、异种移植排斥、外周血管病、血栓性血小板减少性紫癜症、囊性纤维化、血管性痴呆、雷诺病、类风湿性关节炎、或糖尿病;在某些实施方案中,脑血管疾病为血管性痴呆、缺血性卒中、或预防再发性中风。

[0031] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段缺乏效应子功能;在某些实施方案中,人源化抗体包含源自于 I<sub>g</sub>G4 的 Fc 区。

[0032] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段结合至冯维勒布兰德氏因子的 A1 结构域。

[0033] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的抗体结合片段为 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub> 或双链抗体(diabody)。

[0034] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的抗体结合片段不为 Fab。

[0035] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的人源化抗体为全长抗体。

[0036] 在某些实施方案中,人源化抗体可在 HCDR1 中包含一个或多个取代,例如 F27G, L29I, T30S 和 / 或 V34W 取代;在某些实施方案中,人源化抗体可在 HCDR2 中包含一个或多个取代,例如 S61P 和 / 或 A62S 取代;在某些实施方案中,人源化抗体可在 LCDR1 中包含一个或多个取代,例如 S24Q, N30S 和 / 或 K31N 取代;在某些实施方案中,人源化抗体可在 LCDR2 中包含一个或多个取代,例如 Y50D, T51A, S53N, H55E 和 / 或 S56T 取代。在某些实施方案中,人源化抗体可包含:(1) 在 HCDR1 中的一个或多个的取代,例如 F27G, L29I, T30S 和 / 或 V34W 取代;(2) 在 HCDR2 中的一个或多个的取代,例如 S61P 和 / 或 A62S 取代;(3) 在 LCDR1 中的一个或多个的取代,例如 S24Q, N30S 和 / 或 K31N 取代;及(4) 在 LCDR2 中的一个或多个的取代,例如 Y50D, T51A, S53N, H55E 和 / 或 S56T 取代。

[0037] 附图简述

[0038] 图 1 显示 NMC-4 嵌合抗体在瑞斯特霉素诱导的 vWF 介导的血小板凝集测定中的抑制活性,相较于原始 NMC-4 单株抗体及另一抗 vWF 抗体 AJW200。

[0039] 图 2A-B 显示以单独及组合使用无标记 NMC-4 嵌合抗体（同源竞争）及 AJW200, 对以 Eu 标记的 NMC-4 结合的竞争（图 2A）。图 2A 为以无标记的 NMC-4 单克隆抗体、同种型对照 IgG、AJW200 及具有称为 H9, L9 的可变区的 NMC-4 抗体的人源化衍生物对以 Eu 标记的 NMC-4 嵌合抗体的竞争；图 2B 为在 20nM AJW200 存在或不存在时的 NMC-4 竞争的希尔图（Hill plot）。

[0040] 图 3A-E 显示 NMC-4 在剪切流情形下阻断血小板附着至内皮 vWF 的能力, 包括附着至 HUVEC 细胞的血小板的显微照片。以 PBS (图 A) 或 25  $\mu$ M 组胺 (图 B-E)、加上 10  $\mu$ g/ml 抗 vWF 抗体、NMC-4 (图 C)、18  $\mu$ g/ml 抗 GPIIb- $\alpha$  抗体、AK2 (图 D)、或 18  $\mu$ g/ml 小鼠 IgG (图 E) 处理 HUVEC 细胞单层。在灌注单层各处之前, 还立即将不同抗体包含于对应的血小板悬浮液中。

[0041] 图 4A-C 显示相较于 AJW200 (图 4C), 在动脉血栓形成的大鼠氯化铁模型中的 NMC-4 嵌合体 (图 4A) 及具有名为 H14, L10 的可变区的人源化抗体 (图 4B) 的活性。将此三抗体在剂量应答研究中比较。

[0042] 图 5 显示递增剂量 (0.03-10mg/kg) 的 GBR 600 在狒狒中的周期性血流减少 (CFR) 上的效应。

[0043] 图 6 显示递增剂量 (0.01-10mg/kg) 的 GBR 600 在狒狒中的 CFR 中的效应。

[0044] 图 7 显示累积剂量 (0.005-0.07mg/kg) 的 GBR 600 在狒狒中的 CFR 中的效应。

[0045] 图 8 显示累积剂量的 GBR 600 在狒狒中的 CFR 中的剂量应答曲线。

[0046] 图 9 显示递增剂量 (1-10mg/kg) 的氯吡格雷 (clopidogrel) 在狒狒中的效应。

[0047] 图 10 显示递增剂量的 GBR 600 及氯吡格雷输注在切口出血测试上的效应比较。已将剂量表成有效剂量的倍数 (例如 CFR 降至零时的累积剂量)。

[0048] 图 11 显示由示差扫描量热法所测量的人源化 NMC-4 变体的热稳定性。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明提供具有人类冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包括具有对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的一个或多个 CDR 或部分 CDR 的 CDR 区; NMC-4 抗体结合 vWF 的 A1 结构域上的 GPIIb- $\alpha$  结合部位 (见例如 Fujimura 等, Blood, 77: 113-20, 1991; Shima 等, J NaraMed Assoc., 36:662, 1985)。本发明的人源化抗体还可包含修饰或未修饰人类框架区, 例如对应于人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO:4) 的可变区中的框架区的重链框架区, 及对应于人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO:6) 的可变区中的框架区的轻链框架区。有极多种人类框架区被视为 NMC-4CDR 的潜在受体分子, 包含对鼠类 NMC-4 重链及轻链区所属的亚科 (subfamily) 展现高度同源性的那些。最令人意外地, 在无额外改变的情况下, 将 NMC-4CDR 移植至所选择的重链可变区人类架构其中一者及轻链可变区人类架构其中一者上, 就足以维持人源化抗体在阻断 vWF 介导的血小板应答上的能力。

[0051] “嵌合抗体”一词包含可变区序列源自于一个物种而恒定区序列源自于另一物种的抗体, 例如可变区序列源自于小鼠抗体而恒定区序列源自于人类抗体的抗体。

[0052] “人源化抗体”一词包含其中已经将源自于另一哺乳动物物种 (例如小鼠) 的种系的 CDR 序列移植至人类构架序列上的抗体。在人类构架序列及源自于另一哺乳动物物种的种系的 CDR 序列内可对框架区进行额外修饰。

[0053] “人类抗体”一词包含具有其中框架区及 CDR 区两者均源自于人类种系免疫球蛋白

白序列的可变区的抗体；此外，若抗体包含恒定区，则恒定区也源自于人类种系免疫球蛋白序列。本发明的人类抗体可包含非由人类种系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸残基（例如由体外随机或定点诱变、或由体内体细胞突变所引入的突变）；然而，如此处所使用的术语“人类抗体”并不包含已将源自于另一哺乳动物物种（例如小鼠）的种系的 CDR 序列移植至人类构架序列上的抗体。

[0054] 如此处所使用，若抗体的可变区得自于利用人类种系免疫球蛋白基因的系统，则人类抗体包含“源自于”特定种系序列的重链或轻链可变区。此种系统包含利用目的抗原使带有免疫球蛋白基因的转基因小鼠免疫，或者利用目的抗原来筛选展示于噬菌体上的人类免疫球蛋白基因库。通过比较人类抗体的氨基酸序列与人类种系免疫球蛋白的氨基酸序列，并选择在序列上最接近（最大同一性%）人类抗体序列的人类种系免疫球蛋白序列，可如此鉴定出“源自于”人类种系免疫球蛋白序列的人类抗体。例如，由于自然发生的体细胞突变或有意的引入定点突变，“源自于”特定人类种系免疫球蛋白序列的人类抗体可能含有相较于种系序列的氨基酸差异；然而，所选择的人类抗体或其片段一般而言至少有 80% 与由人类种系免疫球蛋白序列所编码的氨基酸序列相同，且包含在与其它物种的种系免疫球蛋白氨基酸序列（例如鼠类种系序列）相比较时将人类抗体识别为人类的氨基酸残基。在某些情况下，人类抗体的氨基酸序列可以有至少 90%、或甚至至少 95%，96%，97%，98%，或 99% 的与由种系免疫球蛋白基因所编码的氨基酸序列的同一性，例如包含 80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，及 100%。

[0055] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段（例如 Fab, Fab', Fab'-SH, Fv, scFv, F(ab')<sub>2</sub>, 双链抗体或单链抗体），包含如 SEQ ID NO:19 中所示的重链可变区序列及如 SEQ ID NO:28 中所示的轻链可变区序列；本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段，包含如 SEQ ID NO:237 中所示的重链序列及如 SEQ ID NO:238 中所示的轻链序列。

[0056] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段，包含 (1) 下列重链 CDR 其中一种或多种：HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO:7)，HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO:8)，和 / 或 HCDR 3:DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO:9)；及 (2) 下列轻链 CDR 其中一种或多种：LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10)，LCDR2:YTSSLHS (SEQ ID NO:11)，和 / 或 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)。

[0057] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段，包含 (1) 下列重链 CDR 其中一种或多种：HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO:7)，HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO:8)，和 / 或 HCDR3:DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO:9)；或 (2) 下列轻链 CDR 其中一种或多种：LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10)，LCDR2:YTSSLHS (SEQ ID NO:11)，和 / 或 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)。

[0058] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段，包含 (1) 重链 CDR，HCDR1:GFSLTDYGVD (SEQ ID NO:7)，HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO:8)，及 HCDR3:DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO:9)；及 (2) 轻链 CDR，LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10)，LCDR2:YTSSLHS (SEQ ID NO:11)，及 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)。

[0059] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段，包含 (1) 重链 CDR，

HCDR1 :GFSLTDYGV(D (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9); 或 (2) 轻链 CDR, LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。

[0060] 在某些实施方案中, 人源化抗体或其结合片段可包含重链可变区框架区, 其中该框架区包含存在于来自人类 VH4 家族的抗体中的一个或多个 (例如 1, 2, 3 和 / 或 4) 重链构架序列 (例如构架 1 (FW1)、构架 2 (FW2)、构架 3 (FW3)、和 / 或构架 4 (FW4))。

[0061] 在某些实施方案中, 人源化抗体或其结合片段可包含轻链可变区框架区, 其中该框架区包含存在于来自人类 VK1 家族的抗体中的一个或多个 (例如 1, 2, 3 和 / 或 4) 轻链框架区序列 (例如构架 1 (FW1)、构架 2 (FW2)、构架 3 (FW3)、和 / 或构架 4 (FW4))。

[0062] 在某些实施方案中, 人源化抗体或其结合片段可包含一个或多个 (例如一、二、三、和 / 或四) 存在于来自人类 VH4 家族的抗体中的重链框架区序列 (例如构架 1 (FW1)、构架 2 (FW2)、构架 3 (FW3)、和 / 或构架 4 (FW4))、以及一个或多个 (例如一、二、三、和 / 或四) 存在于来自人类 VK 1 家族的抗体中的轻链框架区序列 (例如构架 1 (FW1)、构架 2 (FW2)、构架 3 (FW3)、和 / 或构架 4 (FW4))。

[0063] VH4 家族的成员及其各自重链框架区 1、2 和 3 包含 :4-04 (分别为 SEQ ID NO :147, 148 及 149), 4-28 (分别为 SEQ ID NO :150, 151 及 152), 4-30. 1 (分别为 SEQ ID NO :153, 154 及 155), 4-30. 2 (分别为 SEQ ID NO :156, 157 及 158), 4-30. 4 (分别为 SEQ ID NO :159, 160 及 161), 4-31 (分别为 SEQ ID NO :162, 163 及 164), 4-34 (分别为 SEQ ID NO :165, 166 及 167), 4-39 (分别为 SEQ ID NO :168, 169 及 170), 4-59 (分别为 SEQ ID NO :171, 172 及 173), 4-61 (分别为 SEQ ID NO :174, 175 及 176) 及 4-b (分别为 SEQ ID NO :177, 178 及 179)。

[0064] VK1 家族的成员及其各自轻链框架区 1、2 和 3 包含 :012 (分别为 SEQ ID NO :180, 181 及 182), 02 (分别为 SEQ ID NO :183, 184 及 185), 018 (分别为 SEQ ID NO :186, 187 及 188), 08 (分别为 SEQ ID NO :189, 190 及 191), A20 (分别为 SEQ ID NO :192, 193 及 194), A30 (分别为 SEQ ID NO :195, 196 及 197), L14 (分别为 SEQ ID NO :198, 199 及 200), L1 (分别为 SEQ ID NO :201, 202 及 203), L15 (分别为 SEQ ID NO :204, 205 及 206), L4 (分别为 SEQ ID NO :207, 208 及 209), L18 (分别为 SEQ ID NO :210, 211 及 212), L5 (分别为 SEQ ID NO :213, 214 及 215), L19 (分别为 SEQ ID NO :216, 217 及 218), L8 (分别为 SEQ ID NO :219, 220 及 221), L23 (分别为 SEQ ID NO :222, 223 及 224), L9 (分别为 SEQ ID NO :225, 226 及 227), L24 (分别为 SEQ ID NO :228, 229 及 230), L11 (分别为 SEQ ID NO :231, 232 及 233) 及 L12 (分别为 SEQ ID NO :234, 235 及 236)。

[0065] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含下列重链 CDR 其中一种或多种 :HCDR1 :GFSLTDYGV(D (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 和 / 或 HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9)。

[0066] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含下列重链 CDR 其中一种或多种 :HCDR1 :GFSLTDYGV(D (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 和 / 或 HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165. 1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区。

[0067] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含下列重链 CDR 其中一种或多种 :HCDR1 :GFSLTDYGV(D (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8),

和 / 或 HCDR3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区,其中该重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0068] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列重链 CDR 其中一种或多种 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 和 / 或 HCDR 3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区,其中该重链框架区还包含一个或多个的鼠类残基。

[0069] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR 3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9)。

[0070] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区。

[0071] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR 3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区,其中该重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0072] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7),HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR3 :DPADYGNIDYALDY (SEQ ID NO :9) 以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的重链框架区,其中该重链框架区还包含一个或多个鼠类残基。

[0073] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10),LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 和 / 或 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。

[0074] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10),LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 和 / 或 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)、以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区。

[0075] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10),LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 和 / 或 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12) 以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区,其中该轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0076] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含下列轻链 CDR 其中一种或多种 :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10),LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 和 / 或 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12) 以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区,其中该轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基。

[0077] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含轻链 CDRLCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)。



[0078] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含轻链 CDRLCDR1 : SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12) 以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区。

[0079] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含轻链 CDRLCDR1 : SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12) 以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区, 其中该轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0080] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含轻链 CDRLCDR1 : SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12) 以及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的轻链框架区, 其中该轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基。

[0081] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含: 重链 CDR HCDR1 :GFSLTDYGV (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR 3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9); 轻链 CDR LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12); 以及任选地包含来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区和 / 或来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0082] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的氨基酸序列变体。通常具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的氨基酸序列变体将具有重链和 / 或轻链框架区的氨基酸序列, 其分别有至少 80% (具有至少 80% 氨基酸序列同一性) 与具有重链或轻链 (例如具有 SEQ ID NO :19 或 SEQ ID NO :28 中的重链及轻链可变区序列) 的原始人源化抗体的重链和 / 或轻链框架区的氨基酸序列相同。优选为重链和 / 或轻链框架区序列的氨基酸序列同一性为至少 85%, 更优选至少 90%, 最优选至少 95%, 尤其 96%、更尤其 97%、再更特别 98%, 最特别为 99%, 包含例如 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 及 100%。此处将关于此序列的同一性及同源性定义为: 在比对序列及若有必要引进空位 (gap) 以得到最大百分比序列同一性之后, 候选序列中与具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段相同的氨基酸残基的百分比。如此, 可通过一般用以比较两多肽的氨基酸的位置相似性的标准方法来决定序列同一性。利用计算机程序例如 BLAST 或 FASTA, 针对其各自氨基酸的最佳匹配 (沿着一或两序列的全长, 或者沿着一或两序列的预定部分) 而排列两多肽。该程序提供默认开口罚分 (opening penalty) 及默认空位罚分 (gap penalty), 且可结合计算机程序而使用例如 PAM250 (标准得分矩阵; 见 Dayhoff 等, Atlas of Protein Sequence and Structure, 卷 5, supp. 3 (1978)) 的得分矩阵。例如可以下列方式计算同一性百分比: 将相同匹配的总数乘以 100 后, 再除以匹配跨距 (span) 内的较长序列的长度加上为比对两序列而引进至较长序列中的空位的数目的总和。

[0083] 因此, 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源化抗体或其结合片段包含重链可变区序列, 该重链可变区序列包含至少 80% 与 SEQ ID NO :19 的框架区相同的框架区、和 / 或具有至少 80% 与 SEQ ID NO :28 的框架区相同的框架区的轻链可变区序列。本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其中该人源



28) 和 H9 (SEQ ID NO :19) ;L9 (SEQ ID NO :28) 和 H12 (SEQ ID NO :20) ;L9 (SEQ ID NO :28) 和 H13 (SEQ ID NO :21) ;L9 (SEQ ID NO :28) 和 H14 (SEQ ID NO :22) ;L11 (SEQ ID NO :30) 和 H9 (SEQ ID NO :19) ;或 L11 (SEQ ID NO :30) 和 H14 (SEQ ID NO :22) 。

[0089] 本发明提供如此处所述的结合至 vWF 的人源化抗体或结合片段, 其对 vWF 具有 10nM 或更小的亲和力 (Kd), 优选为 5nM 或更小, 更优选 1nM 或更小, 最优选为至少约 0.2nM 至约 0.4nM (例如自约 0.21, 0.28 或 0.34 至约 0.25, 0.32 或 0.38nM)。本发明还提供如此处所述的竞争结合至 vWF 的人源化抗体或结合片段, 其对 vWF 具有 100nM 或更小的亲和力 (Ki), 优选为 50nM 或更小, 更优选 10nM 或更小, 最优选为至少约 0.2nM 至约 5.0nM (例如自约 0.22, 0.28 或 0.34 至约 2.3, 3.5 或 4.7nM)。

[0090] 本发明还提供此处所述结合至 vWF 的 A1 结构域的人源化抗体或结合片段, 其对 vWF 的 A1 结构域具有 10nM 或更小的亲和力 (Kd), 优选为 5nM 或更小, 更优选 1nM 或更小, 最优选为至少约 0.2nM 至约 0.4nM (例如自约 0.21, 0.28 或 0.34 至约 0.25, 0.32 或 0.38nM)。本发明还提供竞争结合至 vWF 的 A1 结构域的人源化抗体或其结合片段, 其对 vWF 具有 100nM 或更小的亲和力 (Ki), 优选为 50nM 或更小, 更优选 10nM 或更小, 最优选为至少约 0.2nM 至约 5.0nM (例如自约 0.22, 0.28 或 0.34 至约 2.3, 3.5 或 4.7nM)。

[0091] 本发明还提供 Fab 片段的热稳定性温度大于 65°C 的人源化抗体或结合片段, 优选为大于 70°C, 更优选大于 75°C, 最优选大于 80°C。分析 Fab 片段热稳定性使用示差扫描量热法, 而识别出在全长 IgG 的情境中的 Fab 片段的中点熔解温度。此类量热法为技术人员所已知, 且可根据例如 Garber 和 Demarest (2007), BBRC 355 :751-7 加以实施。令人意外地, 已发现本发明的人源化抗体具有大于亲本非人源化抗体的 Fab 片段热稳定性温度, 该亲本非人源化抗体通常为鼠类抗体, 尤其是鼠类抗体 NMC-4。本发明还提供 Fab 片段热稳定性温度大于亲本非人源化抗体的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段。

[0092] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含下列高变区氨基酸序列: HCDR1 (GFSLTDYGVD ;SEQ ID NO :7), HCDR2 (MIWGDGSTDYNSALKS ;SEQ ID NO :8), HCDR3 (DPADYGNVDYALDY ;SEQ ID NO :9) ;及 LCDR3 (QQYEKLPWT ;SEQ ID NO :12), 附带条件为 LCD1 和 / 或 LCD2 至少其中之一分别不为 SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10) 或 YTSSLHS (SEQ ID NO :11)。令人意外地, 缺乏 NMC-4LCDR1 和 / 或 LCDR2 的人源化 NMC-4 抗体保有对于 vWF 的纳摩尔结合亲和力。

[0093] 在某些实施方案中, 人源化抗体还可包含人类抗体重链框架区。在某些实施方案中, 重链框架区对应于存在于 4-59 衍生人类抗体中的重链框架区。在某些实施方案中, 存在于 4-59 衍生人类抗体中的重链框架区还包含一个或多个鼠类残基 ;在某些实施方案中, 存在于 4-59 衍生人类抗体中的重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0094] 在某些实施方案中, 人源化抗体还可包含人类抗体轻链框架区 ;在某些实施方案中, 轻链框架区对应于存在于 018 衍生人类抗体中的轻链框架区 ;在某些实施方案中, 存在于 018 衍生人类抗体中的轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基 ;在某些实施方案中, 存在于 018 衍生人类抗体中的轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0095] LCDR1 和 / 或 LCDR2 可由人类来源获得。在某些实施方案中, LCDR1 和 / 或 LCDR2 可由相同抗体 (例如一个人类抗体) 而获得 ;在其它实施方案中, LCDR1 和 / 或 LCDR2 可由不同抗体 (例如两个人类抗体) 而获得。若 LCDR2 得自人类来源, 其优选为 DASNLET (SEQ

ID NO :118)。

[0096] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含: HCDR1(GFSLTDYGV D;SEQ ID NO :7), HCDR2(MIWGDGSTDYNSALKS;SEQ IDNO :8), HCDR3(DPADYGN DYALDY;SEQ ID NO :9), LCDR1(SASQDINKYLN;SEQ ID NO :10), LCDR2(YTSSLHS;SEQ ID NO :11) 及 LCDR3(QQYEKLPWT;SEQ ID NO :12);对应于人类抗体重链种系序列 4-59 中的框架区的重链框架区 1、2 和 3,其中重链框架区 1 为 QVQLQESG PGLVKPSETLSLTCTVS(SEQ IDNO :171),重链框架区 2 为 WI RQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :172),且重链框架区 3 为 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO :173);以及对应于存在于人类抗体轻链种系序列 018 中的框架区的轻链框架区 1、2 和 3,其中轻链框架区 1 为 DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC(SEQ ID NO :186),轻链框架区 2 为 WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO :187),且轻链框架区 3 为 GVPSRFSGSGSGTDF TFISSLQPEDIATYYC(SEQ ID NO :188)。

[0097] 本发明提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,包含: HCDR1(GFSLTDYGV D;SEQ ID NO :7), HCDR2(MIWGDGSTDYNSALKS;SEQ ID NO :8), HCDR3(DPADYGN DYALDY;SEQ ID NO :9), LCDR1(SASQDINKYLN;SEQ ID NO :10), LCDR2(YTSSLHS;SEQ ID NO :11) 及 LCDR3(QQYEKLPWT;SEQ ID NO :12);对应于人类抗体重链种系序列 4-34 中的框架区的重链框架区 1、2 和 3,其中重链框架区 1 为 QVQLQQW GAGLLKPSSETLSLTCAVY(SEQ ID NO :165),重链框架区 2 为 WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :166),且重链框架区 3 为 RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO :167);以及对应于存在于人类抗体轻链种系序列 018 中的框架区的轻链框架区 1、2 和 3,其中轻链框架区 1 为 DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC(SEQ ID NO :186),轻链框架区 2 为 WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO :187),且轻链框架区 3 为 GVPSRFSGSGSGTDF TFISSLQPEDIATYYC(SEQ ID NO :188)。

[0098] 本发明还提供对 vWF 的 A1 结构域具有特异性的人源化抗体或其结合片段,包含:HCDR1(GFSLTDYGV D;SEQ ID NO :7), HCDR2(MIWGDGSTDYNSALKS;SEQ ID NO :8), HCDR3(DPADYGN DYALDY;SEQ ID NO :9), LCDR1(SASQDINKYLN;SEQ ID NO :10), LCDR2(YTSSLHS;SEQ ID NO :11) 及 LCDR3(QQYEKLPWT;SEQ ID NO :12);对应于存在于来自人类抗体种系家族 VH4 的抗体中的框架区 1、2 和 3 的重链框架区 1、2 和 3;以及对应于存在于来自人类抗体种系家族 VK1 的抗体中的框架区 1、2 和 3 的轻链框架区 1、2 和 3。

[0099] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-04 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3(例如 FW1 :QVQLQESG PGLVKPSGTLSTCAVS(SEQ ID NO :147), FW2 :WVRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :148) 及 FW3 :RVTISVDKSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ ID NO :149))。

[0100] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-28 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3(例如 FW1 :QVQLQESG PGLVKPSDTLSLTCAVS(SEQ ID NO :150), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG(SEQ ID NO :151) 及 FW3 :RVTMSVDTSKNQFSLKLSVTAVD TAVYYCAR(SEQ ID NO :152))。

[0101] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-30.1 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3(例如 FW1 :QVQLQESG PGLVKPSQTLSTCTVS(SEQ ID NO :153), FW2 :WIRQHPGKGLEWIG(SEQ ID NO :154) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR(SEQ IDNO :155))。

[0102] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-30.2 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QLQLQESGSGLVKPSQTLSTLCAVS (SEQ ID NO :156), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :157) 及 FW3 :RVTISVDRSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :158))。

[0103] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-30.4 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO :159), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :160) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :161))。

[0104] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-31 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO :162), FW2 :WIRQHPGKGLEWIG (SEQ ID NO :163) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :164))。

[0105] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-34 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVAVY (SEQ ID NO :165), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :166) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :167))。

[0106] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-39 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QLQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO :168), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :169) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :170))。

[0107] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-59 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO :171), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :172) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :173))。

[0108] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-61 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QLQLQESGPGLVKPSQTLSTLCTVS (SEQ ID NO :174), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :175) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :176))。

[0109] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于重链可变种系序列 4-b 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :QVQLQESGPGLVKPSQTLSTLCAVS (SEQ ID NO :177), FW2 :WIRQPPGKGLEWIG (SEQ ID NO :178) 及 FW3 :RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO :179))。

[0110] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 012 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO :180), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :181) 及 FW3 :GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :182))。

[0111] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 02 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (SEQ ID NO :183), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :184) 及 FW3 :GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID

NO:185))。

[0112] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 018 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :186), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY(SEQID NO :187) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYC(SEQ ID NO :188))。

[0113] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 08 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :189), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY(SEQID NO :190) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYC(SEQ ID NO :191))。

[0114] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 A20 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :192), FW2 :WYQQKPGKVPKLLIY(SEQID NO :193) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC(SEQ ID NO :194))。

[0115] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 A 30 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :195), FW2 :WYQQKPGKAPKRLIY(SEQID NO :196) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :197))。

[0116] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L14 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :NIQMTQSPSAMSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :198), FW2 :WFQQKPGKVPKHLIY(SEQID NO :199) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :200))。

[0117] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L1 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :201), FW2 :WFQQKPGKAPKSLIY(SEQID NO :202) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :203))。

[0118] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L15 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :204), FW2 :WYQQKPEKAPKSLIY(SEQID NO :205) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :206))。

[0119] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L4 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :207), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY(SEQID NO :208) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :209))。

[0120] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L18 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :210), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY(SEQID NO :211) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC(SEQ ID NO :212))。

[0121] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L5 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC(SEQ ID NO :213), FW2 :

WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :214) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :215))。

[0122] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L19 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :216), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :217) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :218))。

[0123] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L8 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :219), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :220) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :221))。

[0124] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L23 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :AIRMTQSPFSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :222), FW2 :WYQQKPAKAPKLFYIY (SEQ ID NO :223) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :224))。

[0125] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L9 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :AIRMTQSPSFSASTGDRVTITC (SEQ ID NO :225), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :226) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEQ ID NO :227))。

[0126] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L24 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :VIWMTQSPSLLSASTGDRVTISC (SEQ ID NO :228), FW2 :WYQQKPGKAPPELLIY (SEQ ID NO :229) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISCLQSEDFATYYC (SEQ ID NO :230))。

[0127] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L11 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :231), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :232) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO :233))。

[0128] 人源化抗体或其结合片段可包含对应于存在于  $\kappa$  链可变种系序列 L12 中的框架区 1、2 和 3 的框架区 1、2 和 3 (例如 FW1 :DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO :234), FW2 :WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO :235) 及 FW3 :GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYC (SEQ ID NO :236))。

[0129] 本发明还提供对 vWF 的 A1 结构域具有特异性的人源化抗体或其结合片段, 包含 : HCDR1 :GFSLTDYGVVD (SEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8), 及 HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9), LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10), LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11), 及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12); 对应于存在下列人类抗体中的框架区 1、2 和 3 的重链框架区 1、2 和 3 :4-04 (分别为 SEQ ID NO :147, 148 及 149), 4-28 (分别为 SEQ ID NO :150, 151 及 152), 4-30.1 (分别为 SEQ ID NO :153, 154 及 155), 4-30.2 (分别为 SEQ ID NO :156, 157 及 158), 4-30.4 (分别为 SEQ ID NO :159, 160 及 161), 4-31 (分别为 SEQ ID NO :162, 163 及 164), 4-34 (分别为 SEQ ID NO :165, 166 及 167), 4-39 (分别为 SEQ ID NO :168, 169 及 170), 4-59 (分别为 SEQ ID NO :171, 172 及 173), 4-61 (分别为 SEQ ID

NO:174,175 及 176) 或 4-b(分别为 SEQ IDNO:177,178 及 179);及对应于存在下列人类抗体中的框架区 1、2 和 3 的轻链框架区 1、2 和 3:012(分别为 SEQ ID NO:180,181 及 182),02(分别为 SEQ ID NO:183,184 及 185),018(分别为 SEQ ID NO:186,187 及 188),08(分别为 SEQ ID NO:189,190 及 191),A20(分别为 SEQ IDNO:192,193 及 194),A30(分别为 SEQ ID NO:195,196 及 197),L14(分别为 SEQ ID NO:198,199 及 200),L1(分别为 SEQ ID NO:201,202 及 203),L15(分别为 SEQ ID NO:204,205 及 206),L4(分别为 SEQ ID NO:207,208 及 209),L18(分别为 SEQ ID NO:210,211 及 212),L5(分别为 SEQ ID NO:213,214 及 215),L19(分别为 SEQ ID NO:216,217 及 218),L8(分别为 SEQ ID NO:219,220 及 221),L23(分别为 SEQ ID NO:222,223 及 224),L9(分别为 SEQ ID NO:225,226 及 227),L24(分别为 SEQ ID NO:228,229 及 230),L11(分别为 SEQ ID NO:231,232 及 233) 及 L12(分别为 SEQ ID NO:234,235 及 236)。

[0130] 本发明还提供如此处所述的人源化抗体或其结合片段,其保留与亲本非人源化抗体或包含来自亲本非人源化抗体及人类 Fc 区的嵌合抗体相同的活性。亲本非人源化抗体通常为鼠类抗体,尤其为鼠类抗体 NMC-4;包含来自亲本非人源化抗体的嵌合抗体通常为包含来自鼠类抗体(尤其来自鼠类抗体 NMC-4)的可变区及人类 Fc 区的抗体。优选以本发明所述的人类 Fc 区作为人类 Fc 区。

[0131] 亲本非人源化抗体及嵌合抗体的如此处所述的人源化抗体或其结合片段的活性,可通过例如实施例 1 中所述判定  $EC_{50}$  活性而以瑞斯特霉素诱导血小板凝集活性加以测量。当如此处所述的人源化抗体或其结合片段的  $EC_{50}$  活性与  $EC_{50}$  活性相同,或有高达 50%、优选为高达 30%、优选为高达 20%不同于(例如更高或更低)亲本非人源化抗体或嵌合抗体的  $EC_{50}$  活性时,如此处所述的人源化抗体或其结合片段可被视为保留着与亲本非人源化抗体或嵌合抗体相同的活性。

[0132] 在本发明的优选实施方案中,如此处所述的人源化抗体或其结合片段还包含来自人类抗体的重链框架区,其中人类重链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0133] 在本发明的其他优选实施方案中,如此处所述的人源化抗体或其结合片段还包含来自人类抗体的轻链框架区,其中人类轻链框架区不包含一个或多个鼠类残基。

[0134] “不包含一个或多个鼠类残基的人类重链框架区”或“不包含一个或多个鼠类残基的人类轻链框架区”指不包含一个或多个仅存在于鼠类中的鼠类残基的人类重链或轻链框架区,例如不包含回复突变(backmutation)至仅存在于鼠类且不存在于人类中的残基。由此定义,并不排除包含也存在于鼠类中的人类残基的人类重链或轻链框架区;并且,由此定义,不排除残基已突变至一般人类(例如大多数人类框架区共同的残基)、但还存在于鼠类中的人类重链或轻链框架区。

[0135] 在本发明来自人类抗体的重链或轻链框架区还包含一个或多个鼠类残基的实施方案情况中,其通常包含 10 个或更少的鼠类残基,优选为 9 个或更少,更优选为 8 个或更少,又更优选 7 个或更少,最优选为 6 个或更少,特别 5 个或更少,更特别 4 个或更少,又更特别 3 个或更少,最特别 2 个或更少,最特别优选 1 个。

[0136] 本发明提供编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含如 SEQ ID NO:19 中所述的重链可变区序列及如 SEQ ID NO:28 中所述的轻链可变区序列。

[0137] 本发明提供编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含



如 SEQ ID NO :237 中所述的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所述的轻链序列。

[0138] 本发明还提供编码具有对人 vWF 的特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含:对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的 CDR 的 CDR 区;对应于存在于人类抗体 AAC18165.1(SEQ ID NO :4) 的可变区中的框架区的重链框架区;及对应于存在于人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区的轻链框架区。

[0139] 本发明还提供编码具有对人 vWF 的特异性的人源化抗体或其片段的分离核酸,其包含:HCDR1:GFSLTDYGV(D) (SEQ ID NO :7)、HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS(SEQ ID NO :8)、HCDR3:DPADYGNVDYALDY(SEQ ID NO :9)、以及来自人类抗体 AAC18165.1(SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。例示性人类重链框架区的核苷酸序列公开于 SEQ ID NO :116 中。

[0140] 本发明还提供编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含下列轻链 CDR:LCDR1:SASQDINKYLN(SEQ ID NO :10)、LCDR2:YTSSLHS(SEQ ID NO :11)、及 LCDR3:QQYEKLPWT(SEQ ID NO :12)、及来自人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区。例示性人类轻链框架区的核苷酸序列公开于 SEQ ID NO :117 中。

[0141] 本发明还提供编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含下列重链可变区其中之一:H2(SEQ ID NO :13)、H4(SEQ ID NO :14)、H5(SEQ ID NO :15)、H6(SEQ ID NO :16)、H7(SEQ ID NO :17)、H8(SEQ ID NO :18)、H9(SEQ ID NO :19)、H12(SEQ ID NO :20)、H13(SEQ ID NO :21)、H14(SEQ ID NO :22)、H15(SEQ ID NO :145)、或 H16(SEQ ID NO :146)。

[0142] 本发明还提供编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含下列轻链可变区其中之一:L5(SEQ ID NO :23)、L4(SEQ ID NO :24)、L6(SEQ ID NO :25)、L7(SEQ ID NO :26)、L8(SEQ ID NO :27)、L9(SEQ ID NO :28)、L10(SEQ ID NO :29) 或 L11(SEQ ID NO :30)。

[0143] 本发明还提供编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的分离核酸,其包含 (1) 下列重链可变区其中之一:H2(SEQ ID NO :13)、H4(SEQ ID NO :14)、H5(SEQ ID NO :15)、H6(SEQ ID NO :16)、H7(SEQ ID NO :17)、H8(SEQ ID NO :18)、H9(SEQ ID NO :19)、H12(SEQ ID NO :20)、H13(SEQ ID NO :21)、H14(SEQ ID NO :22)、H15(SEQ ID NO :145)、或 H16(SEQ ID NO :146);及 (2) 下列轻链可变区其中之一:L5(SEQ ID NO :23)、L4(SEQ ID NO :24)、L6(SEQ ID NO :25)、L7(SEQ ID NO :26)、L8(SEQ ID NO :27)、L9(SEQ ID NO :28)、L10(SEQ ID NO :29) 或 L11(SEQ ID NO :30)。

[0144] 本发明还提供包含载体 GS264 的编码轻链的核酸序列的分离核酸,载体 GS264 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM21059。

[0145] 本发明还提供包含载体 GS 265 的编码重链的核酸序列的分离核酸,载体 GS265 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM21060。

[0146] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,其由载体 GS264 的编码轻链的核酸序列、及载体 GS265 的编码重链的核酸序列所编码。

[0147] 本发明提供包含分离核酸的载体,该分离核酸编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :19 中所述的重链可变区序列及如 SEQ ID NO :28 中所述的轻链可变区序列。

[0148] 本发明提供包含分离核酸的载体,该分离核酸编码具有 vWF 特异性的人源化抗体

或其结合片段,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :237 中所述的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所述的轻链序列。

[0149] 本发明提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,该人源化抗体或其结合片段包含:对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的 CDR 的 CDR 区;对应于人类抗体 AAC18165.1(SEQ ID NO :4) 的可变区中的框架区的重链框架区;及对应于人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区的轻链框架区。

[0150] 本发明还提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含 HCDR1 :GFSLTDYGV(DSEQ ID NO :7), HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS(SEQ ID NO :8), HCDR3 :DPADYGNVDYALDY(SEQ ID NO :9),以及来自人类抗体 AAC18165.1(SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0151] 本发明还提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含轻链 CDR :LCDR1 :SASQDINKYLN(SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS(SEQ ID NO :11)、及 LCDR3 :QQYEKLPWT(SEQ ID NO :12)、及来自人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区。

[0152] 本发明还提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列重链可变区其中之一:H2(SEQ ID NO :13)、H4(SEQ ID NO :14)、H5(SEQ ID NO :15)、H6(SEQ ID NO :16)、H7(SEQ ID NO :17)、H8(SEQ ID NO :18)、H9(SEQ ID NO :19)、H12(SEQ ID NO :20)、H13(SEQ ID NO :21)、H14(SEQ ID NO :22)、H15(SEQ ID NO :145)、或 H16(SEQ ID NO :146)。

[0153] 本发明还提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列轻链可变区其中之一:L5(SEQ ID NO :23)、L4(SEQ ID NO :24)、L6(SEQ ID NO :25)、L7(SEQ ID NO :26)、L8(SEQ ID NO :27)、L9(SEQ ID NO :28)、L10(SEQ ID NO :29) 或 L11(SEQ ID NO :30)。

[0154] 本发明还提供包含核酸的载体,该核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含 (1) 下列重链可变区其中之一:H2(SEQ ID NO :13)、H4(SEQ ID NO :14)、H5(SEQ ID NO :15)、H6(SEQ ID NO :16)、H7(SEQ ID NO :17)、H8(SEQ ID NO :18)、H9(SEQ ID NO :19)、H12(SEQ ID NO :20)、H13(SEQ ID NO :21)、H14(SEQ ID NO :22)、H15(SEQ ID NO :145)、或 H16(SEQ ID NO :146);及 (2) 下列轻链可变区其中之一:L5(SEQ ID NO :23)、L4(SEQ ID NO :24)、L6(SEQ ID NO :25)、L7(SEQ ID NO :26)、L8(SEQ ID NO :27)、L9(SEQ ID NO :28)、L10(SEQ ID NO :29) 或 L11(SEQ ID NO :30)。

[0155] 本发明还提供包含分离核酸的载体,该分离核酸包含载体 GS 264 的编码轻链的核酸序列,载体 GS264 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM 21059。

[0156] 本发明还提供包含分离核酸的载体,该分离核酸包含载体 GS265 的编码重链的核酸序列,载体 GS265 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM 21060。

[0157] 本发明提供包含核酸的宿主细胞,该核酸编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :19 中所述的重链可变区序列及如 SEQ ID NO :28 中所述的轻链可变区序列。

[0158] 本发明提供包含核酸的宿主细胞,该核酸编码具有 vWF 特异性的人源化抗体或其

结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :237 中所述的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所述的轻链序列。

[0159] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含:对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 内的 CDR 的 CDR 区;对应于存在于人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区中的框架区的重链框架区;及对应于存在于人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区的轻链框架区。

[0160] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含:HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7)、HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8)、HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9)、以及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0161] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列轻链 CDR :LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)、及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区。

[0162] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列重链可变区其中之一:H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :145)、或 H16 (SEQ ID NO :146)。

[0163] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列轻链可变区其中之一:L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30)。

[0164] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸编码具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,而该人源化抗体或其结合片段包含下列重链可变区其中之一:H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :145)、或 H16 (SEQ ID NO :146);及 (2) 下列轻链可变区其中之一:L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30)。

[0165] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸包含载体 GS264 的编码轻链的核酸序列,载体 GS264 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM 21059。

[0166] 本发明还提供包含分离核酸的宿主细胞,该分离核酸包含载体 GS265 的编码重链的核酸序列,载体 GS265 已在 2008 年 1 月 23 日在 DSMZ 保藏于微生物中,其登记号为 DSM 21060。

[0167] 本发明还提供具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的生产方法,包含培养本发明的宿主细胞,以表达核酸及制造抗体;本发明的人源化 vWF 抗体或其结合片段的生

产方法还可包含自宿主细胞培养物回收抗体。在某些实施方案中,抗体可自宿主细胞培养基加以回收;在某些实施方案中,于培养之前,可用包含编码重链可变区的核酸的载体及包含编码轻链可变区的核酸的载体共同感染宿主细胞。

[0168] 本发明提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :19 中所述的重链可变区序列及如 SEQ ID NO :28 中所述的轻链可变区序列。

[0169] 本发明提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :19 中所述的重链可变区序列、如 SEQ ID NO :28 中所述的轻链可变区序列、及可药用的载体 (carrier)。

[0170] 本发明提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :237 中所述的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所述的轻链序列。

[0171] 本发明提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含如 SEQ ID NO :237 中所述的重链序列、如 SEQ ID NO :238 中所述的轻链序列、及可药用的载体。

[0172] 本发明提供包含具有人类冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含:对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的 CDR 的 CDR 区;对应于人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区中的框架区的重链框架区;对应于人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区的轻链框架区;及可药用的载体。

[0173] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含 HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7)、HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8)、HCDR3 :DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO :9)、来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区、以及可药用的载体。

[0174] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含下列轻链 CDR :LCDR1 :SASQDI NKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12)、及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区、以及可药用的载体。

[0175] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含:重链 CDR, HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7)、HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8)、及 HCDR3 :DPADYGNYDYALDY (SEQ ID NO :9);及轻链 CDR, LCDR1 :SASQDINKYLN (SEQ ID NO :10)、LCDR2 :YTSSLHS (SEQ ID NO :11)、及 LCDR3 :QQYEKLPWT (SEQ ID NO :12);任选地,来自人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区的轻链框架区和 / 或来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区;以及可药用的载体。

[0176] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物,该人源化抗体或其结合片段包含下列重链可变区之一 :H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :

145)、或 H16 (SEQ ID NO :146) 以及可药用的载体。

[0177] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物, 该人源化抗体或其结合片段包含下列轻链可变区之一 :L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30) 以及可药用的载体。

[0178] 本发明还提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段的组合物, 该人源化抗体或其结合片段包含 :下列重链可变区其中之一 :H2 (SEQ ID NO :13)、H4 (SEQ ID NO :14)、H5 (SEQ ID NO :15)、H6 (SEQ ID NO :16)、H7 (SEQ ID NO :17)、H8 (SEQ ID NO :18)、H9 (SEQ ID NO :19)、H12 (SEQ ID NO :20)、H13 (SEQ ID NO :21)、H14 (SEQ ID NO :22)、H15 (SEQ ID NO :145)、或 H16 (SEQ ID NO :146) ;下列轻链可变区其中之一 -L5 (SEQ ID NO :23)、L4 (SEQ ID NO :24)、L6 (SEQ ID NO :25)、L7 (SEQ ID NO :26)、L8 (SEQ ID NO :27)、L9 (SEQ ID NO :28)、L10 (SEQ ID NO :29) 或 L11 (SEQ ID NO :30) ;以及可药用的载体。

[0179] 本发明还提供包含如此处所述的第一人源化抗体或其结合片段及结合至 vWF 的 A1 结构域的第二抗体的组合物。

[0180] 在一些实施方案中, 第二抗体是 AJW-200。

[0181] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法, 该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其包含如 SEQ ID NO :19 中所示的重链可变区序列及如 SEQ ID NO :28 中所示的轻链可变区序列。

[0182] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法, 该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其包含如 SEQ ID NO :237 中所示的重链序列及如 SEQ ID NO :238 中所示的轻链序列。

[0183] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法, 该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有人 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其包含 :对应于存在于鼠类抗体 NMC-4 中的 CDR 的 CDR 区 ;对应于人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区中的框架区的重链框架区 ;对应于人类抗体 AAK94808 (SEQ ID NO :6) 的可变区中的框架区的轻链框架区。

[0184] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法, 该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 其包含 :HCDR1 :GFSLTDYGVD (SEQ ID NO :7)、HCDR2 :MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO :8)、HCDR3 :DPADYGNVDYALDY (SEQ ID NO :9)、及来自人类抗体 AAC18165.1 (SEQ ID NO :4) 的可变区的重链框架区。

[0185] 血栓形成疾病或紊乱可为心血管疾病或例如缺血性卒中的脑血管疾病。在某些实施方案中, 心血管疾病为动脉粥样硬化症 (atherosclerosis)、再狭窄 (restenosis)、心绞痛 (angina)、急性心肌梗塞 (acute myocardial infarction)、急性冠状动脉综合症 (acute coronary syndrome)、或与糖尿病 (diabetes) 相关联的血管异常 ;在某些实施方案中, 血栓性疾病或紊乱为血管发炎、静脉血栓 (venous thrombosis)、镰刀形细胞病、异种移植排斥 (xenograft rejection)、外周血管病 (peripheral vascular disease)、血栓性血小板

减少性紫癜症 (thrombotic thrombocytopenicpurpura)、囊性纤维化 (cystic fibrosis)、血管性痴呆 (vascular dementia)、雷诺病 (Raynaud's disease)、类风湿性关节炎、或糖尿病;在某些实施方案中,脑血管异常可包含由于大脑动脉梗塞 (cerebral artery infarct) 以及小腔隙梗塞 (small lacunar infarct) 的缺血性卒中及血管性痴呆 (vascular dementia)。人源化 vWF 抗体还可用于预防再发性中风、或由脑血管发炎所引起的初期中风。

[0186] 在某些实施方案中,血栓形成疾病或紊乱可包含癌症。

[0187] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法,该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段,其包含:下列轻链 CDR:LCDR1:SASQDINKYLN (SEQ ID NO:10)、LCDR2:YTSSLHS (SEQ ID NO:11)、及 LCDR3:QQYEKLPWT (SEQ ID NO:12)、及来自人类抗体 AAK94808 (SEQ IDNO:6) 的可变区的轻链框架区。

[0188] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法,该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其片段,其包含:下列重链可变区其中之一:H2 (SEQ ID NO:13)、H4 (SEQ ID NO:14)、H5 (SEQ ID NO:15)、H6 (SEQ ID NO:16)、H7 (SEQ ID NO:17)、H8 (SEQ ID NO:18)、H9 (SEQ ID NO:19)、H12 (SEQ ID NO:20)、H13 (SEQ ID NO:21)、H14 (SEQ IDNO:22)、H15 (SEQ ID NO:145)、或 H16 (SEQ ID NO:146)。

[0189] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法,该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其片段,其包含:下列轻链可变区其中之一:L5 (SEQ ID NO:23)、L4 (SEQ ID NO:24)、L6 (SEQ ID NO:25)、L7 (SEQ ID NO:26)、L8 (SEQ ID NO:27)、L9 (SEQ ID NO:28)、L10 (SEQ ID NO:29) 或 L11 (SEQ ID NO:30)。

[0190] 本发明还提供在一受试者 (例如人类) 中的 vWF 介导的疾病或紊乱 (例如血栓形成疾病或紊乱) 的治疗方法,该方法包含给予该受试者治疗有效量的具有 vWF 特异性的人源化抗体或其片段,其包含:下列重链可变区其中之一:H2 (SEQ ID NO:13)、H4 (SEQ ID NO:14)、H5 (SEQ ID NO:15)、H6 (SEQ ID NO:16)、H7 (SEQ ID NO:17)、H8 (SEQ ID NO:18)、H9 (SEQ ID NO:19)、H12 (SEQ ID NO:20)、H13 (SEQ ID NO:21)、H14 (SEQ IDNO:22)、H15 (SEQ ID NO:145)、或 H16 (SEQ ID NO:146);下列轻链可变区其中之一:L5 (SEQ ID NO:23)、L4 (SEQ ID NO:24)、L6 (SEQ IDNO:25)、L7 (SEQ ID NO:26)、L8 (SEQ ID NO:27)、L9 (SEQ ID NO:28)、L10 (SEQ ID NO:29) 或 L11 (SEQ ID NO:30)。

[0191] 在某些实施方案中,具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段缺乏效应子 (effector) 功能;在某些实施方案中,人源化抗体包含源自于 IgG<sub>4</sub> 的 Fc 区。

[0192] 本发明提供具有冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人类抗体或其结合片段,其可以自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍的治疗有效量来提供,而不致引发明显的临床出血迹象。人类抗体或其结合片段优选地为具有人类 vWF 的 A1 结构域特异性,具有 vWF 特异性的人类抗体或其结合片段更优选地为具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段。

[0193] 本发明还提供 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法,其通过给予一受试者 (优选人类) 治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段。该治疗有效量从约 0.001 至约

100mg/kg, 优选为自约 0.002 至约 20mg/kg, 更优选为自约 0.002 至约 10mg/kg, 又更优选为自约 0.002 至约 0.4mg/kg, 再更优选为自约 0.005 至约 0.2mg/kg, 最优选为自约 0.01 至约 0.1mg/kg。

[0194] 本发明还提供一种 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法, 其通过给予一需要的受试者治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段来达成。该治疗有效量从 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍, 优选为自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 200 倍, 更优选自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 100 倍。

[0195] 本发明还提供一种 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法, 其通过将单一或多次小剂量 (sub-dose) 的治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段施予需要此类处理的受试者来达成。

[0196] 本发明还提供一种 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法, 其通过将治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段以皮下方式施予需要此类处理的受试者来达成。

[0197] 本发明还提供一种 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法, 其通过将治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段透过静脉方式施予需要此类处理的受试者来达成。

[0198] 本发明还提供一种 vWF 介导的疾病或紊乱的治疗方法, 其通过连续地或结合放射性治疗法 (例如照射或引入放射性物质, 如 UICC(编), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag(1982)), 将治疗有效量的如此处所述的人源化抗体或其结合片段通过静脉方式施予需要此类处理的受试者来达成。

[0199] 在实施或测试本发明时, 虽然类似或等同于此处所述的任何方法及材料均可使用, 但以下仍说明优选方法及材料。

[0200] 人源化冯维勒布兰德氏因子抗体的生产

[0201] 此处提供人源化冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 抗体 (例如鼠类 NMC-4) 或其结合片段的生产方法。具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段, 可通过自非人类动物 (例如小鼠) 的 VH 和 / 或 VL 区转移一个或多个 CDR 或其部分至人类 VH 和 / 或 VL 区的一个或多个框架区。任选地, 当需要或期望维持结合亲和力时, 如此存在于 VH 和 / 或 VL 区中的人类构架残基, 可用对应的非人类 (例如小鼠) 残基加以替代。任选地, 存在于 CDR 中的非人类氨基酸残基可以人类残基加以替代。

[0202] 如此处所述的构架及 CDR 的分类 (除了 HFR1 及 CDR1 以外) 基于卡巴记数制 (Kabat numbering system)。在此定义中, 重链的 CDR 包含残基 31-35(HCDR1), 50-65(HCDR2), 及 95-102(HCDR3); 轻链的 CDR 被定义成包含残基 24-34(LCDR1), 50-56(LCDR2), 及 89-97(LCDR3)。将 VH (例如重链框架区 1(HFR1)、重链框架区 2(HFR)、重链框架区 3(HFR3) 和 / 或重链框架区 4(HFR4)) 中的框架区定义成包含残基 1-30(HFR1), 36-49(HFR2), 66-94(HFR3), 及 103-113(HFR4), 而 VL 中的框架区包含残基 1-23(LFR1), 35-49(LFR2), 57-88(LFR 3) 及 98-107(LFR4) (Wu 和 Kabat, 1970 *J. Exp. Med.* 132 :211)。然而, 基于 CDR 的结构, Chothia 将 CDR1-H 定义成包含残基 26-32(Chothia 等, 1992 *J. Mol. Biol.* 227 :799), AbM (抗体模拟) 定义为 CDR1-H 包含残基 26-35 的 Oxford Molecular's AbM 抗体模拟软件所使用的两者之间的折衷。此为此处所述的利用 NMC-4 的人源化方法所用的定义。

[0203] 具有冯维勒布兰德氏因子 (vWF) 特异性的人源化抗体或其结合片段, 可通过下列方式加以生产: 将来自 NMC-4 的重链互补决定区 (CDR) 转移至对应于人类抗体

AAC18165.1(SEQ ID NO:4)的可变区中的框架区的重链框架区;以及将来自 NMC-4 的轻链 CDR 转移至对应于人类抗体 AAK94808(SEQ ID NO:6)的可变区中的框架区的轻链框架区。

[0204] 具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段还可通过下列方式加以生产:将来自鼠类 NMC-4 的重链 CDR(例如 HCDR1:GFSLTDYGVD(SEQ ID NO:7), HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS(SEQ ID NO:8),及 HCDR 3:DPADYGNIDYALDY(SEQ ID NO:9))其中一种或多种转移至人类框架区(例如来自 AAC18165.1(SEQ ID NO:4)的可变区)。

[0205] 具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段还可通过下列方式加以生产:将轻链 CDR(例如 LCDR1:SASQDINKYLN(SEQ ID NO:10),LCDR2:YTSSLHS(SEQ ID NO:11),及 LCDR3:QQYEKLPWT(SEQ ID NO:12))其中一种或多种转移至人类框架区(例如来自 AAK94808(SEQ ID NO:6)的可变区)。

[0206] 具有 vWF 特异性的人源化抗体可通过下列方式加以生产:将来自鼠类 NMC-4 的重链 CDR(例如 HCDR1:GFSLTDYGVD(SEQ ID NO:7),HCDR2:MIWGDGSTDYNSALKS(SEQ ID NO:8),及 HCDR3:DPADYGNIDYALDY(SEQ ID NO:9))其中一种或多种转移至人类框架区(例如来自 AAC18165.1(SEQ ID NO:4)的可变区);及将轻链 CDR(例如 LCDR1:SASQDINKYLN(SEQ ID NO:10),LCDR2:YTSSLHS(SEQ ID NO:11),及 LCDR 3:QQYEKLPWT(SEQ ID NO:12))其中一种或多种转移至人类框架区(例如来自 AAK94808(SEQ ID NO:6)的可变区)。

[0207] 具有 vWF 特异性的人源化抗体可通过下列方式加以生产:将包含存在于 NMC-4 及人类框架区中的 CDR 的修饰重链可变区(例如 H2(SEQ ID NO:13)、H4(SEQ ID NO:14)、H5(SEQ ID NO:15)、H6(SEQ ID NO:16)、H7(SEQ ID NO:17)、H8(SEQ ID NO:18)、H9(SEQ ID NO:19)、H12(SEQ ID NO:20)、H13(SEQ ID NO:21)、H14(SEQ ID NO:22)、H15(SEQ ID NO:145)、或 H16(SEQ ID NO:146))转移至人类恒定区。

[0208] 具有 vWF 特异性的人源化抗体还可通过下列方式加以生产:将包含存在于 NMC-4 及人类框架区中的 CDR 的修饰轻链可变区(例如 L5(SEQ ID NO:23)、L4(SEQ ID NO:24)、L6(SEQ ID NO:25)、L7(SEQ ID NO:26)、L8(SEQ ID NO:27)、L9(SEQ ID NO:28)、L10(SEQ ID NO:29)或 L11(SEQ ID NO:30))转移至人类恒定区。

[0209] 具有 vWF 特异性的人源化抗体可通过下列方式加以生产:将包含存在于 NMC-4 及人类框架区中的 CDR 的修饰重链可变区(例如 H2(SEQ ID NO:13)、H4(SEQ ID NO:14)、H5(SEQ ID NO:15)、H6(SEQ ID NO:16)、H7(SEQ ID NO:17)、H8(SEQ ID NO:18)、H9(SEQ ID NO:19)、H12(SEQ ID NO:20)、H13(SEQ ID NO:21)、H14(SEQ ID NO:22)、H15(SEQ ID NO:145)、或 H16(SEQ ID NO:146))转移至人类恒定区;以及将包含存在于 NMC-4 及人类框架区中的 CDR 的修饰轻链可变区(例如 L5(SEQ ID NO:23)、L4(SEQ ID NO:24)、L6(SEQ ID NO:25)、L7(SEQ ID NO:26)、L8(SEQ ID NO:27)、L9(SEQ ID NO:28)、L10(SEQ ID NO:29)或 L11(SEQ ID NO:30))转移至人类恒定区。

[0210] 为试图进一步降低人源化抗体的抗原性,可将 CDR 中的残基(例如鼠类残基)变为(例如取代为)人类氨基酸残基。举例而言,人源化抗体可包含 HCDR1 中的 F27G,L29I,T30S 和/或 V34W 取代其中一种或多种。在某些实施方案中,人源化抗体可包含 HCDR2 中的 S61P 和/或 A62S 取代其中一种或多种;在某些实施方案中,人源化抗体可包含 LCDR1 中的 S24Q,N30S 和/或 K31N 取代其中一种或多种;在某些实施方案中,人源化抗体可包含一个或多个的取代,例如 LCDR2 中的 Y50D,T51A,S53N,H55E 和/或 S56T 取代。在某些实施方



案中,人源化抗体可包含:HCDR1 中的 F27G, L29I, T30S 和 / 或 V34W 取代其中一种或多种;HCDR2 中的 S61P 和 / 或 A62S 取代其中一种或多种;LCDR1 中的 S24Q, N30S 和 / 或 K31N 取代其中一种或多种;及 LCDR2 中的 Y50D, T51A, S53N, H55E 和 / 或 S56T 取代其中一种或多种。

[0211] 考虑了各种形式的人源化抗体。举例而言,人源化抗体可为例如 Fab 的抗体片段,其任选地与一个或多个的细胞毒性物质缀合以产生免疫缀合物 (immunoconjugate)。可选地,人源化抗体或亲和力成熟抗体可为完整 (intact) 抗体,例如完整 IgG1 抗体。

[0212] 已开发出生产人源化抗体的抗体片段的各种技术。传统上,这些片段系通过完整抗体的蛋白水解消化而获得(见例如 Morimoto 等, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 24 :107-117 (1992); 及 Brennan 等, *Science*, 229 :81 (1985)); 然而,如今这些片段可通过重组宿主细胞来直接产生,例如抗体片段可由以上所讨论的抗体噬菌体文库分离出来;可选地, Fab' -SH 片段可直接由大肠杆菌回收并将其化学交联以形成 F(ab')<sub>2</sub> 片段 (Carter 等, *Bio/Technology*, 10 :163-167 (1992))。根据另一方法, F(ab')<sub>2</sub> 片段可直接由重组宿主细胞培养物中分离出来,而其它生产抗体片段的方法对技术人员将为显而易见。在其它实施方案中,选定的抗体为单链 Fv 片段 (scFv), 见 W0 1993/16185; 美国专利第 5, 571, 894 号; 及美国专利第 5, 587, 458 号。抗体片段还可为“线性抗体”, 例如在美国专利第 5, 641, 870 中所述。

[0213] 根据不同方法,可将具有期望的结合特异性(抗体-抗原结合位点)的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。该融合优选地为利用免疫球蛋白重链恒定结构域,其包含至少部分铰链区、CH<sub>2</sub> 区及 CH<sub>3</sub> 区。优选使包含轻链结合所必须的位点的第一重链恒定区 (CH1) 存在于至少一融合物中。将编码免疫球蛋白重链融合物及(若有需要)免疫球蛋白轻链的 DNA 插入于分别的表达载体内,并共同转染至一适当宿主生物。当建构时所使用的不等比率的三多肽链提供最优化产率时,此在调整三多肽片段的相互比例的实施方案中可提供灵活性;然而,当等比例的至少两多肽链的表达导致高产率或是当比率不具特殊意义时,可在一表达载体中插入该两或三多肽链的编码序列。

[0214] 本发明还涉及包含抗体的免疫缀合物,该抗体缀合至细胞毒性物质(例如化疗剂、毒素(例如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包含其片段和/或变体))或放射性同位素(即放射性缀合物)。

[0215] 本发明进一步考虑形成于抗体与具有核溶解 (nucleolytic) 活性的化合物(例如核糖核酸酶或例如脱氧核糖核酸酶的 DNA 核酸内切酶 (DNase)) 之间的免疫球蛋白。

[0216] 有多种放射性同位素可用于生产辐射缀合 (radioconjugated) 的人源化 vWF 抗体,例子包含 At<sup>211</sup>, I<sup>131</sup>, I<sup>125</sup>, Y<sup>90</sup>, Re<sup>186</sup>, Re<sup>188</sup>, Sm<sup>153</sup>, Bi<sup>212</sup>, P<sup>32</sup> 及 Lu 的放射性同位素。

[0217] 抗体及细胞毒性物质的缀合物可利用多种双功能蛋白质交联剂加以生产,例如 3-(2-吡啶二硫代)丙酸-N-琥珀酰亚胺酯 (N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio)propionate (SPDP))、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯 (succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)、亚氨基硫烷盐酸盐 (iminothiolane (IT))、亚氨酸酯 (imidoesters) 的双官能基衍生物(例如二亚胺代己二酸二甲酯盐酸盐 (dimethyladipimide HCl))、活性酯类(例如双琥珀酰亚胺辛二酸酯 (disuccinimidyl suberate))、醛类(例如戊二醛 (glutaraldehyde))、叠氮 (bis-azido)

化合物(例如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺(bis(p-azidobenzoyl)hexanediamine))、双重氮(bis-diazonium)衍生物(例如双-(对重氮苯酰基)-乙二胺(bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine))、二异氰酸酯类(diisocyanates)(例如2,6-二异氰酸甲苯酯(toluenes,2,6-diisocyanate))、及双活性氟(bis-active fluorine)化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯(1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene))。举例而言,可如Vitetta等,Science,238:1098(1987)中所述般制备蓖麻毒蛋白(ricin)免疫毒素。碳14标记的1-异氰硫苯基-3-甲基二乙烯三胺五乙酸(1-isothiocyanatobenzyl-3-methyldiethylenetriaminepentaacetic acid(MX-DTPA))为例示的放射性核苷酸(radionucleotide)缀合至抗体的螯合剂,见WO 1994/11026。接头可为在细胞中辅助细胞毒性物质药物的释放的“可切割接头”(cleavable linker),例如可使用酸敏感接头、肽酶敏感性接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari等,Cancer Research,52:127-131(1992))。

[0218] 可选地,可例如通过重组技术或肽合成来生产包含人源化vWF抗体及细胞毒性物质的融合蛋白。

[0219] 在又一实施方案中,可将人源化vWF抗体缀合至“受体”(例如抗生蛋白链菌素),以用于肿瘤预定位,其中将抗体-受体缀合物给予病人,接着利用清除剂而由循环中移除未结合的缀合物,且接着施用缀合至细胞毒性物质(例如放射性核苷酸)的“配体”(例如抗生物素蛋白)。

[0220] 还可通过将人源化vWF抗体缀合至转化前药(例如肽基化疗剂,见WO1981/01145)为活性抗癌药(见例如WO 198807378及美国专利第4,975,278号)的前药活化酶上,而将本发明的抗体使用于ADEPT中。

[0221] 可用于ADEPT的免疫缀合物的酶成分包含能够以将其转换成更具活性和细胞毒性的方式作用于前药的任何酶。

[0222] 可使用的酶包含但不限于:有助于将含磷酸盐的前药转化成游离药(free drug)的碱性磷酸酶(phosphatase);有助于将含硫酸盐的前药转化成游离药的芳基硫酸酯酶(arylsulfatase);有助于将无毒5-氟胞嘧啶(5-fluorocytosine)转化成抗癌药5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)的胞嘧啶脱氨酶(cytosine deaminase);有助于将含肽前药转化成游离药的蛋白酶(protease),例如沙雷菌属(serratia)蛋白酶、嗜热菌蛋白酶(thermolysin)、枯草杆菌蛋白酶(subtilisin)、羧肽酶(carboxypeptidase)及组织蛋白酶(cathepsin)(例如组织蛋白酶B及L);可用于转化包含 $\beta$ -氨基酸取代基的前药的D-丙氨酰羧肽酶(D-alanylcarboxypeptidase);有助于将糖基化(glycosylated)前药转化成游离药的糖类切割酶(carbohydrate-cleaving enzyme),例如 $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -galactosidase)及神经氨酸酶(neuraminidase);有助于将以 $\beta$ -内酰胺( $\beta$ -lactam)衍生的药物转化成游离药的 $\beta$ -内酰胺酶( $\beta$ -lactamase);及有助于分别将以苯氧乙酰基或苯乙酰基在其胺氮上加以衍生的药物转化成游离药的青霉素酰胺酶,例如为青霉素V酰胺酶及青霉素G酰胺酶。可选地,可利用具有酶活性的抗体(在此领域中还称为“催化性抗体”(abzyme)),将本发明的前药转化成游离活性药(见例如Massey,Nature,328:457-458(1987))。可如此处所述来制备抗体-催化性抗体缀合物,以将催化性抗体递送至肿瘤细胞族群。

[0223] 通过本领域中所熟知的技术,例如上述使用异双功能(heterobifunctional)交

联剂,可使酶共价结合至人源化 vWF 抗体。可选地,可利用本领域中所熟知的重组 DNA 技术,建构至少包含本发明的抗体的抗原结合区的融合蛋白,该抗原结合区连结至一适当酶的至少功能活性部分(见例如 Neuberger 等, Nature, 312 :604-608(1984))。

[0224] 此处考虑抗体的其它修饰。举例而言,可将抗体连结至各种非蛋白质类聚合物其中之一,例如聚乙二醇 (polyethylene glycol)、聚丙二醇 (polypropylene glycol)、聚氧化烯炔类 (polyoxyalkylene)、或聚乙二醇及聚丙二醇的共聚合物;举例而言,还可使抗体埋入于通过例如凝聚 (coacervation) 技术或界面聚合(例如分别为羟甲基纤维素 (hydroxymethylcellulose) 或明胶-微胶囊 (gelatin-microcapsule) 及聚甲基丙烯酸甲酯 (poly-(methylmethacrylate)) 微胶囊) 所制备的微胶囊内,埋入胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳液、纳米颗粒及纳米胶囊)或巨乳液中。此类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences(第 16 版,由 Oslo, A. 所编(1980))中。

[0225] 还可将此处所公开的人源化 vWF 抗体配制成免疫脂质体。通过本领域中已知的方法,制备包含抗体的脂质体,例如: Epstein 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :3688(1985); Hwang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 :4030(1980); 美国专利第 4,485,045 及 4,544,545 号;及 1997 年 10 月 23 日公开的 WO 1997/38731 中所述。具有增加的循环时间的脂质体则公开于美国专利第 5,013,556 号中。

[0226] 特别有用的脂质体可利用包含卵磷脂 (phosphatidylcholine)、胆固醇、及 PEG 衍生磷脂酰乙醇胺 (PEG-derived phosphatidylethanolamine, PEG-PE) 的脂质组合物并通过反相蒸发法加以产生。透过确定孔径的过滤器来挤出脂质体,以产生具有期望直径的脂质体。可透过二硫化物互换反应,将本发明的抗体的 Fab' 片段缀合至如 Martin 等, J. Biol. Chem., 257 :286-288(1982) 中所述的脂质体。可任选地将化疗剂包含于脂质体内。见 Gabizon 等, J. National Cancer Inst., 81(19) :1484(1989)。

[0227] 载体、宿主细胞及重组方法

[0228] 本发明提供编码具有 vWF 特异性的人源化抗体及其结合片段的分离核酸、载体、及包含该核酸的宿主细胞、及生产抗体或其结合片段的重组技术。

[0229] 就抗体的重组生产而言,可将编码该抗体的核酸分离出来或将其插入可复制载体中,以更进一步进行克隆(扩增 DNA)或用于表达。可利用传统方法(例如利用能够特定地结合至编码抗体的重链及轻链的基因的寡核苷酸探针)分离并测序编码单株抗体的 DNA。可利用许多载体。载体组成通常包含但不限于下列其中一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个的标记基因、增强子元件 (enhanced element)、启动子 (promoter)、及转录终止序列 (transcription-termination sequence)。

[0230] (i) 信号序列组成

[0231] 如此处所述的人源化 vWF 抗体不仅可直接以重组方式生产,还可为具有异源 (heterologous) 多肽的融合多肽形式,其优选为在成熟蛋白质或多肽的 N 端 (N-terminus) 上具有特定断裂位点。异源讯号序列优选地可为宿主细胞所识别及加工(即由信号肽酶加以断裂)。就未能识别及处理天然人源化 vWF 抗体信号序列的原核生物宿主细胞而言,可利用由例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp、或耐热性肠毒素 II 前导区 (enterotoxin II leader) 中所选择出的原核生物信号序列来取代信号序列;就酵母菌分泌而言,天然信号序列可通过例如酵母菌转化酶前导区、 $\alpha$ -因子前导区(包含酵母菌属 (Saccharomyces)

及克鲁维酵母菌属 (*Kluyveromyces*) 的  $\alpha$ -因子前导区)、酸性磷酸酶前导区、白色念珠菌 (*C. albicans*) 葡糖淀粉酶前导区、或 WO 1990/13646 中所述的信号加以取代。在哺乳类细胞表达中,可使用哺乳类细胞信号序列以及病毒分泌前导区 (viral secretory leader),例如单纯疱疹病毒 (herpes simplex) gD 信号。

[0232] 此类前体区所用的 DNA 可在读码框中被连接至编码人源化 vWF 抗体的 DNA。

[0233] (ii) 复制元件的起点

[0234] 表达及克隆载体两者皆包含能够使载体在一个或多个的选定宿主细胞中复制的核酸序列。一般而言,在克隆载体中,此序列可使载体独立于宿主染色体 DNA 而复制,且包含复制的起点或自发性复制序列 (autonomously replicating sequences)。已熟知许多细菌、酵母、及病毒的此类序列。来自质粒 pBR322 的复制起点适用于大多数革兰氏阴性菌,2 $\mu$  质粒起点适用于酵母,且各种的病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV 或 BPV) 可用于在哺乳动物细胞的克隆载体。一般而言,哺乳动物表达载体 (一般可使用 SV40 起源,仅因为其含有早期启动子) 并不需要复制元件的起点。

[0235] (iii) 筛选基因元件

[0236] 表达及克隆载体可包含筛选基因,还称为筛选标记 (selectable marker)。代表性筛选基因编码下列蛋白质:(a) 赋予对抗生素或其它毒素 (例如氨基青霉素、新霉素 (neomycin)、甲氨蝶呤、或四环霉素) 的抗性、(b) 补充营养缺陷 (auxotrophic deficiency)、或 (c) 供应无法由复合培养基中得到的必须或期望营养,例如编码杆菌 (*Bacilli*) 的 D-丙氨酸 (D-alanine) 消旋酶 (racemase) 的基因。

[0237] 筛选方案的实例为利用药物以阻止宿主细胞的生长。这些成功地以异源基因加以转化 (transformed) 的细胞生产提供抗药性的蛋白质,因此在选择方案中存活下来。此种显性选择的实例使用新霉素、霉酚酸 (mycophenolic acid)、及潮霉素 (hygromycin) 等药物。

[0238] 哺乳动物的适当筛选标记的另一例为可识别能够占有人源化 vWF 抗体编码核酸的细胞者,例如 DHFR、胸腺激酶 (thymidine kinase)、重金属蛋白质 -I 及 II (metallothionein-I&II) (优选为灵长类重金属蛋白质基因)、腺核苷脱胺酶 (adenosine deaminase)、鸟氨酸去羧酶 (ornithine decarboxylase) 等。

[0239] 举例而言,通过在含有灭杀除癌 (methotrexate, Mtx) 培养基中培养转化体 (transformant),首先识别出以 DHFR 筛选基因加以转化的细胞。当使用野生型 DHFR 时的适当宿主细胞为缺乏 DHFR 活性的中国仓鼠卵巢细胞株 (CHO cell line)。

[0240] 可选地,可通过在含有筛选标记的选择剂 (像是氨基糖苷类抗体,例如康霉素 (kanamycin)、新霉素、或 G418,见美国专利第 4,965,199 号) 的培养基中的细胞生长,选择以编码人源化 vWF 抗体、野生型 DHFR 蛋白质、及另一筛选标记 (例如氨基糖苷 3'-磷酸转移酶 (aminoglycoside 3'-phosphotransferase, APH)) 加以转化或共转化的 DNA 序列宿主细胞 (尤其是包含内生 DHFR 的野生型宿主)。

[0241] 用于酵母菌中的适当筛选基因可为存在于酵母菌质粒 YRp7 中的 *trp1* 基因 (Stinchcomb 等, *Nature*, 282:39(1979)), *trp1* 基因为色氨酸 (tryptophen) 中缺乏生长能力的酵母菌突变株 (例如 ATCC 44,076 或 PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12(1997)) 提供筛选标记。酵母菌宿主细胞染色体组 (genome) 中 *trp1* 损伤 (lesion) 的存在接着为通过

在无色胺酸下的生长而检测转化 (transformation) 提供了一有效环境 ;同理,可利用带有 Leu2 基因的已知质粒,补充缺乏 Leu2(Leu2-deficient) 的酵母菌株 (ATCC 20,622 或 38,626)。

[0242] 此外,可利用衍生自 1.6  $\mu$ m 圆形质粒 pKD1 的载体,进行克鲁维酵母菌的转化 ;可选地, K. lactis. Van den Berg, Bio/Technology, 8 :135(1990) 中有描述大规模生产重组小牛凝乳酶的表达系统。吾人已公开用于以克鲁维酵母菌属的工业菌株来分泌成熟重组人类血清蛋白的稳定多复制数 (multi-copy) 表达载体,见 Fleer 等, Bio/Technology, 9 :968-975(1991)。

[0243] (iv) 启动子组成

[0244] 表达及克隆载体通常包含可由宿主生物加以识别的启动子,且可被操作以连结至 vWF 抗体编码核酸。原核生物宿主适用的启动子包含 phoA 启动子、 $\beta$ -内酰胺酶及乳糖启动子系统、碱性磷酸酶、色胺酸 (trp) 启动子系统、及例如 tac 启动子的嵌合 (hybrid) 启动子 ;然而,其它已知的细菌启动子还为合适。用于细菌系统的启动子还可包含可被操作连结至编码人源化 vWF 抗体 DNA 的 Shine-Dalgarno (S. D.) 序列。

[0245] 已知真核生物的启动子序列。真核生物基因具有位于转录起始的位点上游约 25 至 30 个碱基 (bases) 的富 AT(AT-rich) 区,在许多基因的转录起始点上游 70 至 80 个碱基所发现的另一序列为 CNCAAT (SEQ ID NO :31) 区,其中 N 可为任何核苷酸。在大多数真核生物的 3' 端为 AATAAA (SEQ ID NO :32) 序列,此序列可能为附加多 A 尾部 (poly A tail) 至编码序列的 3' 端的信号。可将这些序列适当地插入真核生物的表达载体内,用于酵母菌的适当启动序列 (promoting sequences) 包含 :用于 3-磷酸甘油酸激酶 (3-phosphoglycerate kinase) 或其它糖解酶 (例如烯醇酶 (enolase)、甘油醛-3-磷酸去氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、己糖激酶 (hexokinase)、丙酮酸去羧酶 (pyruvate decarboxylase)、磷酸果糖激酶 (phosphofructokinase)、葡萄糖-6-磷酸异构酶 (glucose-6-phosphate isomerase)、3-磷酸甘油酸变位酶 (3-phosphoglycerate mutase)、丙酮酸激酶 (pyruvate kinase)、三碳糖磷酸异构酶 (triosephosphate isomerase)、磷酸葡萄糖异构酶 (phosphoglucose isomerase)、及葡萄糖激酶 (glucokinase)) 的启动子。

[0246] 其它为具有由生长条件加以控制的额外转录优势的可诱导启动子的酵母菌启动子可为下列蛋白质的启动子区 :乙醇去氢酶 2、异细胞色素 C、酸性磷酸酶、与氮代谢相关联的降解酶、重金属蛋白质、甘油醛-3-磷酸去氢酶、及负责麦芽糖及半乳糖利用的酶。更进一步说明用于酵母菌表达中的适当载体及启动子,见例如欧洲专利第 73,657 号。酵母菌增强子 (enhancer) 与酵母菌启动子一同使用还相当有利。

[0247] 由哺乳类宿主细胞中的载体转录人源化 vWF 抗体,可例如通过由多瘤 (polyoma) 病毒、禽痘 (fowlpox) 病毒、腺病毒 (如腺病毒 2)、牛乳突状瘤病毒、禽类肉瘤病毒、细胞巨大病毒、反转录病毒、B 型肝炎病毒且最优选为猿猴病毒 40 (SV40) 的染色体组所得到的启动子、异源哺乳类启动子 (例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、热休克启动子加以控制,条件是此类启动子可兼容于宿主细胞系统。

[0248] 吾人可便利地取得 SV40 病毒的早期及晚期启动子,以作为还包含复制的 SV40 病毒起源的 SV40 限制片段 ;吾人可便利地取得人类细胞巨大病毒的立即早期 (immediate

early) 启动子,以作为 HindIII E 限制片段。已揭示利用牛乳突状瘤病毒作为载体而表达哺乳类宿主中的 DNA 的系统,见例如美国专利第 4,419,446 号,此系统的修饰系说明于例如美国专利第 4,601,978 号中。Reyes 等, *Nature*, 297:598-601 (1982) 描述在控制来自单纯疱疹病毒的胸腺激酶 (thymidine kinase) 启动子的下,将人类  $\beta$ -干扰素 cDNA 表达于鼠类细胞中。

[0249] (v) 增强子元素组成

[0250] 通过较高等真核生物而转录编码本发明的人源化 vWF 抗体的 DNA,可利用将增强子序列插入于载体中来提升。今已知来自哺乳动物基因(血球蛋白、弹性蛋白酶、蛋白素、甲型胎儿蛋白及胰岛素)的有用增强子序列;然而,一般来说,吾人可使用来自真核生物细胞病毒的增强子,例子包括:在复制起点的晚期侧上的 SV40 增强子(bp 100-270)、细胞巨大病毒早期启动子的增强子、在复制起点的晚期侧上的多瘤增强子、及腺病毒增强子。还说明用于活化真核生物增强子的增强元素。可在人源化 vWF 抗体编码序列的 5' 或 3' 位置将增强子切成载体,但优选为在由启动子起算的 5' 位点。

[0251] (vi) 转录终止组成

[0252] 用于真核生物宿主细胞(例如酵母菌、真菌、昆虫、植物、动物、人类、或来自其它多细胞生物体的有核细胞)中的表达载体可包含终止转录或稳定 mRNA 所必须的序列,此类序列一般可来自于真核生物或病毒 DNAs 或 cDNAs 的未转译区的 5' 端(有时为 3' 端),这些未转译区包含在编码人源化 vWF 抗体的 mRNA 的未转译部分中经转录成为多聚腺苷酸化(polyadenylated)片段的核苷酸片段。一有用的转录终止组成为牛生长荷尔蒙多聚腺苷酸化(polyadenylation)区(见例如 WO 1994/11026 及其中所公开的表达载体)。

[0253] (vii) 宿主细胞的筛选及转化

[0254] 用于克隆或表达载体中的 DNA 的适当宿主细胞包含各种的原核生物、酵母菌、或较高等的原核生物细胞,用于此目的的当适原核生物包含真细菌类(eubacteria)(例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,像是肠杆菌科(Enterobacteriaceae)如大肠菌属(*Escherichia*)(例如大肠杆菌)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、伊文氏杆菌属(*Erwinia*)、克留氏菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌数(*Proteus*)、沙门杆菌属(*Salmonella*)(例如 *Salmonella typhimurium*)、锯杆菌属(*Serratia*)(例如 *Serratiamarcescans*)、志贺杆菌属(*Shigella*)、以及杆菌(*Bacilli*)如 *B. subtilis* 及 *B. licheniformis*、假单孢菌属(*Pseudomonas*)如 *P. aeruginosa* 及链霉菌(*Streptomyces*)。大肠杆菌克隆宿主包含大肠杆菌 294(ATCC31,446)、大肠杆菌 B、大肠杆菌 X1776(ATCC 31,537) 及大肠杆菌 W3110(ATCC 27,325)。

[0255] 除了原核生物以外,真核微生物(例如丝状真菌或酵母菌)为适合的人源化 vWF 抗体编码载体的克隆或表达宿主,可将 *Saccharomyces cerevisiae* 或常见的面包酵母菌用于表达。此外,其它若干属、种、及菌株还为一般可得到且可使用者,例如;*Schizosaccharomyces pombe*; 克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*) 宿主,例如 *K. lactis*, *K. fragilis*(ATCC12,424), *K. bulgaricus*(ATCC 16,045), *K. wickerhamii*(ATCC 24,178), *K. waltii*(ATCC 56,500), *K. drosophilum*(ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, 及 *K. marxianus*; *yarrowia*(EP 402,226); *Pichiapastoris*(EP 183,070); 念珠菌属(*Candida*); *Trichoderma reesia*(EP244,234); 粗厚神经孢子菌(*Neurospora crassa*);

Schwanniomyces 例如 Schwanniomyces occidentalis; 及丝状真菌, 例如红霉菌属 (Neurospora)、青霉菌属 (Penicillium)、Tolypocladium、及曲菌属 (Aspergillus) 宿主如 A. nidulans 及 A. niger。

[0256] 用于表达糖化 (glycosylated) 的人源化 vWF 抗体的适当宿主细胞可来自于多细胞生物体, 真核生物细胞的例子包含植物、昆虫及脊椎动物细胞。吾人已识别出许多昆虫病毒 (baculoviral) 株及变体、以及来自例如 Spodoptera frugiperda (毛虫)、Aedes aegypti (蚊子)、Aedes albopictus (蚊子)、Drosophila melanogaster (果蝇)、及 Bombyx mori 等宿主的对应可容许的昆虫宿主细胞。有许多种转染 (transfection) 用的病毒株可资公众利用, 例如 Autographa californica NPV 及 Bombyx mori NPV 的 Bm-5 株, 且可利用此类病毒作为此处根据本发明的病毒, 尤其用于 Spodoptera frugiperda 细胞的转染上。

[0257] 还可利用棉花、玉米、马铃薯、黄豆、牵牛花、蕃茄、及烟草的植物细胞培养作为宿主。

[0258] 然而, 最大的兴趣已经在脊椎动物细胞, 且在培养 (组织培养) 中的脊椎细胞的繁殖已成为例行程序。可使用的哺乳类宿主细胞株的范例包含: ChK2 细胞 (Chromos Molecular Systems Inc.); 由 SV40 (COS-7, ATCC CRL1651) 加以转化的猴子肾脏 CV1 细胞株; 人类胚胎肾脏细胞株 (293 或用以在悬浮培养基中生长而加以次克隆 (subcloned) 的 293 细胞, Graham 等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); 幼仓鼠肾脏细胞 (BHK, ATCC CCL 10); 人类胚胎肾脏 (HEK) 293 细胞 (Simmons, 1990 Exp Physiol. 75:309); SP2 脾脏-骨髓瘤融合细胞 (Haas 和 Wabl, 1984, PNAS 81:7185); 中国仓鼠卵巢细胞 /-DHFR (CHO, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980), 包含 DG44 (Urlaub 等, Som. Cell 和 Mol. Gen., 12:555-566 (1986)) 及 DP12 细胞株); 小鼠赛特利 (sertoli) 细胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); 猴子肾脏细胞 (CV1 ATCC CCL 70); 非洲绿猴肾脏细胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587); 人类子宫颈癌细胞 (HELA, ATCC CCL 2); 犬肾脏细胞 (MDCK, ATCC CCL 70); 水牛鼠肝脏细胞 (BRL3A, ATCC CRL 1442); 人类肺脏细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人类肝脏细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳房瘤细胞 (MMT 060562, ATCC CCL 51); TRI 细胞 (Mather 等, Annals N. Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); MRC 5 细胞; FS4 细胞; 及人类肝肿瘤细胞株 (Hep G2)。利用上述用于生产人源化 vWF 抗体的表达或克隆载体而将宿主细胞转化, 并于视需要而调整的传统培养基中培养, 以诱发启动子、筛选转化体 (transformant)、或放大编码期望序列的基因。

[0259] 还可使用表达高水平抗体的稳定细胞株, 以生产本发明的人源化抗体。例如, 可利用突变的-整合酶 (integrase) (例如 ACE 整合酶) 结合穿梭载体 (shuttle vector), 以异源基因序列载入基于鼠类人工染色体表达 (ACE) 平台的高产量哺乳类蛋白质表达系统中, 该 ACE 平台已被设计成含有多个具位点特异性的重组受体位点 (recombination acceptor sites) (Lindenbaum 等, Nucl. Acid Res. 32(21):e172 (2004); 美国专利申请案第 2003/0119104 A1 号及第 2006/0246586 A1 号)。可利用此系统产生用于表达所筛选的人源化变体及 NMC-4 嵌合体的稳定细胞株。

[0260] (viii) 培养宿主细胞

[0261] 可将可用于生产人源化 vWF 抗体的宿主细胞培养于多种培养基中。商品化培养基例如 Ham's F10 (Sigma)、最低必需培养基 (Minimal Essential Medium, MEM (Sigma))、

RPMP-1640(Sigma)、及 Dulbecco ' s Modified Eagle ' s Medium((DMEM), Sigma) 均适合用来培养宿主细胞;此外,在例如:Ham 等, Meth. Enz. 58 :44(1979);Barnes 等, Anal. Biochem., 102 :255(1980);美国专利第 4,767,704 号、第 4,657,866 号、第 4,927,762 号、第 4,560,655 号、或第 5,122,469 号;WO 1990/03430;WO 1987/00195;或美国专利第 Re. 30,985 号中所述的任何培养基,皆可用作宿主细胞的培养基。可视需要以荷尔蒙和/或其它生长因子(例如胰岛素、运铁蛋白(transferrin)或表皮生长因子)、盐类(例如氯化钠、钙、镁、及磷酸盐)、缓冲液(例如 HEPES)、核苷酸(例如腺核苷酸、胸腺嘧啶核苷酸)、抗生素(例如 GENTAMYCIN 药物)、微量元素(定义成通常以微莫耳范围的最终浓度存在的无机化合物)、及葡萄糖或等量能源补充至任何这些培养基;还可包含技术人员已知的适当浓度的任何其它必需补充料。可对所筛选的表达用宿主细胞使用各种培养条件,例如温度、pH。

#### [0262] (ix) 人源化 vWF 抗体的纯化

[0263] 当使用重组技术时,抗体可产生于胞内或间膜区域(periplasmic space)中、或者直接分泌至培养基内。若抗体产生于胞内,第一步可通过例如离心或超过滤而移除宿主细胞或细胞溶解片段的微粒碎片。Carter 等, Bio/Technology, 10 :163-167(1992) 描述分泌至大肠杆菌间膜区域的抗体的分离程序;要言的,于醋酸钠(pH 3.5)、EDTA、及苯甲磺酰基氟(phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))存在下将细胞糊(cell paste)解冻约 30 分钟,可通过离心而移除细胞碎片。在抗体分泌至培养基内的情况下,通常首先浓缩来自此类系统的上澄液,包含利用商品化蛋白质浓缩过滤器,例如 AMICON 或 MILLIPORE PELLICON 超过滤单元。可将如苯甲磺酰基氟(phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))的蛋白酶抑制剂包含于前述步骤任一者中以抑制蛋白质分解(proteolysis),且可包含抗生素以防止偶发性污染扩大。

[0264] 可利用例如氢氧磷灰石层析法(hydroxylapatite chromatography)、凝胶电泳法、透析法、及亲和层析法而纯化出由细胞制备而来的抗体成分,其中亲和层析法为优选的层析技术。蛋白质 A 作为亲和力配位体(ligand)的适合性系取决于存在于抗体中的任何免疫球蛋白 Fc 结构域的物种及同种型(isotype)。可利用蛋白质 A 来纯化基于人类  $\gamma$  1、 $\gamma$  2、或  $\gamma$  4 重链的抗体(Lindmark 等, J. Immunol. Meth, 62 :1-13(1983));可利用蛋白质 G 作为小鼠抗体同种型及人类  $\gamma$  3(Guss 等, EMBO J., 5 :15671575(1986))。亲和力配位体黏附的基质(matrix)可为洋菜糖(agarose),但还可使用其它基质。机械上稳定的基质,例如可控孔径玻璃(controlled-pore glass)或聚(苯乙烯-二乙烯基苯)(poly(styrene-divinyl-benzene)),容许比使用洋菜糖所能达到者更快的流速及更短的处理时间。在抗体包含 CH3 结构域的情形中,可将 BAKERBOND ABX 树脂(J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.)用于纯化;还可根据待回收的抗体而使用其它的蛋白质纯化技术,例如离子交换管柱分馏、乙醇沉淀、逆相 HPLC、硅土层析(chromatography on silica)、肝素(heparin)SEPHAROSE 层析、阳离子或阴离子交换树脂层析(例如聚天门冬胺酸(polyaspartic acid)管柱)、色层聚焦(chromatofocusing)、SDS-PAGE、及硫酸铵沉淀法。

#### [0265] 药物制剂

[0266] 兹提供包含具有 vWF 特异性的人源化抗体的药物配方。可通过混合具有期望纯度的抗体与非必须的药物上可接受的载体、赋形剂、或安定剂(Remington ' s



Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), 而制备具有冷冻干燥配方或水溶液形式的人源化 vWF 抗体的储存用配方。可接受的载体、赋形剂、或安定剂为在所使用的剂量及浓度下对接受者不具毒性者, 且其含有: 缓冲剂, 例如磷酸盐、柠檬酸盐、及其它有机酸; 抗氧化剂, 包含抗坏血酸、甲硫胺酸 (methionine); 防腐剂, 例如十八烷基二甲基苄基氯化铵 (octadecyldimethylbenzyl ammoniumchloride)、氯化六羟季铵 (hexamethonium chloride)、羟基氯苯胺 (benzalkonium chloride)、氯化苯胺松宁 (benzethonium chloride)、酚 (phenol)、丁醇 (butyl alcohol) 或苄醇 (benzyl alcohol)、如对羟基苯甲酸甲酯 (methyl paraben) 或对羟基苯甲酸丙酯 (propyl paraben) 的烷基对羟基苯甲酸酯 (alkyl parabens)、儿茶酚 (catechol)、间苯二酚 (resorcinol)、环己醇 (cyclohexanol)、3-戊醇 (3-pentanol)、及间甲苯酚 (m-cresol); 低分子量 (小于约 10 个残基) 多肽; 蛋白质, 例如血清蛋白、白明胶或免疫球蛋白; 亲水性聚合物, 例如聚乙烯四氢吡咯酮 (polyvinylpyrrolidone); 氨基酸, 例如甘胺酸 (glycine)、麸酰胺 (glutamine)、天门冬酰胺酸 (asparagine)、组胺酸 (histidine)、精胺酸 (arginine) 或离胺酸 (lysine); 单糖、双糖及其它包含葡萄糖、甘露糖 (mannose)、或糊精 (dextrins) 的碳水化合物; 螯合剂, 例如 EDTA; 糖类, 例如蔗糖、甘露醇 (mannitol)、海藻糖 (trehalose) 或山梨醇 (sorbitol); 盐类形成相对离子 (counter-ion), 例如钠; 金属络合物 (例如锌-蛋白质络合物); 和 / 或非离子性界面活性剂, 例如 TWEEN、PLURONICS、或聚乙二醇 (polyethylene glycol, PEG)。优选的冷冻干燥人源化 vWF 配方说明于 WO 1997/04801 中, 其以参考数据并入于此。

[0267] 此处的配方还可包含一种以上特定的治疗症状所必须的活性化合物, 优选为具有不会彼此产生不利影响的互补活性者; 可选地, 或此外, 组成还可包含化疗剂、细胞毒性剂、细胞介素 (cytokine)、生长抑制剂、抗激素剂、人源化 vWF 药物、抗血管新生剂 (anti-angiogenic agent)、和 / 或保心药 (cardioprotectant), 此类分子适合以能够针对需要目的发挥效用的量的组合存在。

[0268] 还可将有效成分网罗在通过例如凝块 (coacervation) 技术或接口聚合 (例如分别为羟甲基纤维素 (hydroxymethylcellulose) 或明胶-微胶囊 (gelatin-microcapsule) 及聚甲基丙烯酸甲酯 (poly-(methylmethacrylate)) 微胶囊) 而在胶体药物传递系统 (例如脂质粒、卵蛋白微球体、微乳液、纳米粒子及纳米胶囊) 或巨乳液中加以制备的微胶囊内。此类技术公开于 Remington's Pharmaceutical Sciences (第 16 版, 由 Oslo, A. 所编着 (1980)) 的专书中。

[0269] 可制备持续释放 (sustained-release) 制剂。持续释放制剂的例子包括含有抗体的固态疏水性聚合物的半透性基质, 其中基质用成型物品的形式存在, 例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包含聚酯、水凝胶 (例如聚 (甲基丙烯酸 2-羟乙酯) 或聚乙烯醇)、聚乳酸交酯 (polylactide) (美国专利第 3, 773, 919 号)、L-麸胺酸及 -乙基-L-麸胺酸的共聚物、非可降解的乙烯-乙酸乙烯酯共聚物、可降解的乳酸-甘醇酸 (lactic acid-glycolic acid) 共聚物 (例如 LUPRON DEPO (由乳酸-甘醇酸共聚物及柳普林 (leuprolide acetate) 所组成的可注射微球体) 及聚-D-(-)-3-羟丁酸)。

[0270] 待用于活体内 (in vivo) 服用的配方必须为无菌, 此系透过经由无菌过滤膜的过滤加以完成。

[0271] 利用人源化 vWF 抗体的治疗

[0272] 可利用人源化 vWF 抗体或其结合片段来治疗各种的 vWF 相关疾病或紊乱,例示的疾病或病症包含血栓性疾病或紊乱。血栓性疾病或紊乱可包含心血管疾病或例如缺血性卒中的脑血管疾病。在某些实施方案中,心血管疾病可为动脉粥样硬化症、再狭窄、心绞痛、急性心肌梗塞、急性冠状动脉综合症、或与糖尿病相关联的心血管异常;在某些实施方案中,血栓性疾病或紊乱为血管发炎、静脉血栓、镰刀形细胞病、异种移植排斥、外周血管病、血栓性血小板减少性紫癜症、囊性纤维化、血管性痴呆、雷诺病、类风湿性关节炎、或糖尿病;在某些实施方案中,脑血管疾病包含由大脑动脉阻塞及小腔隙阻塞两者所引起的缺血性卒中以及血管性痴呆。还可利用人源化 vWF 抗体来预防再发性中风或由脑血管发炎所引发的中风起始。在急性冠状动脉综合症的情况中,人源化 vWF 抗体或其结合片段尤其适合用来治疗 ST 段 (ST-segment) 诊断的受试者;还可将人源化 vWF 抗体或其结合片段用于术后治疗,以预防血块形成。

[0273] 再者,可利用体内诊断测定法来评估 vWF 的过表达或扩增,例如通过施用结合待测分子且以可检测的标记(例如放射性同位素)加以标记的分子(例如抗体),并在外部扫描病患以定位该标签。

[0274] 在某些实施方案中,可将包含与细胞毒性物质缀合的人源化 vWF 抗体的免疫缀合物给予病患;优选免疫缀合物和/或其结合的人源化 vWF 抗体被细胞内化,从而提升了免疫缀合物在杀死其所结合的癌细胞上的治疗效用。在一优选实施方案中,细胞毒性物质(包含例如美登醇(maytansinoid)、卡奇霉素、核糖核酸酶及 DNA 内切酶)靶定或干扰癌细胞内的核酸;在另一实施方案中,细胞毒性物质(例如紫杉烷(taxane)或埃博霉素(epothilone))可靶定或干扰癌细胞内的微管及依赖微管的有丝分裂(microtubule-dependent mitosis)。

[0275] 可根据已知的方法,例如以团注方式或通过一段时间内的连续式输注的静脉内施用,通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内、口服、局部、或吸入等途径,将人源化 vWF 抗体或免疫缀合物施用于病患。抗体的静脉内、腹膜内、或皮下给药为优选;特别优选腹膜内或皮下途径。优选的给药计划可为针对急性疾病单一剂量,而针对慢性疾病则约每三至四周一次,取决于接受治疗的特定哺乳动物、抗体类型、及行医者熟知的其它因素;然而,此处可采用其它的给药计划。

[0276] 可将其它治疗方针结合人源化 vWF 抗体的施用方式。结合的给药方式包含同时用药(co-administration)、利用各自制剂或单一药物制剂、及以任一次序连续给药,其中优选两种(或全部)活性剂同时展现其生物活性的时段。

[0277] 在一实施方案中,治疗方式可包括人源化抗 vWF 抗体与纤维蛋白溶解剂(fibrinolytic agent)和/或抗血小板剂的结合施用,纤维蛋白溶解剂的例子如阿替普酶(alteplase)、去氨普酶(desmotepase)或微纤微蛋白溶酶(microplasmin),抗血小板剂的例子如用于治疗由心肌梗塞或脑梗塞或其它脑血管异常所诱发的局部缺血的阿司匹林、双嘧达莫(dipyridamol)或氯吡格雷(clopidogrel)。

[0278] 还可期望结合人源化 vWF 抗体的施用及针对另一肿瘤相关抗原的抗体的施用。

[0279] 在一实施方案中,本发明的治疗方式涉及人源化 vWF 抗体、哺乳动物中的免疫功能的一个或多个调节剂(例如细胞因子)、以及化疗剂或生长抑制剂的组合给药,包括不同

化疗剂的鸡尾酒疗法的组合用药;优选的化疗剂包含紫杉烷(例如帕尼特西(paclitaxel)及多西紫杉醇(docetaxel))和/或蒽环抗生素。可根据生产厂的用法说明或由熟悉的行医者依经验判定,而使用此类化疗剂的制剂及剂量计划;此类化疗剂的制剂及剂量计划还说明于Chemotherapy Service,编,M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992)。

[0280] 可以已知剂量的抗激素化合物,将人源化vWF抗体与此类分子相结合。抗激素化合物的例子包含:例如他莫昔芬(tamoxifen)的抗雌激素化合物或例如阿那曲唑(anastrozole)的芳香族酶抑制剂;例如奥那司酮(onapristone)的抗黄体酮(anti-progesterone)(见EP 616 812);或例如氟他胺(flutamide)的抗雄性素(anti-androgen)。若欲治疗的癌症为非激素依赖性的,病患先前可能已接受过抗激素疗法,且在癌症变成非激素依赖性之后,可对病患施用人源化vWF抗体(及如此处所述的其它非必须剂方)。

[0281] 就疾病的预防或治疗而言,抗体的适当剂量将取决于如上定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重性及病程(不论施用抗体为预防或治疗的目的)、先前的治疗、病患的临床病史与对抗体的反应、及主治医师的判断。可将抗体一次或在一系列治疗中适当地对病患施用。根据疾病的类型与严重性以及抗体的清除速率,对病患施用的起始候选剂量为约 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 15\text{mg}/\text{kg}$ (例如 $0.1\sim 20\text{mg}/\text{kg}$ )的抗体,不论例如通过一次或多次的分别给药或通过连续输注。一般的日剂量范围可自约 $1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 100\text{mg}/\text{kg}$ 或以上,依据上述的因子而定。根据状况,为了若干天或更久的重复给药,可持续治疗至产生疾病症状的期望抑制效果为止。

[0282] 人源化vWF抗体的优选剂量可在自约 $0.05\text{mg}/\text{kg}\sim$ 约 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的范围内,因此,可对病患施用约 $0.3\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 、或 $10\text{mg}/\text{kg}$ (或其组合)的一个或多个的剂量。可间歇性地施用此剂量,例如每周、每两周、每三周或每四周(例如使病患接受自约2至约20(如6)剂量的人源化vWF抗体);可在开始时施用较高起始剂量(loading dose),接着施用一次或多次较低剂量。例示性的剂量方案包含施用人源化vWF抗体或其结合片段约 $4\text{mg}/\text{kg}$ 的起始剂量,接着维持每周约 $2\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量;然而,还可使用其它剂量方案。此种疗法的进行可通过传统技术及方法加以监测。

[0283] 在评估如此处所述的人源化vWF抗体或其结合片段在狒狒上的有效性及安全性的研究中,已出人意料地发现此种抗体可以极低的剂量(例如在低 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内)有效地预防(例如降低、减轻、或改善)体内的血小板凝集,此为治疗vWF介导的疾病或紊乱的未预期且前所未有的结果。在这些浓度下,皆未观察到出血的临床症状,除了小伤口的出血增加以外(例如在切口出血测试中所测量到的模板出血时间延长和/或出血量);甚至更令人惊讶的是,在自 $\text{ED}_{100}$ 的约1至250倍的剂量下,还未观察到明显的临床出血迹象,尽管有观察到小伤口的出血增加。因此,如此处所述的人源化vWF抗体或其结合片段似乎可有效地治疗人类的vWF介导的疾病或紊乱。

[0284] 因此,可以范围自约 $0.001$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}$ 的治疗有效量,将如此处所述的人源化vWF抗体或其结合片段施用于一受试者(优选为人类);优选的治疗有效量范围为自约 $0.002$ 至约 $20\text{mg}/\text{kg}$ ,更优选自约 $0.002$ 至约 $10\text{mg}/\text{kg}$ ,特别是自约 $0.002$ 至约 $0.4\text{mg}/\text{kg}$ 、更特别自约 $0.005$ 至约 $0.2\text{mg}/\text{kg}$ ,最优选是施用受试者自约 $0.01$ 至约 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 的治疗有效量,优选的受试者为人类。可以一或多个有效治疗剂量,将治疗有效量人源化vWF抗体或其

结合片段施用于一受试者,所施用的有效治疗剂量通常不足以引发明显的临床出血迹象,但却足以抑制血小板凝集;换言之,可施用有效治疗剂量而不会引发明显的临床出血迹象(例如不会产生出血的临床症状,除了小伤口的出血增加以外)。

[0285] 可以范围自约 0.002 至约 0.4mg/kg 或特别为自约 0.005 至约 0.2mg/kg、更特别为自约 0.01 至约 0.1mg/kg 的治疗有效量,将如此处所述的人源化 vWF 抗体或其结合片段施用于一受试者(优选为人类),以在受试者上产生治疗效果(例如减少血栓形成)。

[0286] 可以范围自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至 250 倍、优选为自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至 200 倍、更优选自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至 100 倍的治疗有效量,施用如此处所述的人源化 vWF 抗体或其结合片段,而不致引发明显的临床出血迹象(例如不会产生出血的临床症状,除了小伤口的出血增加以外)。可以单一或多个亚剂量(sub-dose),将如此处所述的治疗有效量人源化 vWF 抗体或其结合片段施用至受试者。优选使用静脉注射方式施用上述有效治疗剂量。在透过皮下途径的给药中,优选的给药总量可在经由静脉注射的给药量的约 1 至 3 倍的范围内,优选为约 2 倍。

[0287] 出血的临床症状可参考由 Serebruany 及 Atar 所述(American Journal of Cardiology, 2007, 卷 99, 册 2, 15, 01, 2007, 页 288-290) 并加以应用至动物模型的 BleedScore 分级,已将 BleedScore 具体地开发成可就出血的类型计分,出血的类型系抗血小板疗法的特征。BleedScore 基于根据出血的严重性来分派点数至临床发现(finding)上,通过加总所有发现的点数,便可获得所产生的分数。出血症状依渐增的严重性被分成三类:1) 表浅(supreficial)出血(每事件 1 得分点数);2) 内部(internal)出血(每事件 3 得分点数);3) 警示性(alarming)出血或以上的组合(每事件 6 得分点数),此方法在判定并记述与现代抗血小板及抗血栓疗法相关联的缓和至中等的出血事件时尤其有用,同时还说明了最严重的出血并发症。表浅出血包含下列准则:容易瘀血(bruising)、小伤口的出血(例如延长的模板出血时间)、出血点(petechia)、瘀斑(ecchymosis);内部出血包含下列准则:血肿(hematoma)、流鼻血(epistaxis)、来自口腔或阴道的失血、黑粪症(melena)、眼睛出血、血尿症(hematuria)、吐血(hematemesis);警示性出血包含下列准则:需要输血(transfusion)、颅内出血(intracranial)、有生命危险。

[0288] 在通过监测血液流经动脉所测量的动脉创伤的动物模型中,血小板凝集的抑制(抑制血小板凝集或足以抑制血小板凝集)可表示所施用的治疗有效量足以抑制闭塞性血栓形成于人为损伤的动脉中。一种以定量方式决定体内血小板凝集抑制的方法为透过在动脉创伤模型中的循环流减缩量(cyclic flow reductions, CFR)的测量,如此,例如,血小板凝集的抑制可表示所施用的治疗有效量足以减少动物中的 CFR 的数目。

[0289] 治疗有效量或有效量可指可有效地改善或预防症状、或延长所治疗受试者的存活时间的剂量,而判定治疗有效量在技术人员的能力范围内,特别是根据此处所提供的详细公开内容。如此处所述的治疗有效量包含可有效地治疗受试者的 vWF 介导的疾病或紊乱的 vWF 抗体量;vWF 抗体的治疗有效量包含治疗或抑制血小板凝集(例如在主动脉、末梢动脉、小动脉、静脉的血栓形成过程中)所需要的用量。

[0290] 有效治疗剂量或有效剂量可指可有效地改善或预防症状、或延长所治疗受试者的存活时间的剂量。如此处所述的有效治疗剂量包含可有效地治疗受试者的 vWF 介导的疾病或紊乱的 vWF 抗体量;如此处所述的有效治疗剂量包含治疗或抑制血小板凝集(例如在主动脉、末梢动脉、小动脉、静脉的血栓形成过程中)的剂量。有效治疗剂量包含 ED<sub>100</sub>,其为足

以将如同由血管中的血流减少量所测量的血栓形成降低约 100% 的有效剂量;如此处所述的 ED<sub>100</sub> 包含足以在 30 分钟的时间内将由血管中的血流减少量降至零的 vWF 抗体量。有效治疗剂量包含能够减少如同由血管中的血流减少量、或由测量血小板凝集减少量的适当离体测试加以测量的血栓形成的剂量,例如至少足以减少约 15%,优选为减少至少 30%,更优选为减少至少 50%,最优选为减少至少 80%,特别是减少至少 100% 的血栓形成。

[0291] 可选地,可将人源化 vWF 抗体连续地或结合放射性治疗(例如照射或引进放射性物质,像是参照 UICC(编), *Klinische Onkologie*, Springer-Verlag(1982) 中所述而适当地施用。

[0292] 如此,本发明更提供具有冯维勒布兰德氏因子(vWF)特异性的人类抗体或其结合片段,其可以范围自 ED<sub>100</sub> 的约 1 至约 250 倍的治疗有效量来施用,而不致引发明显的临床出血迹象。优选人类抗体或其结合片段具有人类 vWF 的 A1 结构域的特异性,具有 vWF 特异性的人类抗体或其结合片段更优选地为具有 vWF 特异性的人源化抗体或其结合片段。

[0293] 制剂

[0294] 在本发明的另一实施方案中,提供了包含可用于治疗上述疾病的材料的制剂(例如人源化 vWF 抗体)。制剂可包含容器及在容器上或与容器相关联的标签(label)或包装说明书;适当的容器包含例如瓶子、小玻璃瓶(vial)、或注射器。容器可由多种材料形成,例如玻璃或塑料;容器盛装了可有效地治疗疾病的组合物,且可具有无菌的接取口(例如容器可为点滴液袋(intravenous solution bag)或者具有可被皮下注射针刺穿的瓶塞的小玻璃瓶)。在该组合物中的至少一活性剂可为此处所述的人源化 vWF 抗体,标签或包装说明书可指出可使用该组合物来治疗特定的疾病,例如癌症。在一实施方案中,标签或包装说明书可指出可使用包含人源化 vWF 抗体的该组合物来治疗 vWF 相关的疾病。

[0295] 再者,制剂可包含:(a) 其中含有组合物的第一容器,其中该组合物包含此处的人源化抗体;及(b) 其中含有组合物的第二容器,其中该组合物包含除了人源化抗体以外的治疗剂。在本发明的此实施方案中的制剂还可包含指出可组合使用第一及第二组合物以治疗 vWF 相关疾病或紊乱的包装说明书,此治疗剂可为前面段落中所述的任何附加疗法(例如血栓溶解剂、抗血小板剂、化疗剂、抗血管生成剂、抗激素化合物、保心药、和/或哺乳动物中的免疫功能调节剂,包含细胞因子)。可选地,或此外,制剂还可包含第二(或第三)容器,其具有可药用的缓冲剂,例如注射用的抑菌水(BWFI)、磷酸盐缓冲的盐水、林格溶液(Ringer's solution)及葡萄糖液;其还可包含其它由商业及使用者立场看来为合宜的材料,包含其它缓冲液、稀释液、过滤器、注射针、及注射器。

[0296] 人源化 vWF 抗体的非治疗性用途

[0297] 人源化 vWF 抗体及其结合片段具有其他的非治疗性应用。举例而言,可将抗体作为亲和力纯化剂;在此程序中,可利用本领域中已知的方法,将抗体固定化在固相上,例如 SEPHADEX™ 树脂或滤纸。可使固定化抗体与含有待纯化的人源化 vWF 蛋白质(或其片段)相接触,之后,可以实质上将移除样本中除了人源化 vWF 蛋白质(其可结合至固定化抗体)以外的所有物质的适当溶剂来洗涤支持物(support)。最后,可以另一适当溶剂(例如 pH5.0 的甘氨酸缓冲液)来洗涤支持物,此溶剂将人源化 vWF 蛋白质与抗体脱离。

[0298] 人源化 vWF 抗体还可用于人类 vWF 蛋白质的诊断测定上,例如检测特殊细胞、组织、或血清内的表达。就诊断应用而言,可以可检测部分来标记抗体。有一般可归类成下列

种类的多种标签可使用：

[0299] (a) 放射性同位素，例如  $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^3\text{H}$ 、及  $^{131}\text{I}$ 。举例而言，可利用 Current Protocols in Immunology，卷 1&2, Coligen 等，编 Wiley-Interscience, New York, N. Y., Pubs. (1991) 中所述的技术用放射性同位素来标记抗体，例如，可利用闪烁计数法 (scintillation counting) 来测量放射性。

[0300] (b) 可使用荧光标签例如稀土螯合剂（铈螯合剂）或荧光素 (fluorescein) 及其衍生物、罗丹明 (rhodamine) 及其衍生物、丹磺酰基 (dansyl)、丽丝胺 (Lissamine)、藻红蛋白 (phycoerthrin) 及德克萨斯红。可利用例如 Current Protocols in Immunology, 同上中所公开的技术，将荧光标记缀合至抗体；可利用荧光计来定量荧光标记。

[0301] (c) 可使用各种的酶 - 底物标记（例如见美国专利第 4, 275, 149 号），这些酶通常催化可利用各种技术加以测量的显色底物的化学变化作用。例如，酶可催化底物中的颜色变化，其可以分光光度测定方式加以测量；可选地，酶可以改变荧光性或化学发光 (chemiluminescence)，定量荧光变化的技术如上所述。化学发光底物可通过化学反应电子激发，且其接着可发出可被测量的光（例如用化学发光光度计）或供给能量至荧光受体。酶标记的例子包含荧光素酶 (luciferases, 例如萤火虫荧光素酶及细菌荧光素酶；美国专利第 4, 737, 456 号)、荧光素 (luciferin)、邻苯二甲腈 (2,3-dihydrophthalazinediones)、苹果酸脱氢酶 (malate dehydrogenase)、尿素酶 (urease)、过氧化酶 (peroxidase, 例如辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase) (HRPO)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase)、 $\beta$ -半乳糖苷酶 ( $\beta$ -galactosidase)、葡糖淀粉酶 (glucoamylase)、溶菌酶 (lysozyme)、糖类氧化酶 (saccharide oxidases)（例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶）、杂环氧化酶（例如尿酸酶 (uricase) 及黄嘌呤氧化酶 (xanthine oxidase))、乳过氧化酶 (lactoperoxidase)、及微过氧化酶 (microperoxidase)。将酶缀合至抗体的技术说明于 O' Sullivan 等, "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay," Methods in Enzym. (编, J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166 (1981)。

[0302] 酶 - 底物组合的例子包含：

[0303] (i) 以过氧化氢酶作为底物的辣根过氧化物酶 (HRPO)，其中过氧化氢酶氧化染料前体（例如邻苯二胺 (orthophenylene diamine) 或 3,3',5,5'-四甲基联苯胺盐酸盐 (3,3',5,5'-tetramethyl benzidine hydrochloride (TMB)))；

[0304] (ii) 以对硝苯磷酸盐 (para-nitrophenyl phosphate) 为显色底物的碱性磷酸盐 (AP)；及

[0305] (iii) 具有显色底物（例如对硝苯- $\beta$ -D-半乳糖酶）或荧光底物 4-甲基伞形酮- $\beta$ -D-半乳糖苷酶 (4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactosidase) 的  $\beta$ -D-半乳糖苷酶 ( $\beta$ -D-Gal)。

[0306] 技术人员可使用多种其它酶 - 底物组合（见例如美国专利第 4, 275, 149 号及第 4, 318, 980 号）。

[0307] 有时可使标记间接地缀合至抗体，技术人员应知达成此目的的各种技术。举例而言，可使抗体与生物素 (biotin) 缀合，且可将上述三大范围的任一标记与抗生物素蛋白 (avidin) 缀合，反之亦然。生物素选择性地与抗生物素蛋白结合，故可以此间接方式将标记

与抗体相缀合；可选地，为达到标记与抗体的间接缀合，可将抗体与小型半抗原 (hapten) (例如地高辛 (digoxin)) 缀合，且可将上述不同种类标记其中之一与抗半抗原抗体 (例如抗地高辛抗体) 相缀合。如此，可完成标记与抗体的间接缀合。

[0308] 在本发明的另一实施方案中，人源化 vWF 抗体不需要被加上标记，且其存在可利用结合至人源化 vWF 抗体的标记抗体加以检测。

[0309] 可将本发明的抗体使用于任何已知的测定方法中，例如竞争性结合测定、直接及间接夹心式测定 (sandwich assays)、及免疫沉淀 (immunoprecipitation) 测定，见 Zola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 页 147-158 (CRC Press, Inc. 1987)。

[0310] 就免疫组织化学而言，肿瘤样本可为新鲜或冷冻或经埋置于石蜡中并以例如福尔马林的防腐剂加以固定。

[0311] 还可将抗体用于体内的诊断测定上。一般而言，可以放射性核素 (radionuclide) (例如  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$  或  $^{35}\text{S}$ ) 将抗体加上标记，使例如可利用免疫闪烁成像 (immunoscintigraphy) 而将肿瘤定位。

[0312] 为方便，本发明的抗体可以试剂盒的形式来提供 (例如预定量的试剂与用以施行诊断测定的使用说明书的套装式组合)。若为抗体用酶来标记的情况，试剂盒可包含酶所需要的底物及辅因子 (cofactor)，例如提供可检测的发色团或荧光团的底物前体；此外，可包含其它添加剂，例如稳定剂、缓冲液 (例如阻断缓冲液 (block buffer) 或细胞溶解缓冲液 (lysis buffer)) 等。可大范围地改变各种试剂的相对量，以提供溶液中实质上将测定的灵敏度最优化了的试剂浓度；尤其，试剂可以干粉末 (通常为冷冻干燥) 的形式加以提供，包括在溶解时将提供具有适当浓度的试剂溶液的赋形剂。

[0313] 人源化 vWF 抗体还可用于体内成像，其中可将标记抗体施用于宿主 (优选为血流)，并测定宿主中标记抗体的存在及位置；此成像技术可适用于血管栓塞的定位 (localization) 或肿瘤的分级及治疗上。抗体可以用在宿主中可检测到的任何部分适当地标记，包括例如可由如核磁共振或其它本领域中已知的装置加以检测的非放射性指示剂。然而，优选标记可为放射性标记，包括碘 (例如  $^{125}\text{I}$  及  $^{131}\text{I}$ )、硒、双功能螯合剂、铜 (例如  $^{67}\text{Cu}$ )、锝 (例如  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ )、及铼 (例如  $^{186}\text{Re}$  及  $^{188}\text{Re}$ ) 等。可通过任何方法将放射性同位素缀合至蛋白质，包括例如金属螯合化合物或乳过氧化酶、或碘化 (iodination) 用的 iodogen 技术。

[0314] 材料的保藏：

[0315] 下列材料已经保藏于德国不伦瑞克 (Braunschweig) 的国家菌种保存中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ))：

[0316] (1) 2008 年 1 月 23 日保藏于 DSMZ、登记号为 DSM 21059 的微生物 (大肠杆菌)，其包含载体 GS264，而 GS264 包含具有编码人源化 NMC-4 变体 H9L9IgG4 轻链的核酸序列的分离核酸；(2) 2008 年 1 月 23 日保藏于 DSMZ、登记号为 DSM 21060 的微生物 (大肠杆菌)，其包含载体 GS265，而 GS265 包含具有编码人源化 NMC-4 变体 H9L9IgG4 重链的核酸序列的分离核酸。此等保藏皆基于微生物有机体保藏专利程序的国际认可布达佩斯协议 (International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure) 及其 (布达佩斯协议) 下的规定而为。

[0317] 在无进一步说明之下，人们相信：在此领域中普通技术人员使用前述说明及下列

例示性实施例,可生产并利用本发明的试剂且实施权利要求的方法。提供下列工作实施例以辅助本发明的实施,且其不应被解释为限制性。

### 实施例

[0318] 实施例 1 :嵌合抗体的建构

[0319] 产生 NMC-4- 人类 Fc 的嵌合体 :包含来自鼠类抗体 NMC-4 的可变区及人类 Fc 区的嵌合抗体用下述方式加以建构。在一例示方法中,是利用抗 vWF 抗体 NMC-4 (例如具有已被公开的可变区氨基酸序列的 IgG1  $\kappa$ ) 作为模板来产生 NMC-4 的 VH 及 VL 区的合成基因序列 (Celikel 等,1997,BloodCells,Molecules 和 Diseases 23 :123-134)。举例而言,NMC-4 的 VH 及 VL 所用的合成基因序列通过采用 Celikel 等中所述的氨基酸序列及利用 VECTOR NTI 软件产生对应的核苷酸序列而产生。

[0320] 表 1 用来产生 NMC-4 嵌合表达质粒的引物 (primers)

[0321]



正向引物	序列	反向引物	序列
<b>重链</b>			
NMC-VH-EcoRI -F	5'-GACGCGAATTCGCAGGTGC AG CTGAAGGAGAGC -3' (SEQ ID NO: 34)	NMC-VH-IgG1-R	5'-CGGATGGGCCCTTGGTGGAAG CGCTGCTCACGGTCACGCTGGT -3' (SEQ ID NO: 35)
hIgG-F	5'-GCTTCCACCAAGGGCC CATCCG -3' (SEQ ID NO: 36)	hIgG-R	5'-CCAGAGACAGGGAGAGGC TCTTCTG -3' (SEQ ID NO: 37)
		IgG1-BamHI-R	5'-ATTAGGATCCTTATCATTACC CAGAGACAGGGAGAGGCT -3' (SEQ ID NO: 38)
hFc-L235E-F	5'-CTCGAGGGGGACCGTCAG TCT TCCTCTT -3' (SEQ ID NO: 39)	hFc-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCCC CTCGAG 3' (SEQ ID NO: 40)
CH2-C1q (-) -F	5'-GGCGTACGCGTGCGCGGTC T CCAACAAAGC -3' (SEQ ID NO: 41)	CH2-C1q (-) -R	5'-CCGCGCACGCGTACGCCTTGC CATTACAGCCA-3' (SEQ ID NO: 42)
4-59 前导 -HindIII- NMC-4	5'-ATTAAGCTTGCCGCCACCA TGA CATCTGTGGTTCTTCTTCTCC TGGTGGCAGCTCCAGGTGGGT CCTGTCCCAGGTGCAGCTGAAG GAGAGC -3' (SEQ ID NO: 43)	IgG1-BamHI-R	5'- TAAGGATCCTTATCATTAC CCGAGACAGGGAGAG-3' (SEQ ID NO: 44)
<b>轻链</b>			
NMC-VL-EcoRI -F	5'-GACGCGAATTCGGACATCC A GATGACCCAGAGCC -3' (SEQ ID NO: 45)	NMC-VL- $\kappa$ -R	5'-GAAGACAGATGGTGCAGCCACAGT TCGCTTCACTCCAGCTTGGTGCC -3' (SEQ ID NO: 46)
$\kappa$ -F	5'-CGAACTGTGGCTGCACCAT CTGTCTT -3' (SEQ ID NO: 47)	$\kappa$ -BamHI-R	5'-AATTCGGATCCTTACTAACACT CTCCCCTGTTGAAGCTCTT -3' (SEQ ID NO: 48)

[0322] 在一例示方法中,是利用 Accuprime PFX DNA 聚合酶试剂盒 (Invitrogen) 来进行 PCR 反应;例如,组合包含下列的 50  $\mu$ l 反应混合物 (mix): 1 $\times$ PFX 缓冲液、0.2  $\mu$ M dNTP 混合物、1 单位的 PFX 聚合酶、1  $\mu$ M 正向引物、1  $\mu$ M 反向引物及 100ng 的 DNA 模板。标准的 PCR 程序包含:在 94 $^{\circ}$ C 下开始进行变性 (denaturation) 持续 1 分钟,接着以每一循环为 94 $^{\circ}$ C 持续 30 秒、55 $^{\circ}$ C 持续 30 秒、68 $^{\circ}$ C 持续 1 分钟进行 30 个循环,以及在 68 $^{\circ}$ C 下持续 10 分钟的最后延长 (extension) 步骤。以在 0.8% TAE 胶上的琼脂糖凝胶电泳纯化 PCR 产物,切除一条或多条的期望大小的条带,并以 Qiagen 凝胶提取试剂盒纯化。室温下,在包含 1 $\times$ T4DNA 连

接酶 (ligase) 缓冲液 (NEB)、0.5  $\mu$ l T4 DNA 连接酶 (NEB) 及各 DNA 100ng 的 10  $\mu$ l 体积中, 连接 (ligate) DNA 片段持续 30 分钟; 接着, 利用 1  $\mu$ l 的连接反应物来转化 JM109 大肠杆菌细胞, 且通过利用贝克曼 (Beckman) CEQ 8000DNA 分析仪加以测序, 以验证 PCR 所产生的插入物 (inserts)。

[0323] 此等包含来自鼠类抗体 NMC-4 的 VH 和 / 或 VL 以及人类 Fc 的嵌合抗体, 是根据本领域中已知的标准规则 (protocol) 利用 PCR 加以合成。在一例示方法中, 通过以 NMC-4 专用的引物及人类 Fc 专用的引物, 将来自 NMC-4 的 VH 和 / 或 VL 融合至人类 Fc。

[0324] 任选地, 将氨基酸取代 (例如突变) 引入 IgG1Fc 区, 以破坏 Fc 及补体结合位点 (complement binding sites) 而消除假设由野生型  $\gamma$ 1 Fc 恒定区介导的细胞毒性 (见例如 SEQ ID NO:143)。例如, 衍生自 I. M. A. G. E. cDNA 克隆 #4764579 (ATCC) (SEQ ID NO:33) 人类 IgG1 恒定区 (如 Fc) 是利用引物 hIgG-F (SEQ ID NO:36) 和 HIgG-R (SEQ ID NO:37) (表 1) 加以扩增。通过进行例如定点突变 (site directed mutagenesis) (Duncan & Winter; Nature. 332 (6166):738-40 (1988)), 将氨基酸取代 (例如 L235E (FcR 结合区) 及 E318A, K320A, K332A (在 C1q 补体结合位点)) 引入 IgG1 Fc 区。举例而言, 利用引物对 hFc-L235E-F (SEQ ID NO:39) 及 hFc-L235E-R (SEQ ID NO:40) 将 L235E 突变引入恒定区; 利用引物对 CH2-C1q(-)-F (SEQ ID NO:41) 及 CH2-C1q(-)-R (SEQ ID NO:42) (表 1) 引入补体位点突变 (complement site mutations)。利用两外部引物 hIgG-F (SEQ ID NO:36) 及 IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO:38) 来连结包含四种突变的合成的 PCR 产物, 以产生编码修饰 IgG1 Fc 区 (称为 IgG1(dm)) 的 PCR 产物。

[0325] 在一例示方法中, 通过本领域中已知的重组技术而将 NMC-4 的重链可变区融合至修饰 IgG1 Fc 区 (例如 IgG1(dm))。例如, 利用在 NMC-VH 的 N 端上游引入 EcoRI 克隆位点的引物 NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO:34) 及 NMC-VH-IgG1-R (SEQ ID NO:35), 扩增编码 NMC-4 的重链可变区 (SEQ ID NO:1) 的核苷酸序列; 简言之, 通过两步骤的重组 PCR, 可使 PCR 产物与重链恒定区 (例如 IgG1(dm)) 连接, 首先利用引物对 NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO:34) 和 HIgG-R (SEQ ID NO:37), 接着利用引物对 NMC-VH-EcoRI-F (SEQ ID NO:34) 及 IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO:38) 进行 PCR 反应。以 EcoRI 及 BamHI 来消化 (digest) 最终的 PCR 产物, 并将 PCR 产物克隆至 pIRES2-EGFP-Ig $\kappa$  载体 (Clontech, Palo Alto, CA) 的 EcoRI 及 BamHI 位点中, 该载体经过修饰成包含被克隆至 XhoI 及 EcoRI 位点的 Ig $\kappa$  先导序列 (METDTLLLWVLLLWVPGSTGD) (SEQ ID NO:107)) (由 SEQ ID NO:140 的多核苷酸加以编码)。

[0326] 在一例示方法中, 通过如下所述的重组技术而将 NMC-4 的轻链可变区融合至修饰 IgG1 Fc 区 (例如 IgG1(dm))。例如, 利用在 Ig $\kappa$  轻链恒定区的 3' 端更进一步引入 BamHI 限制位点的引物  $\kappa$ -F (SEQ ID NO:47) 及  $\kappa$ -BamHI-R (SEQ ID NO:48), 扩增来自由 I. M. A. G. E 克隆 #4704496 (ATCC) (SEQ ID NO:108) 所制成的 DNA 中的 Ig $\kappa$  轻链恒定区 (例如  $\kappa$  C1 (SEQ ID NO:141)); 同理, 利用在 5' 端引入 EcoRI 位点的引物 NMC-VL-EcoRI-F (SEQ ID NO:45) 及 NMC-VL- $\kappa$ -R (SEQ ID NO:46) (表 1), 扩增来自合成 VL 基因的轻链可变区; 接着, 利用引物 NMC-VL-EcoRI-F (SEQ ID NO:45) 及  $\kappa$ -BamHI-R (SEQ ID NO:48), 以重组 PCR 来连结 NMC-4 可变区及  $\kappa$  C1 片段。以 EcoRI 及 BamHI 来分解最终的 PCR 产物, 并将其克隆至 pIRES2-DsRed2-Ig $\kappa$  载体中的相同位点。

[0327] 相较于表达轻链小鼠-人类嵌合体的 pIRES-DsRed 质粒,在 pIRES2-EGFP 载体中的重链的表达水平可能较低,尽管对于轻链及重链两者皆使用相同的 Ig $\kappa$  先导序列。因此,为改善重链的表达水平,利用引物对 4-59 前导-HindIII-NMC-4 (SEQ ID NO:43) 和 IgG1-BamHI-R (SEQ ID NO:38) 并以 pIRES2-EGFP-NMC4-IgG (mut) 载体作为模板 (表 1),以来自人类种系 4-59VH 的前导序列 (MKHLWFFLLLVAAPRWLS) (SEQ ID NO:109) 取代 Ig $\kappa$  前导序列;片段则以 HindIII 及 PmeI 加以消化,并亚克隆至 pcDNA6-cMyc-A 载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA) HindIII 及 PmeI 的位点。

[0328] AJW200 参考抗体的建构:AJW200 为针对 vWF 的 A1 结构域的另一抗体,其具有阻断 vWF A1 结构域与 GPIb $\alpha$  之间的相互作用的能力。AJW200 参考抗体通过改造美国专利第 6,228,360 中所述的 VH 及 VL 序列,以包含例如改善表达用的额外功能性 Kozak 序列而产生。举例而言,合成的 AJW200VH 基因是利用引物 Hind III-Ko-AJW-F (SEQ ID NO:49) 和 HuFab-H-R (SEQ ID NO:50) (表 2) 加以扩增,并将其克隆至包含人类 IgG1 (dm) 重链恒定区的以 HindIII-ApaI 消化的 pcDNA6-cMyc-A 载体的 HindIII 及 ApaI 位点中 (以取代 NMC-4 的 VH);而 AJW200VL 是利用引物对 XhoI-Ko-AJW-F (SEQ ID NO:51) 及  $\kappa$ -BamHI-R (SEQ ID NO:48) 加以扩增,并将其亚克隆至带有 NMC-4 轻链嵌合体的 pIRES-DsRed 载体的 XhoI 及 BamHI 位点中 (藉以取代 NMC-4 的 VL)。

[0329] 表 2 用以产生 AJW200 表达质粒的引物

[0330]

正向引物	序列	反向引物	序列
Hind III-Ko-AJW-F	5'-GTTAAGCTTGCCGCCACCATGGATTTT GGGCTGATTTTTTTTATTGTT -3' (SEQ ID NO: 49)	HuFab-H-R	5'-GAATGGGCCCTTGGTGGAAGCGGA GGAAACGGTCACGAGGGTA -3' (SEQ ID NO: 50)
XhoI-Ko-AJW-F	5'-AATCTCGAGGCCGCCACCATGAGTGTG CCCCTCAGGTCCTGG -3' (SEQ ID NO: 51)	$\kappa$ - BamHI-R	5'-AATTCCGATCCTTACTAACAACACTCT CCCCTGTTGAAGCTCTT -3' (SEQ ID NO: 48)

[0331] 抗体生产:嵌合抗体可通过本领域中已知的任何方法加以产生。在一例示方法中,HEK293F 细胞在 120rpm, 37°C, 8% CO<sub>2</sub> 的摇瓶中以 Freestyle293 表达培养基 (Invitrogen) 来培养,细胞在 100xg 下离心沉淀,悬浮于 30ml 的 Freestyle 293 表达培养基中,并施以涡旋 (vortexed) 达 20 秒,以得到单细胞悬浮液。计算细胞数目,且以  $3.3 \times 10^8$  细胞接种于含有总体积 330ml 的 Freestyle 293 表达培养基的 2L 摇瓶中。转染混合物是由等量的 DNA/OptiMEM (例如 165  $\mu$ g 的 HC 表达质粒、165  $\mu$ g 的 LC 表达质粒、及室温 OptiMEM (Invitrogen) 至总体积 11ml) 及 293fectin/OptiMEM (例如 433  $\mu$ l 的 293fectin (Invitrogen) 及室温 OptiMEM (Invitrogen) 至总体积 11ml) 所组成。将 DNA 混合物添加至 293fectin 混合物中,接着加以混合并在室温下培养 20 分钟,且将其添加至含有 293F 细胞的现存培养基中;以 37°C, 8% CO<sub>2</sub>, 120rpm 的振荡速率培养细胞。于转染后 72 小时时,在 100xg 下离心悬浮液 5 分钟,以使细胞沉淀;利用 0.2  $\mu$ m 滤膜过滤含 Mab (单克隆抗体) 上清液,且利用蛋白质-A 亲和柱纯化的。

[0332] 将来自瞬时转染 HEK-293F 细胞的少量条件培养基 (CM) 施用于已以 PBS 来平衡

的 0.3ml 蛋白质-A SEPHAROSE 滴注柱 (drip column), 以 10ml PBS 清洗柱并以 0.1M, pH 2.7 的甘氨酸洗脱蛋白质。将 1ml 的级分收集至 0.1ml 的 1M, pH 8.0 Tris-HCl, 而大部分抗体会在前两个洗脱级分中洗脱; 利用例如 Vivaspin 0.5ml 离心装置, 合并浓缩此两级分至最终体积 (例如 0.2-0.3ml)。在此浓缩步骤期间, 利用 PBS 进行中间稀释, 以将缓冲液由 Tris-甘氨酸换成 PBS。利用透过例如 0.2  $\mu$ m 注射器式滤器的过滤而使最终浓缩液无菌化, 并利用劳里 (Lowry) 蛋白质测定法 (BioRad DC 蛋白质测定法) 来决定含抗体样本的蛋白质浓度。

[0333] 就大规模纯化而言, 以超过滤在中空纤维柱 (例如 Amersham Biosciences 30,000NMWC/290cm<sup>2</sup> 的中空纤维柱 UFP-30-C-3X2MA) 上浓缩来自瞬时转染粘附细胞 (例如 HEK-293T) 的 2L 条件培养基, 直至体积降至  $\sim$  200ml 为止。将此浓缩物质 (或用于较小型转染, 则为纯 CM) 抽取通过已利用 0.1M, pH 8.0 的 Tris-HCl 加以平衡的 12ml 蛋白质 A 的 SEPHAROSE 柱, 再以 0.1M, pH 8.0 的 Tris-HCl 清洗柱, 直至 UV<sub>280</sub> 的读数确立基线为止。以 0.1M, pH 2.7 的甘氨酸洗脱抗体并收集 3ml 的级分, 通过加入 0.1M, pH 8.0 的 Tris-HCl 至 0.1M 的最终浓度来调整含峰蛋白质 (peak protein) 的级分的 pH 值; 集合峰级分, 通过超过滤 (例如在 Amicon Ultra15ml 离心装置上) 将其浓缩至小于 7ml 的体积, 接着利用在 PD-10 柱上 (Amersham Biosciences/GE-Healthcare) 的两独立进程进行去盐化至 PBS 中。

[0334] 通过本领域中已知的方法 (例如劳里 (Lowry) 蛋白质测定法 (BioRad DC 蛋白质测定法)), 定量并分析得自于培养上清液的蛋白质。在一例示方法中, 用 SDS-PAGE 分析培养上清液; 简言之, 将蛋白质转移至硝酸纤维素膜, 在室温下以 5% 牛奶/PBS 阻断持续 1 小时, 并与缀合有 HRP 的小鼠抗人类 IgG (例如  $\gamma$ -链特异性 ( $\gamma$ -chain specific), 1 : 10,000) 及小鼠抗人类  $\kappa$  (例如  $\kappa$ -链特异性, 1 : 1,000) (Southern Biotech, Cat#9042-05 和 #9220-05, Birmingham, AL) 一起培养, 以 ECL 试剂盒检测讯号。

[0335] 在瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定中的体内抑制活性: 在一例示方法中, 测试嵌合 NMC-4 人类 Fc 抗体的活性, 包括例如对于 vWF 的结合特异性。举例而言, 血小板凝集测定用标准血小板凝集测定仪 (aggregometer) (Bio/Data, model PAP-4)、利用冷冻干燥的人类血小板 (Bio/Data, Horsham PA) 来进行。简言之, 将 50  $\mu$ l 的瑞斯特霉素 (例如原液 (stock) 浓度 = 15mg/mL) (Bio/Data) 及 48.5  $\mu$ l 的 TBS 或测试抗体添加至在 400  $\mu$ l 体积中含有  $1 \times 10^8$  个冷冻干燥血小板的试管内, 在将 1.5  $\mu$ l 的纯化 vWF (例如终浓度 1.5  $\mu$ g/mL) 加入至试管以启动凝集反应前 10 秒, 记录基线读数。估算测试抗体的 EC<sub>50</sub> 值, 其为抑制 50% 血小板凝集的浓度; 与亲本单克隆抗体相较, 嵌合体表达出等同于亲本鼠类 NMC-4 抗体的效力。

[0336] 再者, 为更精确地判定 EC<sub>50</sub> 值, 利用例如改自微孔板 (microplate) 法的读板器法来测定嵌合抗体。在一例示方法中, 利用 96 孔 COSTAR 3603 板添加每孔 150  $\mu$ l TBS (pH 7.5) 中包含  $4.5 \times 10^7$  个经低聚甲醛固定的血小板, 并添加纯化人类 vWF (Calbiochem, San Diego, CA) 至每孔 1.5  $\mu$ g/mL 的最终浓度。添加一连串浓度的测试抗体后, 加入瑞斯特霉素至每孔 1.5mg/mL 的最终浓度, 以启动凝集反应, 并利用设定于 37°C 下持续 6 分钟、而读取循环之间有 20 秒机载振荡 (on-board shaking) 的 SPECTRAMAXPLUS 读板器 (Molecular Devices) 监测浊度 (例如在 405nm 下的吸收度)。加入 (例如 20  $\mu$ l/孔) 抑制剂化合物或参考 MAb (例如 AVW-3), 培养且监测该混合物达 2 分钟。最后, 加入瑞斯特霉素或美洲予

头蝮毒蛋白 (botroctetin) (例如 20  $\mu$  l/ 孔) 培养且监测该混合物达 40 分钟。监测吸收度减少的程度 (例如  $-\Delta$  吸收度) 作为凝集讯号。

[0337] 比较 NMC-4- 人类 Fc 嵌合体与原始 NMC-4 单克隆抗体、以及所克隆的 AJW200 抗体。如图 1 所示, 在瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定中, NMC-4 嵌合体在活性方面类似于原始 NMC-4MAb, 且略优于 AJW200, 其  $EC_{50}$  值分别为 0.1, 0.17, 及 0.27nM。

[0338] 实施例 2 : 人源化抗体的构建

[0339] 人类受体构架的筛选 : 可利用数据库 (例如人类种系数据库、V 区数据库 (V base)、或卡巴 (Kabat) 数据库) 或公开发表物 (例如 Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1992) 来识别鼠类重链及轻链 V 区所属的亚科 (subfamily), 并判定最适的人类种系构架, 以用作受体分子。其中可利用此等亚科内的 VH 及 VL 序列作为受体序列的筛选, 可基于序列同源性和 / 或 CDR1 及 CDR2 区的规范结构的匹配性, 以帮助保持六个 CDR 在移植后的适当相对呈递。

[0340] 举例而言, 假定识别出 NMC-4VL 构架与  $\kappa$  亚科 1 (VK1) 的成员之间具有良好同源性, 则使用人类 V 区数据库表示 NMC-4 的  $\kappa$  轻链属于  $\kappa$  1 亚科。观察到 : 种系序列 018 (SEQ ID NO : 5) 具有 CDR 环的规范结构的最高同源性 & 最佳保存性, 就上至 CDR3 的全部序列而言, 其具有 78% 的序列同一性 (sequence identity) ; 就框架区而言, 其具有 84% 的序列同一性。NMC-4 轻链、人类轻链 018 (SEQ ID NO : 5)、及 AAK94808 (得自于 018 的成熟抗体, 用来提供 LCDR3 及构架 4 序列, 以与此区中的 NMC-4 相比较) (SEQ ID NO : 6) 的比对 (alignment) 显示于表 3 中, NMC-4 与人类抗体之间的差异用粗体字表示 (编号是基于卡巴记数制 (Kabat, 1978))。

[0341] 同样地, 使用人类 V 区数据库指出直至构架 3 的 VH 序列落在 VH 亚科 IV 中。在人类 VH 的 IV 亚科内, NMC-4VH 显示与 4-59 种系序列 (SEQ ID NO : 3) 具有最高序列同源性, 就直至 CDR3 的整个 VH 而言, 其展现对鼠类 VH 56% 的序列同一性 ; 单就框架区而言, 则展现 67% 的同一性 (表 4)。在不受限于本发明的理论下, 选择 AAC18165.1 (SEQ ID NO : 4) 以提供 HCDR3 及构架 4 比较序列 (comparator sequence), 因为其在构架 1 至 3 与 HCDR1 及 HCDR2 中具有与人类种系 4-59VH 相同的氨基酸序列。已知 HCDR3 为高度分歧的, 且 FW4 为取自于独立基因产物 (J) 的不同结构域, 于是 HCDR3 及构架 4 并未被包含在人类 V 区数据库的 VH 种系序列中。在表 4 中, 将 NMC-4VH 与 AAC18165.1 (SEQ ID NO : 4) 序列之间的氨基酸差异以粗体字、其位置加星号以强调。

[0342] 表 3 NMC-4VL 与人类抗体 AAK94808 的比对, 后者具有与人类种系 VL, 018 相同的氨基酸构架、CDR1 及 CDR2 序列

[0343]

名称	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	-----1-----*-----2*-	*-----3*-----	-----4**-*-----*	5*-----*
卡巴号:	12345678901234567890123	45678901234	567890123456789	0123456
NMC-4 VL				
(SEQ ID NO: 2)	DIQMTQSPSSLSASLGDRVTISC	SASQDINKYLN	WYQQKPDGAVKLLIF	YTSSLHS
018 (AAK94808)				
(SEQ ID NO: 6)	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC	QASQDISNYLN	WYQQKPGKAPKLLIY	DASNLET
名称	FW3	CDR3	FW4	
	---6-----7***-----*8-----9***--			
卡巴号:	78901234567890123456789012345678	901234567	8901234567	
NMC-4 VL	GVPSRFGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYYC	QQYEKLPWT	FGGGTKLEVK	
018 (AAK94808)	GVPSRFGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYC	QQYDNLPLT	FGGGTKVEIK	

[0344] 表 4NMC-4VH 与人类抗体 AAC18165.1 的比对,后者具有与人类种系 4-59 相同的构架、CDR1 及 CDR2 氨基酸序列

[0345]

名称	FW1	CDR1	FW2	CDR2
	-----*-----1-----*-----*-----*3*-----*-----4-----*-----5***-----*-----6***-----			
卡巴号:	12345678901234567890123456789012345	6789012345	67890123456789	0123456789012345
NMC-4 VH				
(SEQ ID NO: 1)	QVQLKESGPGLVAPSQSLITCTVSGFSLTDYGVDPVPPGKLEWLGMIWGDGSTDYNSALKS			
4-59 (ACC18165.1)				
(SEQ ID NO: 4)	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSISSYYWSWIRQPPGKLEWIGYIYYSGSTNYNPSLKS			
名称	FW3	CDR3	FW4	
	***-7*-----*8***-----*9---	*****10*****	-----11---	
卡巴号:	67890123456789012abc345678901234	567890abcdef12	34567890123	
NMC-4 VH	RLSITKDNSKSVFLKMNLSLQTDITARYYCVR	DPADYGNVDYALDY	WGQGTSVTVSS	
4-59 (AAC18165.1)	RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR	GYRPGVAHSPFDY	WGQGLVTVSS	

[0346] 由于假设来自小鼠抗体的 CDR 直接移植至人类抗体构架造成了抗原结合亲和力的损失 (Foote 和 Winter J. Mol. Biol. 224 :487-499(1992); Xiang 等, J Mol Biol. 253 :385-90(1995); Homes 等, J. Immunol. 167 :296-301(2001)), 故可能期望使构架中的某些残基突变回到在该等位置上的小鼠残基, 此程序称为回复突变 (back-mutation)。例如, 表 5 显示可能影响 CDR 构象且可能为回复突变至鼠类残基的潜力候选者的残基 (例如以斜粗体字来强调 NMC-4 与人类构架之间在这些位置上的氨基酸差异)。

[0347] 表 5 影响 CDR 的构象的构架残基; 比较 NMC-4 及人类受体可变区

[0348]

VL			VH		
卡巴位置	NMC-4	018 FW	卡巴位置	NMC-4	4-59 FW
2	I	I	2	V	V
4	M	M	47-49	W, L, G	W, I, G
35-36	W, Y	W, Y	67	L	V
46-49	L, L, I, F	L, L, I, Y	69	I	I
64	G	G	71	K	V
66	G	G	73	N	T
68-69	G, T	G, T	78	V	F
71	Y	F	93-94	V, R	A, R

[0349]

98	F	F	103	W	W
----	---	---	-----	---	---

[0350] 已识别出可能涉及重链及轻链的配对以协调 CDR 呈递的氨基酸残基 (Holmes 等, *J Immunol.* 167 :296-301 (2001)), 且其可能为回复突变的候选者。在不受限于本发明的理论下, VL 区内的残基 44, 96 及 98 被认为具有重要性, 尚有来自残基 34, 36, 38, 46, 87, 89 及 91 的额外贡献。在这些残基中, 关于 VL 区的 NMC-4 与受体 018 之间唯一有显著不同为残基 44, 其在 NMC-4VL 中为缬氨酸 (valine), 而在人类 018 构架中为脯氨酸 (proline)。在不受限于本发明的理论下, 就 VH 而言, 残基 45 及 103 具有重要性, 残基 35, 37, 39, 47, 91, 93 及 95 还对 VH 与 VL 的界面堆积 (interface packing) 有贡献。在 NMC-4 及受体 4-59 构架的这些界面残基中, 唯一差异仅在残基 93, 其中存在 NMC-4 中的缬氨酸相较于 4-59 中的丙氨酸的保守差异 (表 5)。

[0351] 比较鼠类及人类种系 4-59VH 序列的构架序列可得知: 在假设对 CDR 呈递及界面堆积重要的残基中, 许多差异群集在构架 3 中 (残基 67, 71, 73, 78, 93), 额外的差异则在构架 2 中的残基 37 及 48; 这些残基在原型 (prototype) 人源化序列中为回复突变的推定候选者。然而, 两构架 2 残基 (37V vs 37I 及 48L vs 48I) 的差异具保守性, 因此, 第一原型 VH 序列可集中于构架 3 区中的差异, 且载有下列由人类至小鼠的回复突变: V67L, V71K, T73N, F78V 及 A93V (表 6)。合成基因是由 Retrogen (加州圣地亚哥) 定制合成且被表示为 H2, 并被克隆入细菌载体 pRSFDuet (Novagen, 威斯康星州麦迪逊) 的 NheI 及 XhoI 位点, 且被用作以 4-59-huNMC-F (SEQ ID NO: 54) 和 Hu-VH-R (SEQ ID NO: 55) 引物来扩增插入物的模板 (表 7 及 9)。以 ApaI 来消化所合成的片段, 以 HindIII 及 ApaI 来消化包含在实施例 1 中所产生的 NMC-4 嵌合重链的质粒 pcDNA6-NMC-HC, 且在 NTP 存在下以克列诺夫片段 (Klenow fragment) 对含有 pcDNA-IgG1dm 片段的 DNA 片段进行钝端处理。将含 VH 的 PCR 产物缀合至经钝端处理的 pcDNA-IgG1dm 片段, 接着利用质粒 DNA 来转化大肠杆菌宿主菌株 JM 109。利用贝克曼 (Beckman) CEQ 8000DNA 测序仪来测序各自克隆 (clones), 以识别出以正确位向表达插入物且具有正确序列的克隆 (克隆 pcDNA-huVH-IgG1dm)。利用此载体作为 H4, H5,

H6, H7 及 H8 变体的模板, 此等变体被用来评估单独地将各残基回复成人类残基的效果 (总结于表 6 中)。利用表 7 中所述的引物对 (对应序列显示于表 9) 来构建这些变体。

[0352] 表 6 对不同 VL 及 VH 变体, 并入种系 4-59 及 018 种系受体序列的构架残基突变  
[0353]

VH	回复突变 (人类至鼠类)	VL	回复突变 (人类至鼠类)	(人类至一般人 类)
H2	V67L, V71K, T73N, F78V, A93V	L5	P44V, Y49F,	F73L, G100Q
H4	V67L, V71K, T73N, F78V	L4	Y49F, F71Y	F73L, G100Q
H5	V71K, T73N, F78V, A93V	L6	P44V, F71Y	F73L, G100Q
H6	V67L, T73N, F78V, A93V	L7	P44V, Y49F	F73L, G100Q
H7	V67L, V71K, F78V, A93V	L8	无回复突变	F73L, G100Q
H8	V67L, V71K, T73N, A93V	L9	无回复突变	F73L, I83F, G100Q
H9	无回复突变			

[0354] 表 7 用来构建人源化重链变体的模板及引物总结

[0355]

VH 变体	模板	片段-1 PCR 引物	片段-2 PCR 引物	最终 VH PCR 引物	载体	克隆位 点
H2	来自 Retrogen 的合成 DNA			4-59-huN MC-F 及 hu-VH-R	pcDNA6- IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H4	PcDNA6-IgG 1 (dm) 中的 H2	pcDNA6-F 及 VH-V93A-Rev	VH-V93A-For 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235 E-R	pcDNA6- IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H5	PcDNA6-IgG 1 (dm) 中的 H2	pcDNA6-F 及 HC-L67V-R	HC-L67V-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235 E-R	pcDNA6- IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H6	PcDNA6-IgG 1 (dm) 中的 H2	pcDNA6-F 及 HC-K71V-R	HC-K71V-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235 E-R	pcDNA6- IgG1 (dm)	HindIII ApaI

[0356]



H7	PcDNA6-IgG 1 (dm) 中的 H2	pcDNA6-F 及 HC-N73T-R	HC-N73T-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H8	PcDNA6-IgG 1 (dm) 中的 H2	pcDNA6-F 及 HC-V78F-R	HC-V78F-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H9	来自 Retrogen 的合成 DNA			4-59-huN MC-F 及 hu-VH-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI

[0357] 比较假设可影响规范结构及界面堆积的残基可知：在 NMC-4VL 与 O18 人类 VL 受体构架之间有三处差异（例如残基 44, 49, 及 71），因此，可设计出带有三个至鼠类残基的回复突变（例如 P44V, Y49F, 及 F71Y）的原型人源化变体 L5；此外，此变体被设计成具有由苯丙氨酸改变成亮氨酸 (leucine) 的残基 73，因为在人类抗体谱中，亮氨酸为在此位置上更常见的残基。为产生此变体，便定制合成称为 VL4、带有构架变化（例如 Y49F, F71Y, 及 F73V）的变体 (Retrogen)，并利用表 8 所列的引物对将其克隆入 pETDuet 载体内。以所得的 L4-pETDuet 载体作为模板，利用表 8 所列的引物对引进 L5 的 P44V 突变；接着将 L5 变体亚克隆入 pIRES DsRed2 载体的 EcoRI 及 BamHI 位点，以取代鼠类 NMC-4VL；接着利用 L5-pIRES DsRed 载体作为模板，利用表 8 所列的引物对来产生 L6 及 L7 载体。

[0358] 表 8 用来构建人源化轻链变体的模板及引物总结

[0359]

VH 变体	模板	片段-1 PCR 引物	片段-2 PCR 引物	最终 VL PCR 引物	载体	克隆位点
L4	来自 Retrogen 的合成 DNA			NMC4-VL-EcoR I-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	pIRES-DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L5	pETDuet-1 中的 L4	Fab-L-For 及 LC-P44V-R	LC-P44V-F 及 Fab-L-Rev	Fab-L-For 及 Fab-L-Rev	pETDuet-1	NdeI XhoI

[0360]

L5	pETDuet-1 中的 L5			NMC4-VL-EcoR I-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L6	pIRES- DsRed2-Igk 中的 L5	NMC4-VL-Eco RI-F 及 LC-F49Y-R	LC-F49Y-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	NMC4-VL-EcoR I-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L7	pIRES- DsRed2-Igk 中的 L5	NMC4-VL-Eco RI-F 及 LC-Y71F-R	LC-Y71F-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	NMC4-VL-EcoR I-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	pIRES- DsRed2-Igk	EcoRI BamHI
L8	pIRES- DsRed2-Igk 中的 L7	5'IRES 及 HuLC-V44P-F 49Y-R	HuLC-V44PF4 9Y-F 及 3'IRES	5'IRES 及 3'IRES	pIRES-DsRed 2-Igk	EcoRI BamHI
L9	来自 Retrogen 的 合成 DNA			NMC4-VL-EcoR I-F and $\kappa$ -BamHI-R	pIRES-DsRed 2-Igk	EcoRI BamHI

[0361] 表 9 用来构建各种的可变区的引物序列

[0362]

正向引物	序列	反向引物	序列
4-59-huNMC -F	5'- GTAAAGCTTGCCGCCACCATGAA ACATCTGTGGTTCTTCTTCTCCT GGTGGCAGCTCCAGGTGGGTCCT GTCCCAGGTGCAGCTGCAGGAATC CGG-3' (SEQ ID NO: 54)	Hu-VH-R	5'-GGATGGGCCCTTGGTGAAGC GGAGGAAACGGTCACGAGGGTA-3' (SEQ ID NO: 55)
pcDNA6-F	5'- CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEQ ID NO: 56)	hFc-L235E- R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCC CTCGAG -3' (SEQ ID NO: 56)
VH-93A-For	5'-GACACCGCTGTTTACTACT GCGCTCGTGACCCGGCTGACT -3' (SEQ ID NO: 57)	VH-V93A-Re v	5'-AGTCAGCCGGGTCACGACCGCA GTAGTAAACAGCGGTGTC -3' (SEQ ID NO: 58)
HC-L67V-F	5'-CTGAAATCCCGTGTACCATC TCCAAAGAC -3' (SEQ ID NO: 59)	HC-L67V-R	5'-GTCTTTGGAGATGGTAACACGGG ATTTCAG -3' (SEQ ID NO: 60)
HC-N73T-F	5'-ACCATCTCCAAAGACACCTCC AAAAAC -3' (SEQ ID NO: 61)	HC-N73T-R	5'-GTTTTTGGAGGTGTCTTTGGA GATGGT -3' (SEQ ID NO: 62)
HC-V78F-F	5'-AACTCCAAAAACCAATTCT	HC-V78F-R	5'-GTTTCAGGGAGAAGTGGTTTTT

[0363]

	CCCTGAAAC -3' (SEQ ID NO: 63)		GGAGTT -3' (SEQ ID NO: 64)
HC-K71V-F	5'-CTTACCATCTCCGTAGACAA CTCCAAAAAC -3' (SEQ ID NO: 65)	HC-K71V-R	5'-GTTTTTGGAGTTGTCTACGGA GATGGTAAG -3' (SEQ ID NO: 66)
hu-VH-K71V -F (H9)	5'-CGTGTTACCATCTCCGTAGA CACCTCCAAA -3' (SEQ ID NO: 67)	hu-VH-K71V -R (H9)	5'-TTTGGAGGTGTCTACGGAGAT GGTAACACG -3' (SEQ ID NO: 68)
Fab-L-For	5'- ATACATATGGACATCCAGATG ACCCAGAGC -3' (SEQ ID NO: 69)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAACACTCTCC CCTGTTGAAGCT -3' (SEQ ID NO: 70)
NMC4-VL-Ec oRI-F	5'-GACGCGAATTCGGACATCCA GATGACCAGAGCC -3' (SEQ ID NO: 71)	Fab-L-Rev	5'- AGACTCGAGTTATCAACACTCTCC CCTGTTGAAGCT -3' (SEQ ID NO: 70)
5'-IRES	5'-AGCTGGTTTAGTGA -3' (SEQ ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGCTTCGGCCAG -3' (SEQ ID NO: 73)
LC-Y49F-F	5'-CCAAGCTGCTGATCTTCTAC ACCA -3' (SEQ ID NO: 74)	LC-Y49F-R	5'-TGGTGTAGAAGATCAGCAG CTTGG -3' (SEQ ID NO: 75)
LC-F83I-F	5'-CAGCCCCGAGGACATCGCCAC CTACTACTGC -3' (SEQ ID NO: 76)	LC-F83I-R	5'-GCAGTAGTAGGTGGCGATGTCCT CGGGCTG -3' (SEQ ID NO: 77)
LC-P44V-F	5'-AAGCCCGGAAGGCCGTC AAGCTGCTGATC -3' (SEQ ID NO: 78)	LC-P44V-R	5'-GATCAGCAGCTTGACGGCCTTGC CGGGCTT -3' (SEQ ID NO: 79)
LC-F49Y-F	5'-GCCGTCAAGCTGCTGATCTA CTACACCAG -3' (SEQ ID NO: 80)	LC-F49Y-R	5'-CTGGTGTAGTAGATCAGCAGCT TGACGGC -3' (SEQ ID NO: 81)
LC-Y71F-F	5'-GGCAGCGGCACCGACTTCA CCCTGACCATC -3' (SEQ ID NO: 82)	LC-Y71F-R	5'-GATGGTCAGGGTGAAGTCGGTG CCGCTGCC -3' (SEQ ID NO: 83)
HuLC-V44P, F49Y-F	5'-GGCAAGGCCCCCAAGCTGCT GATCTACTACACCAG -3' (SEQ ID NO: 84)	HuLC-V44P, F49Y-R	5'-CTGGTGTAGTAGATCAGCAGC TTGGGGCCTTGCC -3' (SEQ ID NO: 85)

[0364] 平行于克隆这些第一组变体, 利用在 BLAST 搜索中经识别为具有上至 HCDR3 的所有序列的最高序列同一性 (88%) 及框架区的 89% 序列同一性的 1DNO.pdb 结构 (例如 2.3 埃分辨率), 建立计算机产生的 4-59 受体种系序列的三维模型。选择结构 1AOK。

pdb 作为具有 81% 序列同一性的人源化 VH 序列的模板。可利用鼠类 NMC-4Fv 的两结晶结构:1A0K.pdb(例如 2.2 Å 分辨率),其已结合抗原(Celikel 等, Nat. Struct. Biol. 5: 189-194(1998)) 且还被选为在原型人源化变体的 VH 结构域中的最佳适配;及 1FNS.pdb(2.0 Å 分辨率),已结合至突变抗原。1A0K.pdb 及 1FNS.pdb 两者具有实质上相同的 VH/VL 界面角(interface angle),故将 1A0K.pdb 用于重迭人类受体的模型及人源化 VH 及 VL 序列的模型。

[0365] 当重迭 NMC-4VH 及 4-59 的骨架结构时,可观察到三区差异。第一,差异存在于残基 H27 至 H33,其包含 HCDR1 的一部分。不受限于本发明的理论,这些残基接触共同形成抗原结合位点的一部分的 HCDR2 及 HCDR3。预测残基 34(在鼠类 NMC-4VH 中为 Val,在 4-59 序列中为 Trp)可能为 H27-33 环的构象改变的原因,且因此为回复突变的候选者。第二,差异存在于残基 H52 至 H55,其形成 CDR2 环的一部分。认为构架残基 71(小鼠中的 Lys,4-59 中的 Val)可能与此差异有关,且因此为回复突变的候选者。在 4-59 结构中的三额外残基被识别出可能阻碍抗原结合:H37,相较于小鼠中的 Val,其为 Ile 的保守性变化;H73(相较于小鼠中的 Asp,其代表 4-59 中的和缓变化 Thr);及 H78,相较于小鼠中的 Val,其代表 4-59 中的较大变化 Phe。第三,差异存在于 CDR3 中,可预期其中的多样性。

[0366] 对于种系 018 及原型人源化抗体 VL 结构域的模拟,结构 1IGM.pdb(例如 2.3 Å 分辨率)与 018 具有优异的序列同一性(例如 95%),有四处差异在残基 L34, L45, L47, 及 L92。选择 01BJ1.pdb(例如 2.4 Å 分辨率)作为原型人源化 VL 的模板,因为其可匹配 97/107 残基(例如 91% 序列同一性)。

[0367] NMC-4 的 VL 骨架及 018VL 结构的良好适配性符合序列同一性,唯一明显的结构差异在由残基 L39-L45 所组成的环中,其接触 VH 且因此影响堆积接着影响结合口袋(binding pocket)的形状。不受限于本发明的理论,残基 44(例如小鼠中的 Val,4-59 中的 Pro)可能为此差异的原因,因此基于计算机模拟而可能为回复突变的候选者。

[0368] 在瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定中的体外(in vitro)抑制活性:为测试计算机模拟预测是否可准确地预测在活性上的效应,将 VH2 原型变体与 VL 变体(例如 L4,5,6 及 7)配对,且将原型 L5 与 VH 变体(例如 H2,H4,H5,H6,H7 及 H8)组合。通过 HEK293T 细胞的瞬时转染来产生抗体变体,并如同针对实施方案 1 中的 NMC-4 嵌合抗体所述,将其由经过滤的培养上清液中纯化出来。

[0369] 瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定是利用如实施例 1 中所述的冷冻干燥血小板加以施行。针对抗体(一式两份)的一连串稀释液,利用 Spectromax 读板器(Molecular Devices)测量吸收度的变化、并利用 Prism 软件来分析数据,以判定各种的纯化抗体变体的 EC<sub>50</sub> 值(见例如表 9)。

[0370] 人源化抗体的第一型(由 H2 及 L5 所组成)展现与亲本嵌合体(例如 EC<sub>50</sub> 为 0.18nM)相同的活性(例如 EC<sub>50</sub> 为 0.13)(表 10),接着测试具有回复至人类构架残基的连续点突变的重链变体(例如变体 H2-H6)。变体展现极相似的活性,除了显示出低 1.5 倍的 EC<sub>50</sub> 的 L5-H8 变体以外(表 9)。有趣的是,此变体的产率不高(例如其它变体的 1/10),此显示人源化重链与轻链之间的相互作用应该已受到此突变组合的负面影响,因为抗体的稳定性取决于重链及轻链的正确组装。同理,生产并测试 L5 变体抗体,同样地,回复至人类的

变化似乎不影响活性,此出人意料地显示着:不需要改变构架。这些结果显示:本预期会产生问题的受体构架与 NMC-4 可变区构架之间的差异,包括被认为引起由计算机模拟所观察到的结构差异的最显著差异、包括被视为诱导最大的构象差异的差异(例如 VH 的 V71K 及 T73N 与 VL 的 P44V),在效力上完全无影响。以这些结果作为前提,构建带有完全人类构架的重链变体(例如 H9),其代表简单的 CDR- 移植 VH。测试此变体、以及组合轻链变体、代表将移植至完全人类构架上的简单 CDR 的额外变体 L9。出人意料地,直接 (straight) CDR- 移植的抗体保留了完整的活性 ( $EC_{50}$  为 0.08nM;表 10)。出乎意料之外,这些资料说明:直接由鼠类抗体将 CDR 移植至所选择的人类构架上,保留了原始鼠类抗体的完整活性,即使所公开的数据显示多个 CDR 对抗原结合起作用 (Celikel 等, Blood Cells Mol Dis. 23:123; Celikel 等, Nat. Struct Biol 5:189),因此,预期在 6 个 CDR 的相对呈递中的任何微扰皆会影响亲和力。

[0371] 表 10 在瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定中,亲本 NMC-4 嵌合抗体相较于人源化变体的  $EC_{50}$  值比较

抗体 (第一组)	$EC_{50}$ (nM)	抗体 (第二组)	$EC_{50}$ (nM)
NMC4 嵌合体	$0.18 \pm 0.03$ (n=9)	H9, L4	0.11
L5, H2	0.13 (n=2)	H9, L5	0.14
L5, H4	0.15	H9, L6	0.13
L5, H5	0.18	H9, L7	0.11
L5, H6	0.18	H9, L8	0.08
L5, H7	0.16	H9, L9	0.12 (n=2)
L5, H8	0.28		
L4, H2	0.14		
L6, H2	0.14		
L7, H2	0.15		

[0372] 人源化 CDR 区:分子模拟显示:在 NMC-4LCDR1(例如残基 24,30 及 31)及 NMC-4HCDR1(例如残基 27,29,30 及 34)中,可容忍经改造成人源化轻链及重链的 CDR1 的额外变化;此外,还认为在 HCDR2 序列中的两残基(例如 61 及 62)代表可容忍的变化(例如残基 61 的 Ser 至 Pro 及残基 62 的 Ala 至 Ser)。因此,一连串所谓的“超级人源化”变体 (Tan 等,2002J Immunol. 169:1119-1125)便由如表 12 中所列的模板及引物对(例如代表具有完全人类 LCDR1 的变体的 L10;部分代表人源化 HCDR1 区的 H12 及 H13(表 11))构建出来。

[0374] 表 11 改变鼠类 CDR 残基至其 4-59 对应物的突变

[0375]	VH	超级人源化 (鼠类至人类)	VL	超级人源化 (鼠类至人类)
[0376]	H12	F27G, L29I, T30S	L10	S24Q, N30S, K31N
	H13	F27G, L29I, T30S, V34W	L11	S24Q, N30S, K31N, Y50D, T51A, S53N, H55E, S56T
	H14	F27G, L29I, T30S, V34W, S61P, A62S		
	H15	F27G, L29I, T30S, D31S, G33Y, V34W, G35S, S61P, A62S		
	H16	F27G, L29I, T30S, V34W, M50Y, W52Y, G53Y, D54S, D58N, S61P, A62S		

[0377] 在一例示方法中,通过施行一个或多个的测定来测试计算机模拟预测,以判定人源化抗体的活性。举例而言, H9 与 L11 变体共转染,且在瑞斯特霉素诱导血小板凝集测定中测试抗体。如表 14 所示,可容忍引入三处变异以将 LCDR1 转化成完全为 018 的 LCDR1,且不致引发效力上的明显损失。当 H12, 13, 及 14 变体与 L9 组合时, H12-L9 变体抗体在效力上显示出略有损失;但额外 V34W 突变恢复了完全的效力,且加入 S61P 及 A62S 突变在效力上几无影响,此表示这些残基可在不影响活性的情况下被转化成 4-59 序列。其次, Lcdr2 在维持 vWF 阻断活性上的重要性,通过构建 L10 链的变体加以评价,在该 L10 链的变体中,整个 Lcdr2 (YTSSLHS) (SEQ ID NO:11) 皆利用编码 VL 变体 L10 的质粒作为模板及表 11 及 12 中所列的引物对,而由人类种系 018 Lcdr2 (DASNLET) (SEQ ID NO:118) 加以取代。接着将此新构建的变体 L11 与 H14 配对,以产生抗体变体 L11-H14。虽然此变体仍展现 nM 级效力,但相较于嵌合体,血小板凝集测试中,其活性却降低 10 倍 ( $EC_{50}$  为 1.63nM),此说明 Lcdr2 可能为人源化抗体达到最佳活性所不可或缺。

[0378] 表 12 如何构建“超级人源化”变体的总结

[0379]

变体	模板	片段-1 PCR 引物	片段-2 PCR 引物	最终 VH PCR 引物	载体	克隆 位点
H12	PcDNA6-IgG1 (dm) 中的 H9	pcDNA6-F 及 huH12-R	huH12-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H13	PcDNA6-IgG1 (dm) 中的 H9	pcDNA6-F 及 huH13-R	huH13-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H14	PcDNA6-IgG1 (dm) 中的 H13	pcDNA6-F 及 huH14-R	huH14-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H15	PcDNA6-IgG1 (dm) 中的 H14	pcDNA6-F 及 huH15-R	huH15-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
H16	PcDNA6-IgG1 (dm) 中的 H15	pcDNA6-F 及 huH16-R	huH16-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-F 及 hFc-L235E-R	pcDNA6-IgG1 (dm)	HindIII ApaI
L9	pETDuet-1 中的 L1	NMC4-VL-Ec oRI-F 及 LC-Y71F-R	LC-Y71F-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	NMC4-VL-EcoR I-F 及 $\kappa$ -BamHI-R	pIRES-Ds Red2-Ig $\kappa$	EcoRI BamHI
L10	pIRES-DsRed2-Ig k 中的 L9	5'IRES 及 huL10-R	huL10-F 及 3'IRES	5'IRES 及 3'IRES	pIRES-Ds Red2-Ig $\kappa$	EcoRI BamHI
L11	pIRES-DsRed2-Ig k 中的 L10	5'-IRES 及 huL11-R	huL11-F 及 3'IRES	5'-IRES 及 3'IRES	pIRES-Ds Red2-Ig $\kappa$	EcoRI BamHI

[0380] 表 13 用来构建人源化 CDR 变体的引物

[0381]

正向引物	序列	反向引物	序列
5'-IRES	5'-AGCTGGTTTAGTGA -3' (SEQ ID NO: 72)	3'-IRES	5'-CAAGCGGCTTCGGCCAG -3' (SEQ ID NO: 73)
huL10-F	5'-ACCATCACCTGCCAAGCCAGCCAG GACATCAGCAACTACCTGAACTGG-3' (SEQ ID NO: 86)	huL10-R	5'-CCAGTTCAGGTAGTTGCTGATGT CCTGGCTGGCTTGGCAGGTGATGGT -3' (SEQ ID NO: 87)
huL11-F	5'-CCCAAGCTGCTGATCTACGACGCCA GCAACCTGGAACCGGCGTGCCC -3' (SEQ ID NO: 88)	huL11-R	5'- GGGCACGCCGGTTTCCAGGTTGCTGG CGTCGTAGATCAGCAGCTTGGG--3' (SEQ ID NO: 89)
pcDNA6-F	5'- CACTGCTTACTGGCTTATCG AAATTA-3' (SEQ ID NO: 56)	hFe-L235E-R	5'-AAGAGGAAGACTGACGGTCCCCC CTCGAG -3' (SEQ ID NO: 40)
huH12-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTC CGACTACGGTGTGACTGGA -3' (SEQ ID NO: 90)	huH12-R	5'-TCCAGTCAACACCGTAGTCGGAG ATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 91)
huH13-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTCCGAT ACGGTTGGGACTGGATCCGTCAG -3' (SEQ ID NO: 92)	huH13-R	5'-CTGCAGGATCCAGTCCCAACCGT AGTCGGAGATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 93)
huH14-F	5'-GTTCCACCGACTACAACCCC TCTCTGAAATCCCGT-3' (SEQ ID NO: 94)	huH14-R	5'-ACGGGATTCAGAGAGGGGTT GTAGTCGGTGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 95)
huH15-F	5'-GTTTCCGGTGGCTCCATCTCCTCCTA CTATTGGTCTGGATCCGTCAG 3' (SEQ ID NO: 96)	huH15-R	5'-CTGACGGATCCAGGACCAATAGTA GGAGGAGATGGAGCCACCGGAAAC -3' (SEQ ID NO: 97)
huH16-F	5'-GAATGGATCGGTTATATCTATTATT C CGGTTCCACCAACTACAACCCCTCT 3' (SEQ ID NO: 98)	huH16-R	5'-AGAGGGGTTGTAGTTGGTGGAAAC G GAATAATAGATATAACCGATCCATTC -3' (SEQ ID NO: 99)

[0382] 接着, 剩余鼠类残基 (例如 H31, H33, 及 H35) 在变体 H14 的人源化 HCDR1 中的重要性, 通过将 这些残基改变至其在 VH 种系 4-59 序列中的人类对应部分 (例如 D31S, G33Y, 及 D35S) 检测。所得的构建体, H15 相较于 H14 中的部分人源化序列 GGSISDYGWD (SEQ ID NO: 111), 具有 HCDR1 的序列 GGSISSYYWS (SEQ ID NO: 110); 最后, 将 H15 的整个 HCDR2 转化成 VH 4-59 中的人类对应部分 (由 MIWGDGSTDYNSALKS (SEQ ID NO: 8) 至 YIYYSGSTNYNPSLKS (SEQ ID NO: 119), 总计 7 个残基有差异), 以建立另一具有完全的人类 HCDR1 及 HCDR2 的变体 H16。变体 H15 及 H16 各自与轻链变体 L10 配对, 以分别产生抗体变体 H15-L10 及 H16-L10。

[0383] 以血小板凝集测定法评价这些变体, 以判定其活性。表 14 中所示的数据显示: 以人类序列取代整个 HCDR1 破坏了抗 vWF 活性。此显示着 HCDR1 中剩余的三残基 (例如在位



置 H31 上的 D、在位置 H33 上的 G、及在位置 H35 上的 D) 对于保留活性而言具有重要性,即使这些残基可能不会直接接触抗原,如同由 Celikel, 等 (Nat. Struct Biol 5:189) 提出的晶体结构所指示。

[0384] 表 14 “超级人源化”变体的 EC<sub>50</sub> 值

[0385]

抗体	EC <sub>50</sub> (nM)
NMC-4 嵌合体	0.18±0.03 (n = 9)
H9, L9 (CDR- 移植)	0.12 (n = 2)
H12, L9	0.29
H13, L9	0.16 (n = 2)
H14, L9	0.13 (n = 2)
H13, L10	0.20
H14, L10	0.22±0.05 (n = 5)
H14, L11	1.63
H15, L10	ND
H16, L10	ND

[0386] 实施例 3 :抗体的同种型的重构 (reformat)

[0387] 在一例示方法中,由于 IgG1 为关于补体 (complement) 活化及引发效应子应答的活性同种型,可能期望将 VH 变体由突变的 IgG1 形式重构成 IgG4 形式,尽管 IgG4 相对而言较不具活性。例如,将候选 VH 变体由突变的 IgG1 形式转化成 IgG4 形式 (见例如 SEQ ID NO:144),以产生研发用的候选者;此外,重新改造轻链及重链开放阅读框架 (open readingframes),以并入 5' 端 (例如 XhoI 及 HindIII 位点) 及 3' 端 (例如 BamHI 及 NotI 位点) 上的限制核酸内切酶位点,以辅助将其亚克隆至表达载体 pST0518 的多重克隆位点,而用于下游细胞系发展及大规模抗体生产 (表 15)。

[0388] 举例而言,通过以 IgG4 恒定区取代 IgG1 恒定区,并在重链表达盒 (cassette) 的 5' 端上引入 XhoI 及 BamHI 位点、而在 3' 端上引入 HindIII 及 NotI 位点,将两人源化 VH 变体 H9 及 H14 转化成 IgG4 形式。IgG1 及 IgG4 两者在靠近可变区及恒定区的接合处皆包含自然生成的 ApaI 位点,此位点被用来在 IgG4 (取代在 IgG1) 中克隆。将 BamHI 及 NotI 限制位点置放于序列的 3' 端上,以辅助稍后至 pST0518 载体内的亚克隆。利用 Blue Heron Biotechnology (Bothell, WA), 定制化合成具有加入 BamHI 及 NotI 位点、由 ApaI 位点

至终止密码子 (termination codon) 的内含子缺失 (intron-deleted) 的 IgG4 恒定区序列。再者, 通过以被改造成在重链可变区的 5' 端包含 HindIII 及 XhoI 且插入 Ig $\kappa$  信号序列的引物进行重叠 PCR (overlapping PCR), 将 pST0518 载体中的信号序列变成 Ig $\kappa$  前导序列。

[0389] H9 及 H14 重链序列有相同的引物区, 因此两者均使用相同的引物及克隆策略。产生两独立的 PCR 产物, 各包含在 huNMC4-H9 (及 huNMC4-H14) 重链可变区中所必须的变化其中之一。利用 pIRESdsRed-HUL10 作为模板以及引物 IgKLF (SEQ ID NO: 100) 及 IgKHnmcR (SEQ ID NO: 101) (见表 15a 及 15b), 进行在正向引物上包含 XhoI 及 HindIII 限制位点且扩增 Ig $\kappa$  信号肽的 PCR 反应, 接着进行利用 pCDNA6-H9 (或 pCDNA6-H14) 作为模板以及引物 14VHF (SEQ ID NO: 102) 及 14VHR (SEQ ID NO: 103)、并与第一 PCR 反应重叠 30 个核苷酸的第二反应步骤。PCR 产物包含 H9 (或 H14) 可变区以及 IgG1 恒定区经过 ApaI 位点的前五个氨基酸; 恒定区的前五个氨基酸在 IgG1 与 IgG4 之间并无不同。该反应在 ApaI 位点之后加入 NotI 位点, 以辅助在插入 IgG4 恒定区之前的可变区的克隆。通过第三 PCR 步骤 (利用前两步的反应产物作为模板、第一反应之正向引物 (IgKLF)、及第二反应的反向引物 (14VHR)), 在上游加入  $\kappa$  前导区; 以 XhoI/NotI 消化来自此反应的产物, 并将其插入以相似方式消化的质粒骨架 pCIneo 中, 此连接 (ligation) 产生了克隆中间体 pCI-NMC4-VH9var (或 pCI-NMC4-VH14var), 其含有 Ig $\kappa$  前导区及 NMC4-H9 (或 H14) 的可变区。以 ApaI 及 NotI 消化来自于 Blue Heron Biotechnology 且含有重新 (denovo) 合成的 IgG4 恒定区的质粒, 以凝胶纯化 (gel-purified) 1kb 的 IgG4 恒定区片段并连接入 ApaI/NotI 消化的 pCI-NMC4-VH9var (或 pCI-NMC4-VH14var), 如此便产生了 pCI-NMC4-VH9 及 pCI-NMC4-VH14。在转化成 DH5 $\alpha$  细胞后, 对来自各自克隆的质粒插入物进行测序以确认其为正确。

[0390] 表 15a 用于重链 PCR 反应中的引物

[0391]

名称	序列
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAGCTTCCACCATGGAGACAGACACACTCCT (SEQ ID NO: 100)
IgKHnmcR	5'ACCCGGACCGGATTCTGCAGCTGCACCTGTCCAGTGGAACTGGAACCCAGAGC (SEQ ID NO: 101)
14VHF	5'CAGGTGCAGCTGCAGGAATCCGGTCCG (SEQ ID NO: 102)
14VHR	5'CCTATGCGGCCGCGGGCCCTTGGTGAAGCGGAGGAAACGGT (SEQ ID NO: 103)

[0392] 表 15b 用于重链构建的 PCR 反应

[0393]

PCR	正向引物	反向引物	模板	产物
1st	IgKLF	IgKHnmcR	pIRESdsRed-huL10	XhoI, HindIII, Igκ信号肽
2nd	14VHF	14VHR	pCDNA6-huH9, (或 pCDNA6-huH14)	hu-H9 可变区, ApaI, NotI (或 hu-H14 可变区, ApaI, NotI)
3rd	IgKLF	14VHR	以上两 PCR 反应的产物	Hu-VH9 (或 VH14) 可变区

[0394] L9 及 L10 轻链中的变化通过 PCR 来完成。由于 L9 及 L10 轻链有相同的引物区,因此两者均使用相同的引物及克隆策略。每一轻链产生两独立的 PCR 模板。第一 PCR 步骤并入在 5' 端上的 XhoI 及 HindIII 限制位点;第二反应步骤与第一反应步骤重叠 30 个核苷酸,且在片段的 3' 端并入 BamHI 及 NotI 位点,此两独立的重叠 PCR 产物在第三 PCR 反应中被用作模板,以通过利用来自第一 PCR 步骤的正向引物及来自第二步骤的反向引物将其扩增,而产生包含这些变化的最终重叠 PCR 产物;来自第三 PCR 反应的产物以 XhoI/NotI 加以消化,并将其插入于以类似方式消化的质粒 pCI-neo (Invitrogen) 中,产生质粒 pCI-NMC4-VL9 及 pCI-NMC4-VL10 (用于轻链构建的例示引物及策略见表 16a 及 16b)。

[0395] 表 16a 用于轻链 PCR 反应中的引物

[0396]

名称	序列
IgKLF	5'CCTATCTCGAGAAGCTTCCACCATGGAGACAGACACACTCCT (SEQ ID NO: 100)
IgKLNMCr	5'GCTGCTGGGGCTCTGGGTCATCTGGATGTCTCCAGTGG AACCTGGAACCCAGAGC (SEQ ID NO: 104)
10VLF	5'GACATCCAGATGACCCAGAGCC (SEQ ID NO: 105)
hKcR	5'CCTATGCGGCCGCGGATCCTATCAACACTCTCCCCTGTTGAAGCTCT (SEQ ID NO: 106)

[0397] 表 16b 用于轻链构建的 PCR 反应

[0398]

PCR	正向引物	反向引物	模板	产物
1st	1	2	pIRESdsRED-huL10	XhoI, HindIII, 信号肽
2nd	3	4	pIRESdsRED-huL9 或 pIRESdsRED-huL10	huL9 或 huL10 可变区和 hIgκ 恒定区, BamHI, NotI
3rd	1	4	1st 及 2nd PCR 产物	NMC4-VL9 或 NMC4-VL10 IgG4 序列盒

[0399] H9-L9 及 H14-L10 的 IgG4 同种型是由以上在实施例 1 中所述的 HEK293T 细胞而产生,且利用蛋白质 A 亲和层析法加以纯化;接着以 vWF 介导的血小板凝集测定法来测试纯化

抗体,以判定相对效力。如表 17 所示,转化至 IgG4 同种型对效力不生影响。

[0400] 表 17 前导抗 vWF IgG1 及 IgG4 变体的瑞斯特霉素诱导血小板凝集活性的比较

抗体变体	同种型	血小板凝集 EC <sub>50</sub> 平均值 (来自 2 个独立实验)
NMC-4 嵌合体	IgG1 嵌合体	1.25 nM (1.3nM, 1.2nM)
H9-L9	IgG1	1.30 nM (1.3nM, 1.3nM)
H9-L9	IgG4	1.40 nM (1.3nM, 1.5nM)
H14-L10	IgG1	1.20 nM (1.1nM, 1.3nM)
H14-L10	IgG4	2.15 nM (2.3nM, 2.0nM)

[0401] 实施例 4: 抗体至 vWF 或 A1 结构域的结合

[0403] 克隆 His 标记 (His-tagged) 的 A1 结构域抗原: 不受限于本发明的理论, 假设 NMC-4 结合至 vWF 的 A1 结构域, 此一般仅在 vWF 被活化时 (例如在高剪切情况下) 方可达到。另一方法, 可能期望表达 vWF 的分离 A1 结构域, 其被揭示可以等于完全活化 vWF 者的效力结合 GPIb- $\alpha$  (Celikel 等, 1997), 因此, 克隆 A1 结构域以作为微孔结合研究的底物。包含全长人类 vWF cDNA 的质粒克隆是购自于 ATCC (目录编号 67122), vWF A1 结构域 (例如残基 499-729) 是利用引物 vWF-A1-For (5' -CCCAGGAATTCCTCGGAACCGCGTTGCAC-3') (SEQ ID NO: 112) 及 vWF-A1-Rev (5' -CCGATGCGCCGCTCACCTCTTGGGCC CAG-3') (SEQ ID NO: 113) 而自此克隆加以扩增。将 PCR 产物以凝胶纯化、再以 EcoRI 及 NotI 消化, 并将其克隆入 pETDuet-1 载体内。将所连接成的产物转化成 DH5  $\alpha$  感受态细胞 (competent cell), 以产生 A1 结构域的氧化形式。

[0404] 为构建表达大鼠 A1 结构域的质粒, 遵循产品生产商的说明 (Molecular Research Center, Inc., Cat#DN127, Cincinnati, Ohio), 利用 DNazo1 试剂由大鼠肝脏分离出大鼠染色体 DNA; 接着, 利用引物 Rat-vWF-A1-F (5' -AGCGAATTCCTCGGAACCGCGTTGCAC AACTTC-3') (SEQ ID NO: 114) 及 Rat-vWF-A1-R (5' -AGTGCAGCCGCTTATCACCTTTGGGTCCTGGTGATGAAACC-3') (SEQ ID NO: 115), 将染色体 DNA 用于 PCR 反应。将 PCR 产物以 EcoRI 及 NotI 加以消化, 并克隆入 pETDuet-1 载体的相同位点中; 将所连接成的产物转化入 DH5  $\alpha$  感受态细胞。

[0405] 以 25ml 的过夜细菌培养物 (例如带有质粒 p35 [pET-Duet-Rat-A 或 p36 [pET-Duet-human-A 的 Origami B 菌株), 接种含有抗生素羧苄西林 (Carbencillin)、卡那霉素、四环素的 1 公升细菌培养基 (LB 或 2 $\times$ YT), 使培养液在 37 $^{\circ}$ C 下的摇瓶中生长至 OD<sub>600</sub> 为 0.6-0.8。通过加入 IPTG 至 1mM 的最终浓度来诱导重组蛋白质的表达; 接着, 在 37 $^{\circ}$ C 下继续培养培养液持续另外 4-5 小时; 之后在 JA-10 转子 (贝克曼) 中以 6000rpm 离心, 收集细菌。将细胞沉淀物 (cell pellet) 于 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻, 或立即通过使沉淀物在含有两片溶解的完全蛋白酶抑制剂 (Roche) 的 20ml PBS 中重新悬浮加以处理, 对所得的细胞悬浮液在冰块上施行两次 2 分钟的细胞破裂循环 (例如使用在 1-2 的固定负载循环设定及输出控制设定下、配备着微量滴管尖头 (micro-tip) 的 Branson Sonifier 250)。在 4 $^{\circ}$ C 下, 以 16000rpm 于 JA-20 转子 (贝克曼) 中离心这些细胞溶解产物 (cell lysate) 持续 30 分钟;

以 0.45  $\mu\text{m}$  的针头过滤器过滤上清液,之后利用已在结合缓冲液 (5mM 的咪唑,0.3M NaCl, 50mM Tris-HCl, pH 8.0) 中平衡过且填充着 His-Select HF 镍亲和性凝胶 (Sigma) 的柱, 以将流速调整于 1ml/min 的注射泵来施行层析法。在以 20ml 的结合缓冲液冲洗柱后,以 250mM 的咪唑,0.3M NaCl,50mM Tris-HCl, pH 8.0 洗脱蛋白质,并收集 1ml 的级分;大多数蛋白质在前 4 个洗脱馏分内便被洗脱。在经考马斯 (Coomassie) 蓝染色的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (polyacrylamide gel) 上监测蛋白质的大小 ( $\sim 28\text{kD}$ ) 及完整性。集合峰级分,若有必要则将其浓缩至 2.5ml,接着利用 PD-10 柱 (Amersham/GE-Healthcare) 去盐化成 PBS。利用劳里 (Lowry) 蛋白质测定法 (BioRad DC 蛋白质测定法) 来决定蛋白质浓度。

[0406] 结合动力学:施行敏感性测定以评估  $K_{\text{on}}$ 、 $K_{\text{off}}$  及  $K_{\text{d}}$  数值,从而合成并纯化铈 (N1 螯合剂) 抗体缀合物。利用解离增强型镧荧光免疫测定法 (DELFI A),测量这些以铈标记的 NMC-4 嵌合体及同种型对照抗体至固定化 A1 抗原的结合。

[0407] 举例而言,以铈标记对照抗体 (例如同种型对照组 MOPC-21,来自人类骨髓瘤的 IgG1/ $\kappa$ ;Sigma-Aldrich, St Louis MO) 及 NMC-4 嵌合体;简言之,将抗体加入经无菌过滤处理的磷酸钠缓冲液 (96mM, pH 7.4),并广泛地透析成磷酸盐缓冲液 (PBS, 1.47mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 8.1mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.4, 138mM NaCl 及 2.67mM KCl),以移除低分子量一级胺。在 4 $^{\circ}\text{C}$  下,以 9500rpm (7000 $\times g$ ) 的 JA-20 转子在洗过的 MicroSep 浓缩器中浓缩经透析的抗体持续 20 分钟,以含有最终浓度为 100mM  $\text{NaHCO}_3$ , pH 9.3 的 PBS 调整抗体至 4.0mg/ml。通过以温和地上下吸液,将 mAb/碳酸氢盐 (bicarbonate) 混合物 (0.250ml) 混合至含有以  $\text{Eu}^{3+}$  ( $\text{Eu-N1-ITC}$ ; Perkin Elmer LifeSciences, Waltham MA) 螯合的 0.2mg N1-(对异硫氰苄基)-二亚乙基三胺- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^3$ -四乙酸 (N1-(p-isothiocyanatobenzyl)-diethylenetriamine- $\text{N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^3$ -tetra acetic acid) 中,使抗体及胺反应性螯合剂的混合物在 4 $^{\circ}\text{C}$ 、不搅拌的情况下反应过夜。

[0408] 将经标记的抗体混合物上样至以 PBS 预平衡的独立 NAP-10 柱 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ),利用作为柱缓冲液的 PBS 收集级分 (例如 0.5ml);利用 SpectraMax 384 吸收度读板器测定样本的总蛋白质 (例如布莱德福试剂 (Bradford reagent);Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA);于 DELFI A 增强溶液 (Perkin-Elmer) 中以 1:10,000 稀释之后,通过利用 Victor2 多标记读板器 (Perkin-Elmer) 的时间分辨荧光法 (time-resolved fluorescence, TRF) 测定铈。集合对蛋白质及铈两者皆为阳性反应的级分,并将其上样至以电泳缓冲液 (Running Buffer) (50mM Tris, pH 7.4 和 138mM NaCl) 预平衡的新 NAP-10 柱;集合来自这些柱的对蛋白质及以铈标记两者皆为阳性反应的级分,并将其上样至以电泳缓冲液预平衡的 PD-10 柱,集合对蛋白质及以铈标记两者皆为阳性反应的级分,并通过铈标准液 (Perkin-Elmer) 加以校正的 TRF 来测定总蛋白质及铈含量。接着计算荧光:蛋白质比例。

[0409] 以来自人类 (例如在 100  $\mu\text{l}$ /孔中,30mM Tris, pH 7.4 及 300mM NaCl 或不含二价阳离子的 PBS 中的 25ng) 或大鼠 (例如 50ng/孔) 的 vWF 的 His-A1 结构域包被 Immulon-4 板的孔,4 $^{\circ}\text{C}$  下隔夜培养。在室温下,用清洗缓冲液 (Wash Buffer, 例如 50mM HEPES, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% Tween-20) 清洗反应盘三次,利用以 300  $\mu\text{l}$ /孔阻断缓冲液 (例如含有 3.0mg/ml 的无 IgG 的 BSA 及 0.1% 叠氮化钠的清洗缓冲液) 阻断 1 小时,且在使用前以清洗缓冲液清洗 5 次。

[0410] 如下施行平衡结合测定。将铈-抗体预先稀释入结合缓冲液（例如含有 100  $\mu$ g/ml 的无 IgG 的 BSA 及 0.1% 叠氮化钠的清洗缓冲液）中并上样至 96 孔板的各孔（例如 10  $\mu$ l/孔），以 SEALPLATE 膜密封住反应盘。振荡反应盘（例如在室温下  $\geq$  15 秒或者 60 秒，将 Titer Plate Shaker 速率设定在 4），将其置入含有湿纸巾的 Nalgene 盒内，于 37°C 下在封闭盒中培养 2 小时。就游离标记的测量而言，将上清液样本（4.0  $\mu$ l）由含有结合混合物的各孔转移至含有 DELFIA 增强溶液（100  $\mu$ l/孔）之一平行孔组中。为评估被结合的抗体，以清洗缓冲液清洗具有剩余结合混合物的 A1 包被的孔五次，在纸巾上轻拍干，且将 DELFIA 增强溶液（100  $\mu$ l/孔）加入至空孔以测量被结合的抗体。就测定校正而言，将 DELFIA 增强溶液（100  $\mu$ l/孔）加入未用孔并加入铈标准液（1.0  $\mu$ l/孔）。振荡反应盘（例如在室温下将 TiterPlate Shaker 速率设定在 5 持续 10 分钟），利用 Victor2 多标记读板器（Perkin-Elmer Wallac, Boston, MA）读取时间分辨荧光（TRF）强度，通过各自抗体的荧光：蛋白质比例（F：P）而将结合情形就铈螯合物含量加以归一化。通过将总结合（例如 Eu-NMC-4 的结合）扣除非特定结合（例如以 Eu 标记的同种型对照组的平均结合）计算特定结合。以 Scatchard(1949) 法计算结合位点的数目及  $K_d$  值，通过将  $\log(\bar{v}/(n-\bar{v}))$  对游离 Eu-NMC-4 浓度的对数作图以绘制出希尔图来估算结合状况，其中  $n$  为每孔的高亲和性结合位点的数目， $\bar{v}$  为每孔的特异结合 Eu-NMC-4mAb 的平均数，且游离 Eu-NMC-4 嵌合体则由溶液相中所测量的 TRF 读数加以计算。

[0411] 此分析揭示出两类结合位点： $K_d$  为 0.37nM 的高亲和性位点及  $K_d$  为 5nM 的低亲和性位点；同理，对来自抗 His mAb 所捕获的大鼠 vWF 的 His-rA1 的结合还展现出具有 0.19 及 3.4nM 的  $K_d$  值（表 17）的两类结合位点。

[0412] 利用相同规则决定结合动力学，除了在不同时点以指示浓度（100  $\mu$ l/孔）的以铈标记的抗体代替清洗缓冲液以外。立即封住反应盘、振荡（例如在室温下将 Titer Plate Shaker 速率设定在 4 持续 15 秒）、且在 37°C 下培养持续一段指定时间；以清洗缓冲液清洗含有结合混合物的反应盘五次，在纸巾上轻拍干，记录每一反应盘的清洗时间。如上所述，将 DELFIA 增强溶液（100  $\mu$ l/孔）添加空孔中以测量结合标记。通过利用 Prism 软件（GraphPad Software Inc., San Diego, CA）以下列方程式来对时间拟合特异结合，测量每一抗体浓度的表观结合速率（apparent on-rate） $k_{on, app}$ 。

$$[0413] \quad B = B_{max} \cdot (1 - e^{-k_{on, app} \cdot t})$$

[0414] 将表观结合速率（ $k_{on, app}$ ）对 Eu-mAb 浓度作图，数据用线性方程式拟合：

$$[0415] \quad k_{on, app} = k_{on}[mAb] + k_{off}$$

[0416] 其中结合速率常数  $k_{on}$  为拟合出的斜率，[mAb] 为 Eu-NMC-4 的浓度，而解离速率  $k_{off}$  则为拟合出的截距。

[0417] 所计算出的与来自人类或大鼠 vWF 的 His-A1 结合的 NMC-4 嵌合体的解离半衰期通过下列方程式加以计算：

$$[0418] \quad t_{1/2, dissoc} = \frac{\ln(2)}{k_{off}}$$

[0419] Eu-NMC-4 至人类或大鼠 vWF 的 His-A1 的特异结合符合单指数结合方程式，由此式可获得关于每一标记抗体的浓度的表观结合速率  $k_{on, app}$ （例如来自指数结合曲线拟合的

常数  $k$ )。如  $k_{on,app}$  对 Eu-NMC-4 浓度的图式所示:对两抗原的表观结合速率皆为剂量依赖型的。结果整理于表 17 中,且揭示出 NMC-4 嵌合体对于人类 A1 结构域具有  $0.32 \pm 0.07$ nM 的  $K_d$  值,而对于大鼠 A1 结构域则具有  $0.28 \pm 0.01$ nM 的  $K_d$  值。在两情况中,这些结果与由平衡结合所测定的  $K_d$  值极为一致。这些结果还显示:两 A1 物种的抗原-抗体复合物皆可长久存在,人类及大鼠抗原的体外解离半衰期则分别为 44 及 69 分钟。

[0420] 表 18 Eu-NMC-4 嵌合体与来自人类及大鼠 vWF 的 His-A1 结构域的动力及平衡结合 (37°C 下)

	His-A1 (人类)	His-A1 (大鼠)
<b>动力常数</b>		
[0421] $k_{on}$ ( $M^{-1} min^{-1}$ )	$4.1 \times 10^7$	$1.4 \times 10^7$
$k_{off}$ ( $M^{-1}$ )	$1.6 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-2}$
解离半衰期 (min)	44	69
$k_{on} / k_{off}$	0.39 nM	0.70 nM
<b>平衡结合 (<math>K_d</math>)</b>		
[0422] His-A1	$0.316 \pm 0.068$ nM ( $n = 10$ )	$0.276 \pm 0.011$ nM ( $n = 5$ )
<b>同源竞争 (<math>K_i</math>)</b>		
His-A1	$0.275 \pm 0.064$ nM ( $n = 4$ )	$0.297 \pm 0.128$ nM ( $n = 3$ )

[0423]  $\dagger k_{on,apparent}$  剂量依赖的截距

[0424]  $\dagger \dagger$  EU-NMC-4 与直接包被的抗原 (人 vs. 大鼠) 的结合的  $K_d$ , 对 T 检测的显著性为不具统计学显著性 ( $P = 0.6892$ )。

[0425] 误差以 SEM 表示。

[0426] 可施行竞争结合研究以判定  $K_i$  值 (例如抗原的相对亲合力的量度)。除了在此案例中以外,如上所述施行结合动力的测定,施用  $80 \mu l$  / 孔的结合缓冲液 (例如含有  $100 \mu g/ml$  的无 IgG 的 BSA 及  $0.1\%$  叠氮化钠的清洗缓冲液),接着施用  $10 \mu l$  / 孔 Eu-NMC-4 或无铕标记的竞争剂及  $10 \mu l$  / 孔的无标记竞争抗体,范围自  $10^{-12}M$  至  $10^{-7}M$  的连续稀释一式两份;以铕标记的抗体的最终浓度为  $100pM$ 。在螯合剂 DTPA ( $1 \mu M$ ) 存在下,非特异背景结合的水平大幅降低,故此也包含在竞争结合测定中;此外,通过已利用碘乙酰基 (iodoacetyl) 凝胶以从蛋白质制备液中移除任何还原的 A1 而加以纯化的 His-A1 令各孔的包被最优化。培养混合物达 3.75 小时,以使反应达到完全平衡,清洗并如上述以 TRF 判定结合的标记抗体。利用 Prism 软件 (GraphPad, Inc.), 以“一位点竞争”模型拟合出抑制曲线以获得  $IC_{50}$  值;并利用由平衡结合实验的 Scatchard 分析所测量的  $K_d$  值,以 Cheng & Prusoff (1973 Biochem Pharm. 22:3099) 的方程式计算  $K_i$ 。

[0427] 通过比较由无标记的 NMC-4 嵌合体的同源竞争所获得的  $K_i$  值,与 Eu-NMC-4 结合至抗原所测量到的亲和力 ( $K_d$ ), 来说明竞争结合测定的标准化。就对人类 His-A1 的同源竞争而言, NMC-4 嵌合体为 Eu-NMC-4 结合的强力抑制剂,  $K_i$  值为  $0.28 \pm 0.06$ nM (表 19), 与所观察到的  $K_i$  值  $0.32 \pm 0.07$ nM 一致;同理,就对大鼠 His-A1 的同源竞争而言, NMC-4 嵌合体具有  $0.297 \pm 0.128$ nM 的  $K_i$  值 (表 18), 与  $0.276 \pm 0.011$ nM 的  $K_d$  值一致。相较之下,无标

记的同种型对照（来自人类骨髓瘤血浆的 IgG1/ $\kappa$ ）在 Eu-NMC-4 结合至 A1 抗原上并无抑制效应。

[0428] 表 19 所选择的人源化 NMC 变体的结合活性（竞争测定的  $K_i$ ）比较

[0429]

抗体变体	同种型	$K_i$ (平均值±标准误差)
NMC-4 mAb	mIgG1	0.60 ± 0.13 nM (n=3)
NMC-4 嵌合体	IgG1 嵌合体	0.28 ± 0.06 nM (n=4)
IgG/ $\kappa$ 对照	IgG1	无法测得
H2-L5	IgG1	0.96 ± 0.27 nM (n=3)
H9-L9	IgG1	3.51 ± 1.21 nM (n=4)
H9-L9	IgG4	3.53 nM (n=1)

[0430] 接着利用竞争结合测定来测试人源化 NMC-4 变体 H9L9IgG1 及 IgG4 的效力。此两同种型的 CDR- 移植 H9L9 变体显现出相同 nM 活性, 尽管效力上小于同源 NMC-4 嵌合体 (表 19)。

[0431] 以竞争结合测定法来测试 AJW200 抗体。相较于与 Eu-NMC-4 结合至 His-A1 竞争的人源化 NMC-4 变体, Eu-NMC-4 结合至 His-A1 被 AJW200 强化, 其  $EC_{50}$  为 210pM (图 2)。Eu-NMC-4 结合至 His-A1 的希尔图显示出接近统一的希尔斜率 ( $n_H = 0.984$  及  $0.957$ ), 与在无协同性 (cooperativity) 下与单一类型的结合位点的结合一致。相较之下, 在 1.8nM 或 20nM AJW200 存在时 (分别见图 2C 及 2D) 的 Eu-NMC-4 结合至 His-A1 的希尔图显现大于 1 的希尔斜率 ( $n_H = 1.548$  及  $1.201$ ), 此表示正协同性 (cooperativity)。由 AJW200 介导的正协同性在两不同日所进行的两独立实验中被观察到, 这些结果不仅证实了 NMC-4 结合至与 AJW200 不同的 vWF 的 A1 结构域上的结合位点, 还指出至少就分离的 A1 片段而言, AJW200 使 NMC-4 能够结合至 GPIb- $\alpha$  结合位点。

[0432] 实施例 5: 抗体阻断血小板附着的能力

[0433] 抗体封闭在 vWF 上的 GPIb- $\alpha$  受体结合位点的证实是其在天然流动条件下对抗 vWF-GPIb 相互作用的能力。已由 Moake 及其同僚 (1986, J Clin Invest. 78:1456-61) 发展出的一方法发现以下事实: 当以组胺活化内皮细胞时, 其分泌出超大型 vWF (ULvWF), 其中 A1 结构域是处于开放 (例如活性) 构象中。因 ADAMS-13 介导的 ULvWF 的切割, ULvWF 在引入血浆时迅速瓦解 (Dong 等, 2002 Blood 100:4033-9)。

[0434] 在一例示方法中, 分出第一代 (passage) (P1) HUVEC, 并以  $1 \times 10^5$  细胞 / 培养皿的密度接种至 35mm 的培养皿上, 培养 7 天, 且在第 7 天 (在其 100% 汇合后 2-3 天) 时使用。在 1.2mL/min 的流速下, 以 CFSE 标记的人类血小板轻易地附着至 HUVEC (图 3A); 当在室温下以 25  $\mu$ M 的组胺预处理细胞达 10 分钟时, 更多血小板附着至 HUVEC (图 3B); 当血小板在含有浓度为 10  $\mu$ g/ml 的 NMC-4 的缓冲液中灌注上单层时, 此种血小板的附着被完全抑制 (图 3C); 而当血小板在浓度为 18  $\mu$ g/ml 的抗 GPIb- $\alpha$  抗体 (例如 AK2) 存在下被灌注时, 则血小板的附着受到部分阻断 (图 3D)。相较之下, 浓度为 18  $\mu$ g/ml 的小鼠对照 IgG 并未阻止血小板附着至 vWF 聚合物上 (图 3E), 此显示血小板附着至 HUVEC 确实是由内皮衍生



的 vWF 与血小板 GPIb- $\alpha$  之间的相互作用介导。当从每回合所截取的 20 个图像测量被血小板所覆盖的面积并利用 Compix 软件加以定量时,相较于对照抗体所造成的可忽略效应,NMC-4 将血小板附着性减少  $> 95\%$ 。

[0435] 实施例 6 :抗体预防血管阻塞的能力

[0436] 利用动脉血栓的氯化铁模型,以评估 NMC-4 嵌合体及人源化衍生物(例如 H14, L10)相较于 AJW200 的抗血栓活性。对侧颈动脉是透过唾腺及随附脂肪组织重新定位至切口的头颅侧而分离。使颈动脉外露,并将其置于折叠成可作为摆放颈动脉的支架且提供氯化铁(7.5%)溶液的表面的滤纸(例如 4mm $\times$ 5mm)上。在施加 FeCl<sub>3</sub> 溶液 4 分钟后,置放流量探测器于颈动脉周围,并利用 Transonic Systems Inc. 流动系统(Ithaca, NY)测量流量,直至阻塞时(在对照大鼠中一般为 10 分钟)或 45 分钟为止。在 1  $\mu$ l/g 大鼠体重的体积下,4 只大鼠的各组(盐水的 n = 6)皆投以范围例如由 5 至 0.01mg/kg 的 NMC-4 嵌合体、V14、L10、AJW200 或对照 IgG 的 4 种剂量。无菌过滤抗体制备液,并在使用作动物研究之前,在遵照生产商的规则下利用 LIMULUS AMOEBOCYTE ASSAY 试剂盒(BioWhittaker)加以测试,以确保低内毒素含量;以 HPLC 分析估计单分散性(mono-dispersity)。

[0437] 如图 4 所示,NMC-4 及 AJW200 两者大幅地抑制了血管阻塞。NMC-4 在剂量为 0.03 及 0.1mg/kg 下显现出类似于 AJW200 的 ED<sub>50</sub>,人源化衍生物 H14, L10 还显现出类似的活性,ED<sub>50</sub> 介于 0.03 及 0.1mg/kg 剂量之间。

[0438] 实施例 7 :抗体对出血时间及失血的影响

[0439] 失血有时为与抗血小板剂(例如抗 vWF 抗体)相关的有害副作用,因此,可能必须评估人源化 NMC-4 抗体促成出血并发症的可能性。为此,实施标准出血时间测定,在施行尾部横切之前先施用 30 分钟的抗体对照、NMC-4 嵌合体、或 AJW200。就尾部横切而言,切下尾部的末端(例如 0.5mm)并将尾部置入已知体积的温盐水中,测量停止出血所需要的时间;于估算出血时间过程中,还通过估算在盐水中所收集的血红球的血红蛋白含量来测量失血量。为此,以低速离心使红血球成粒状,将其悬浮于含有 1% TritonX100 的盐水中,调整最终体积为 5ml,通过测定在 420nm 下的吸收度而测量溶液的血红蛋白浓度。

[0440] NMC-4 嵌合体显现出对于显著增加的出血时间,与人源化衍生物 H14-L10 相同的 ED<sub>50</sub> 剂量 0.09mg/kg;在与此两抗体在动脉血栓的 FeCl<sub>3</sub> 模型中的效力相关联的剂量 0.03mg/kg,并未有出血时间延长或失血量增加的情形。NMC-4 嵌合体及其人源化衍生物显现出比 AJW200(其在大鼠中出血时间增加时的 ED<sub>50</sub> 更接近其抗血栓活性时的 ED<sub>50</sub> 剂量)略高的 ED<sub>50</sub> 剂量应答(dose response),此显示 NMC-4 相较于 AJW200 提供了更加改良的治疗窗口。

[0441] 表 20 NMC-4 嵌合体及其人源化衍生物 H14, L10 相较于 AJW200 在大鼠中的出血时间及失血量上的效应

抗体	出血时间 (min)		失血量 (ML)	
	平均值 $\pm$ 标准误差	(n)	平均值 $\pm$ 标准误差	(n)
[0442] 盐水	3.1 $\pm$ 0.3	(16)	0.287 $\pm$ 0.088	(9)

	NMC-4 (嵌合体)	ED <sub>50</sub> = 0.09 mg/kg	
	0.01 mg/kg	2.7 ± 0.3 (2)	0.059 ± 0.009 (2)
	0.03 mg/kg	4.1 ± 0.2 (4)	0.076 ± 0.014 (4)
	0.10 mg/kg	19.7 ± 0.9 (2)	1.503 ± 0.485 (2)
	0.30 mg/kg	32.7 ± 4.4 (3)	1.501 ± 0.213 (3)
	3.00 mg/kg	32.3 ± 2.3 (2)	1.106 ± 0.243 (4)
	H14, L10 (人源化)	ED <sub>50</sub> = 0.09 mg/kg	
[0443]	0.03 mg/kg	2.03 ± 0.35 (3)	0.094 ± 0.035 (3)
	0.10 mg/kg	15.30 ± 1.70 (4)	0.630 ± 0.294 (4)
	0.30 mg/kg	26.45 ± 3.09 (4)	1.883 ± 0.312 (4)
	AJW200	ED <sub>50</sub> = 0.05 mg/kg	
	0.01 mg/kg	2.8 ± 0.25 (2)	0.177 ± 0.059 (2)
	0.03 mg/kg	8.2 ± 1.56 (7)	0.250 ± 0.059 (4)
	0.10 mg/kg	25.1 ± 0.4 (5)	1.943 ± 0.420 (2)
	0.30 mg/kg	29.2 ± 0.72 (5)	2.074 ± 0.521 (3)
	3.00 mg/kg	30.9 ± 0.62 (3)	2.912 ± 0.243 (4)

[0444] 这些抗体的有害副作用在止血上的另一参数为失血量,其是在测定出血时间时针对所收集的血液加以测定。又,在剂量高于 0.1mg/kg 时,这些抗体诱发出明显的失血量;然而,在剂量为 0.3 及 3mg/kg 时,相同剂量下 AJW200 引发比 NMC-4 嵌合体高出更多的失血量,尽管这些差异仅在 3.0mg/kg 组(其中 n = 4 而非 n = 3)接近在统计上的显著性(表 20)。H14, L10 抗体变体对亲本 NMC-4 嵌合体并未表达出明显的差异。

[0445] 实施例 8:抗体在血小板及白血球循环数量上的效应

[0446] 假设某些抗血小板剂可抑制血栓形成,而同时可能引发血小板减少症(thrombocytopenia)(Hansen 等, J Pharmacol Exp Ther. 298:165-71(2001))。为测定 NMC-4 在被治疗动物中的白血细胞(WBC)及血小板循环数目上的效应,便以 1mg/ml 的 NMC-4 注射(例如以静脉方式)至重量 230-260g 的 5 只大鼠的一组,而以载体对照(vehicle control)(例如外科手术级 PBS)注射至 3 只大鼠的对照组。在注射之前,以例如 HEMAVETHEMATOLOGY ANALYZER™(Drew Scientific),利用尾部出血测量基线血细胞数量。注射入抗体或盐水后,在通过利用毛细吸管从未麻醉大鼠眼后抽取,在上至 48 小时(例如 30 分钟、2, 4, 24, 及 48 小时)的预定时间点时收集血液样本,接着将约 40 μL 的血液转移至含有 5 μL 酸化柠檬酸葡萄糖抗凝液(ACD)的管中,并立即在 HEMAVET 细胞计数器中取样,以测定血小板及白血细胞的数量。就各次抽血而言,两眼交替进行取样。

[0447] 在所分析的任何时间点,NMC-4 对血小板数量的影响甚微;在注射后 30 分钟时,观察到白血细胞短暂减少了 37.5% (p = 0.016),但在注射入 PBS 药物时,也观察到类似的减少现象。在 NMC-4 及对照载体处理组两者中,白血细胞水平皆在注射后 2-4 小时之间回到基线。

[0448] 实施例 9:抗体表达用的细胞系的建立

[0449] 可开发出基于鼠类人工染色体表达(ACE)平台的高产量哺乳类蛋白质表达系统,该 ACE 平台已被改造成含有可利用突变的 λ-整合酶(integrase)(例如 ACE 整合酶)结合

靶向穿梭载体 (targeting shuttlevector) 而载入异源基因序列的多个具位点特异性的重组受体位点 (recombination acceptor sites) (Lindenbaum 等, (Nucl. Acid Res. 32(21) : e172(2004) ;美国专利申请第 2003/0119104 A1 号及第 2006/0246586 A1 号)。可利用此系统产生用于表达所选的人源化变体及 NMC-4 嵌合体的稳定细胞系。

[0450] 以 NotI 加上 HindIII (轻链载体) 或 XhoI 及 BamHI (重链载体) 来消化质粒 pCI-NMC4-VL10 及 pCI-NMC4-VH14 的插入物, 随后将其克隆入 pST0518 载体的 MCS 1 (轻链) 及 MCS 2 (重链) 中。带有前后串联的重链及轻链插入物的 pST0518 载体作为用以递送至具有不同抗性基因 (resistance genes) 的 ACE 靶向载体 (ATV) 内的穿梭载体, 此是得自于由 Lindenbaum 等人所说明的靶向载体 (Nucl. Acid Res. 32(21) : e172(2004) ;美国专利申请: 2003/0119104A1 & 2006/0246586A1)。为了将含有抗体重链及轻链两者的盒 (cassette) 递送至 ATV 内, 以 I-CeuI 及 PI-SceI 寻靶内切酶 (homing endonuclease) (New England Biolabs, MA) 来消化 pST0518-VH14, VL10 载体; 凝胶纯化 VH14 加 VL10 片段, 并将其克隆入以相同的 I-CeuI 及 PI-SceI 内切酶预先消化的 pZeo 及 pHygro-ATV 的相同位点中。此即产生质粒 pNHT605-H14L10-IgG4 (hyg<sup>R</sup> 基因) 及 pNHT607-H14L10-IgG4 (p zeo<sup>R</sup> 基因)。

[0451] 同理, 构建带有 NMC-4IgG4 嵌合体的 pST0518 靶向载体, 并将前后串联插入物亚克隆入 pZeo 及 pHygro-ATV 载体内, 如此产生质粒 pNHT623 (人类 IgG4 嵌合体加 hyg<sup>R</sup> 基因) 及 pNHT624 (人类 IgG4 嵌合体加 zeo<sup>R</sup> 基因)。

[0452] 为靶向整合至平台 ACE, 以 6 孔培养皿的每孔  $0.4 \times 10^5$  个细胞的密度接种宿主 ChK2 ACE 平台细胞并隔夜培养。在转染前 3 小时, 以无血清培养基更换培养基; 3 小时后, 根据生产商的使用说明, 以  $1 \mu\text{g}$  的载体及  $1 \mu\text{g}$  ACE 整合酶表达载体用 LipofectAMINE PLUS 试剂 (Invitrogen) 加以复合进行转染。24 小时之后, 将细胞扩充至 15cm 的培养皿上; 第二天, 将  $3.0 \mu\text{g/ml}$  的 zeomycin 或潮霉素 (取决于所用的载体) 加入培养基中; 在 14 天的筛选后, 利用克隆环分离出抗药性菌落, 扩增各自克隆以用于抗体生产的分析。

[0453] 实施例 10 : NMC-4 抗体的体内效力及安全性

[0454] 以一体内动物 (例如狒狒) 模型来测试人源化 NMC-4 抗体的效力及安全性。

[0455] 在一例示方法中, 以盐酸氯胺酮 (ketamine hydrochloride) (购自 Premier 制药公司的 Anaket-V™) 麻醉狒狒 ( $10\text{mg/kg}$  IM/30 分钟或有必要时维持全身麻醉), 并以加热桌将其体温维持于  $37^\circ\text{C}$ 。其次, 缓慢地解剖开一节 4-5cm、周围无组织的股血管, 连接所有在股动脉及股静脉中的附近分支。接着, 在股动脉及股静脉中切出一小切口, 插入血管尖端并以外科手术线固定, 接将硅氧烷管贴附至血管尖端, 以使动脉血液分流入股静脉; 绕过毛细管而由动脉直接至静脉循环的分流增加血液流量至约  $150-300\text{mL/分钟}$ 。将管型超因波流量探针 (Transonic Systems Inc, Maastricht, the Netherlands) 贴附至硅氧烷管, 容许血流稳定约 20 分钟; 整个实验中连续地测量平均及位向 (phasic) 血液流量, 将分流用于给药以及血液取样。

[0456] 其次, 利用马丁针持针器 (Hegar-Baumgartner TC Gold 14cm, 产品码 20. 634. 14), 通过以最大凹陷程度重压内皮层持续 10 秒钟, 在极靠近血管尖端处损伤股动脉的内皮层。生产出两重叠创伤, 并将一可调式塑料缩窄器置于创伤位点上方, 以将血液流量减少至基线值的  $10\% - 20\%$ 。观察到因血栓形成而使血液流量逐渐减少, 当血液流量减少至  $\leq 5\text{mL/min}$  时, 打开缩窄器以取出富含血小板的血栓; 其次, 再度使外部变狭窄并重新开始血栓形成的程序。此种在机械复位之后的血液流量减少的重复模式被称为循环流减缩

(CFR)。测量为时间的函数的 CFR 数目,用三十分钟记录基线循环流减缩量;注射盐水后并监测 CFR 持续另一个三十分钟。使用如实施例 3 中所述的人源化 NMC-4 变体 H9L9 IgG4(此处还称为 GBR 600)。

[0457] 可利用两方法来评估给药时的出血状况。在第一方法中,于前臂表面处测定皮肤模板出血时间。在手臂附近使用压力袖并在 40mmHg 下膨胀,接着以 Surgicut 装置 (ITC, Edison, NJ) 诱导伤口。将表皮出血时间定义为伤口的诱发与视觉观察出血中止之间的时间。每 15 秒钟以滤纸小心地轻擦血液,而勿碰触伤口。当表皮出血时间超过 900 秒(例如 15 分钟)时停止测量,并将出血时间视为 900 秒。

[0458] 在第二方法中,通过重组 annexin V 而以免颈动脉创伤模型来估算切口的失血量(见例如 P. Thiagarajan 等, (1997) *Circulation* 96(7):2339-47)。在腹股沟上切出 2cm×0.8cm 切口,并埋入预先称重的纱布消毒棉块,在每三十分钟剂量注入周期结束或其充满血液时更换纱布消毒棉块;在研究结束时将所有纱布称重,以得到失血量。以盐水对照状态纱布的比例来表示每一剂量的数值。在整个研究期间,以 10 分钟为间隔连续地监测心跳速率及血压。

[0459] 在每一剂量周期结束时,抽取 1ml 的 EDTA 血液及 10ml 的含柠檬酸血液,并判定 FBC 血小板数量、凝血酶原 (prothrombin) 时间、部分促凝血酶原时间 (activated partial thromboplastin time)、因子 VIII 及 vWF。若有必要,于 -80℃ 下冷冻两管 300 μl 的小剂量,以递送至研究者处供额外体外实验室研究用。同理,在流量研究结束后 0.5, 1, 2, 8, 24 及 48 小时进行抽血,而在最终剂量结束时,以测试及对照样本施行血小板凝集测试。

[0460] 在累积剂量(例如当观察到 CFR 的完全抑制时)之后,以 2.2 μg/kg/min 的剂量注入肾上腺素 (Intramed) 持续 20 分钟并再度测量 CFR。仅有肾上腺素不会在狒狒中引发血小板凝集,但可通过强化其它血小板凝集因子而恢复已遭破坏的循环流量变化(见例如 G. Anfossi 等, (1996) *Eur J Clin Invest.* 26:353-370)。

[0461] GBR 600 的效力及安全性研究:进行下述的研究 1 至 4 以判定 GBR 600 的效力及安全性。

[0462] 研究 1:以 n = 1 动物进行先导研究,建立含量递增的 GBR 600 的剂量应答 (dose response) 曲线,并识别出观察到最大 CFR 抑制时的有效剂量。针对所有的测试剂量判定模板出血及切口出血;在高达 48 小时内取出血液样本,以建立最高剂量下的抗体药物动力学。

[0463] 间隔 30 分钟注射下列递增剂量的 GBR 600,并在研究的持续时间内记录流量:剂量 1, 0.03mg/kg; 剂量 2, 0.1mg/kg; 剂量 3, 0.3mg/kg; 剂量 4, 1mg/kg; 及剂量 5, 0.03mg/kg。接着在每一剂量的注射之后 10 分钟时施行出血测试。

[0464] 图 5 及表 21 说明递增剂量的 GBR 600 对 CFR 的效应。若 CFR 并未稳定,在接近三十分钟基线阶段结束时再度损伤动脉。相较于盐水阶段的 8/30 分钟, 0.03mg/kg 的 GBR 600 将 CFR 的数目降低至 5/30 分钟;注入额外的 0.1mg/kg 可完全地抑制 CFR,此现象是由动脉再度受损伤并未使得 CFR 回复的事实加以确认。就下列递增剂量而言,有观察到抑制现象。在注入最高剂量的 GBR 600 (10mg/kg) 后,在 2.2 μg/kg/min 的速率下注入肾上腺素,以建立究竟达到血小板沉积的强力或微弱抑制。由于肾上腺素在血压上的效应,注入肾上腺素导致血液流量的短暂增加,但并未逆转 CFR 的抑制。

[0465] 表 21 递增剂量的 GBR 600 在 CFR 中的效应 (0.03-10mg/kg)

[0466]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	CFR 的数目
基线	0	8
盐水	0	8
0.03	0.03	5
0.1	0.13	0
0.3	0.43	0
1	1.43	0
10	11.43	0

[0467]

[0468] 研究 2: 研究 2 用类似于研究 1 的方式进行, 除了开始逐步升高剂量时 (0.03mg/kg 剂量之前) 使用 0.01mg/kg 的剂量以外, 因为在研究 1 中已观察到在剂量 0.03mg/kg 下存在 CFR 的部分抑制。

[0469] 在研究 2 中 (见例如图 6 及表 22), 观察到 0.01mg/kg 的 GBR 600 在 CFR 中的效应 (7CFR/30 分钟, 相较于盐水的 9CFR/30 分钟); 然而, 注入额外的 0.03mg/kg (累积剂量 = 0.04mg/kg) 造成 CFR 的完全抑制, GBR 600 的 ED<sub>100</sub> 因此为 0.04mg/kg。动脉的再度损伤并未逆转 CFR 的抑制, 表示此为真实抑制。抑制效应维持于较高剂量下, 上至最大剂量 10mg/kg。由于肾上腺素在血压上的效应, 注入肾上腺素导致血液流量的短暂增加, 但并未逆转 CFR 的抑制。

[0470] 表 22 递增剂量的 GBR 600 在 CFR 中的效应 (0.01-10mg/kg)

[0471]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	CFR 的数目
基线	0	9
盐水	0	9
0.01	0.01	7
0.03	0.04	0
0.1	0.14	0
0.3	0.44	0
1	1.44	0

10	11.44	0
----	-------	---

[0472] 研究 3:研究 3 用类似于研究 1 的方式进行,除了施用 0.005mg/kg 的起始剂量、接着施用另一次 0.005mg/kg 剂量(累积剂量 = 0.01mg/kg)、且接着以增量 0.01mg/kg 的方式增加 6 次以外。

[0473] 在研究 3 中(见例如图 7),观察到注入 0.005mg/kg 的 GBR 600 在 CFR 中的效应(8CFR/30 分钟降至 7CFR/30 分钟)。CFR 随着 GBR 600 的剂量增加而呈线性方式减少,每剂量周期的 CFR 数目显示于表 23 与图 8 中;图 8 说明与递增剂量的 GBR 600 相关联的 CFR 数目的线性减少。CFR 数目与 GBR 600 剂量之间的关系是由下列方程式表示的,数据拟合此方程式时的  $R^2 = 0.9901$ 。

[0474]  $CFR \text{ 的数目} / \text{剂量周期} = -109 \times \text{GBR 600 的剂量} + 7.4517$

[0475] 相较于研究 2 中因累积剂量 .04mg/kg 所引起的完全抑制,研究 3 中的  $ED_{100}$  为 0.07mg/kg。在研究 3 中,递增剂量之间的时间为 30 分钟,而所观察到的此  $ED_{100}$  上的差异可能由血液中因药物的起始清除结果导致的 GBR 600 浓度下降所引发。注入肾上腺素逆转了 CFR 的抑制,此可能与在 0.07mg/kg 累积剂量时的 CFR 曲线的形状有关。在 0.07mg/kg 累积剂量下,抑制情形被缓慢地逆转,其显示血栓正在发展中。在这些特殊条件下,肾上腺素似乎能够逆转 CFR。

[0476] 表 23 累积剂量的 GBR 600 在 CFR 中的效应 (0.005-0.07mg/kg)

[0477]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	CFR 的数目
基线	0	8
盐水	0	8
0.005	0.005	7
0.005	0.01	6
0.01	0.02	5
0.01	0.03	4
0.01	0.04	3
0.01	0.05	2
0.01	0.06	1
0.01	0.07	0

[0478] 研究 4:研究 4 用类似于研究 1 的方式进行,除了在三只狒狒中以氯吡格雷 (clopidogrel) 作为阳性 (positive) 对照外,目的是为比较 GBR600 在 1,1.5,2.5,5 及

10mg/kg 剂量下对抗氯吡格雷的效力及出血倾向。

[0479] 在研究 4 中, 氯吡格雷于狒狒 1 中在 10mg/kg 累积剂量下、于狒狒 2&3 中在 5mg/kg 累积剂量下完全地抑制了 CFR, 如表 24 及图 9 (显示表 24 中的狒狒 3 的结果) 所示。注入肾上腺素逆转了 CFR 的抑制。

[0480] 表 24 氯吡格雷在狒狒中的递增剂量 (1-10mg/kg) 的效应

[0481]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	CFR 的数目 狒狒 1	CFR 的数目 狒狒 2	CFR 的数目 狒狒 3
基线	0	13	8	6
盐水	0	13	7	8
1	1	8	8	7
1.5	2.5	5	2	2
2.5	5	2	0	0
5	10	0	0	0
10	20	0	0	0

[0482] 模板出血时间: 在研究 1 及 2 中, 所有高于 0.04mg/kg 剂量下的模板出血时间皆长于 15 分钟; 在包含氯吡格雷 (Bristol-Myers Squibb/SanofiPharmaceuticals) 的阳性 (positive) 对照研究中, 模板出血时间延长至与大于 2.5mg/kg 累积剂量时相同的程度; 在研究 3 中, 模板出血时间从未延长至超过 15 分钟。由于模板出血时间呈现高基线变化性 (见例如氯吡格雷中狒狒 1, 2, 3 的基线值), 故其并非极精准的出血倾向量度, 模板出血时间本身不被视为可极准确地预测临床上相关出血, 例如在手术前调整中 (见例如 Lind 等, Platelets, 第二版, p485-493, Michelson AD 编, Academic Press)。切口出血测试显示较少变化性, 因其是定量经由切口的实际失血量且具有较大动态范围。因此, 除了模板出血测试以外尚执行切口出血测试。这些数据整理于表 25 及 26 中。

[0483] 表 25GBR 600 的模板失血时间 [分钟]

[0484]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	研究 1	研究 2	研究 3
基线	0	5.5	6.25	2
盐水	0	2.5	7	4.45
0.005	0.005	n. a.	n. a.	5.25
0.005	0.01	n. a.	n. a.	5.25

0.01	0.02	n. a.	n. a.	6
0.01	0.03	n. a.	n. a.	7.45
0.01	0.04	n. a.	n. a.	2.5
0.01	0.05	n. a.	n. a.	3.5
0.01	0.06	n. a.	n. a.	7.45
0.01	0.07	n. a.	n. a.	5.45
0.01	0.01	n. a.	2.45	n. a.
0.03	0.03/0.04	5.25	> 15	n. a.
0.1	0.13/0.14	> 15	> 15	n. a.
0.3	0.43/0.44	> 15	> 15	n. a.
1	0.143/1.44	> 15	> 15	n. a.
10	11.43/11.44	> 15	> 15	n. a.

[0485]

[0486] 表 26 氯吡格雷的模板失血时间 [ 分钟 ]

[0487]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	狒狒 1	狒狒 2	狒狒 3
基线	0	> 15	5.5	13
盐水	0	n. d.	n. d.	n. d.
1	1	3.5	n. d.	7
1.5	2.5	> 15	> 15	> 15
2.5	5	> 15	> 15	> 15
5	10	> 15	> 15	> 15



10	20	> 15	> 15	> 15
----	----	------	------	------

[0488] 表 27 及 28 显示以氯吡格雷及 GBR 600 的切口出血测试所获得的结果。由纱布所吸收的血液量起初随剂量增加,而在高剂量时呈现自限性。在所有研究中,所观察到的最高失血量为在第四剂量时,其后由纱布所吸收的血液量便减少,且似乎发生伤口的愈合;在研究 1 及 2 中,最大出血量类似于氯吡格雷者,尽管氯吡格雷用 2-4 倍的 ED<sub>100</sub>、而 GBR 600 用高达 250 的倍数加以测试;在研究 3 中,观察到全部的注射剂量下的出血情况微不足道。

[0489] 表 27 GBR 600 的切口失血测试 [ 盐水值的倍数单位 ]

[0490]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	研究 1	研究 2	研究 3
基线	0	n. a.	n. a.	n. a.
盐水	0	1	1	1
0.005	0.005	n. a.	n. a.	0.13
0.005	0.01	n. a.	n. a.	0.08
0.01	0.02	n. a.	n. a.	0.05
0.01	0.03	n. a.	n. a.	0.05
0.01	0.04	n. a.	n. a.	0.02
0.01	0.05	n. a.	n. a.	0.03
0.01	0.06	n. a.	n. a.	n. d.
0.01	0.07	n. a.	n. a.	n. d.
0.01	0.01	n. a.	2.5	n. a.
0.03	0.03/0.04	0.125	0.5	n. a.
0.1	0.13/0.14	0.625	4.75	n. a.
0.3	0.43/0.44	3.125	7.75	n. a.
1	0.143/1.44	7.625	5.75	n. a.

10	11.43/11.44	4	1.75	n. a.
----	-------------	---	------	-------

[0491] 表 28 氯吡格雷的切口失血测试 [ 盐水值的倍数单位 ]

[0492]

剂量 (mg/kg)	累积剂量 (mg/kg)	狒狒 1	狒狒 2	狒狒 3
基线	0	n. a	n. a.	n. a
盐水	0	1	1	1
1	1	1.59	1.21	1.28
1.5	2.5	1.06	1	1.1
2.5	5	1.41	6.64	3.32
5	10	5.82	13.64	0.95
10	20	9.12	2.64	0.92

[0493]

[0494] GBR 600 的治疗窗口 (therapeutic window) 及出血得分 (bleedscore) :在图 10 中,将来自研究 1 及 2 及三项氯吡格雷研究的切口测试结果对 GBR600 及氯吡格雷的剂量作图 (将剂量表示成其 ED<sub>100</sub> 的倍数并在对数标度上作图)。

[0495] 即使在大于其 ED<sub>100</sub> 的 100 倍的剂量下,GBR 600 仍导致氯吡格雷中在仅高至其 ED<sub>100</sub> 的 4 倍下可见的出血程度。令人意外地,GBR 600 关于出血风险是具有前所未见的安全性的治疗窗口。

[0496] 此项研究中所观察到出血的唯一临床上相关的增加为来自表皮伤口的自限性出血的增加,如同由模板出血及切口出血法所判定。在外科手术后密切地观察动物达 48 小时,并未检测到额外的表皮出血信号,例如容易瘀血、出血点、瘀斑等;更重要的是,未检测到内部出血的信号,例如血肿 (hematoma)、流鼻血 (epistaxis)、来自口腔或阴道的失血、黑粪症 (melena)、眼睛出血、血尿症 (hematuria)、或吐血 (hematemesis) 等,这些手术伤口不会出血且可正常地愈合。

[0497] 如表 29 所示,氯吡格雷及 GBR 600 两者在 BleedScore 计分方案中的得分皆为 1。除了表皮伤口上的出血增加外,在实验期间或得出研究的结论后 48 小时的观察期期间,并未在动物上检测到其它症状。

[0498] 表 29 氯吡格雷及 GBR 600 的 BleedScore 判定

[0499]

BleedScore 判定				
出血严重性	症状	得分	氯吡格雷	GBR 600
表皮出血	容易瘀血	1	0	0
	由小伤口出血	1	1	1
	出血点	1	0	0

[0500]

	瘀斑	1	0	0
内部出血	血肿	3	0	0
	流鼻血	3	0	0
	来自口腔或阴道的失血	3	0	0
	黑粪症	3	0	0
	眼睛出血	3	0	0
	血尿症	3	0	0
	吐血	3	0	0
警示性出血	需要输血	6	0	0
	颅内出血	6	0	0
	生命危险	6	0	0
BleedScore			1	1

[0501] 效力及安全性研究的发现：表 30-32 显示在研究 1-3 中的 GBR 600 在下列方面的效应：vWF 水平、因子 VIII 水平、白血细胞数量、血红蛋白浓度 (Hb)、血小板数量 (Plt)、凝血酶原时间 (PT)、激活部分促凝血酶原激酶时间 (aPTT)。

[0502] 关于在研究 1-3 中所获得的冯维勒布兰德氏水平，于研究 1 中并未观察到任何模式；但于研究 2&3 中清楚地观察到冯维勒布兰德氏水平降低。在使用更高剂量的研究 2 中，效应比使用相对低剂量的研究 3 更加显著；在使用未与 vWF 结合的对照人源化单克隆 IgG4 抗体的研究中，未观察到对于冯维勒布兰德氏水平的效应，在未来研究中应仔细监测其此类效应及涵义。在所有研究中，GBR 600 对于因子 VIII 水平均无显著效应。

[0503] 虽然观察到 WBC 增加，但此为侵入性程序的已知效应，且至目前为止，此结果与针对未结合 vWF 的对照人源化单克隆 IgG4 抗体、及在此模型中所测试的一切其它药物所观察到的结果具有良好关联性；未能观察到因注入 GBR 600 所引发的对于血红蛋白浓度的显著效应；注入 GBR 600 对于血小板数量有一效应，由于血小板沉积为 CFR 期间动脉阻塞的原因，故血小板在这些程序期间被消耗掉，因此，CFR 的有效抑制将减少血小板的消耗量。此解释了在未结合 vWF 的对照人源化单克隆 IgG4 抗体中所观察到的较大血小板消耗量，其中

并未观察到 CFR 的抑制。

[0504] GBR 600 对于指示凝血蛋白的完整性的 PT 及 aPTT 似乎无显著效应,在未结合 vWF 的对照人源化单克隆 I gG4 抗体中还观察到类似结果。

[0505] 表 30. 研究 1

[0506]

	基线	盐水	0.03mg/kg	0.1mg/kg	0.3mg/kg	1.0mg/kg	10mg/kg
WBC x 109/l	7,48	6,92	7,89	9,32	11,57	12,29	11,52
RBC x 1012/l	5,7	5,88	5,75	5,86	5,83	5,79	5,8
血红蛋白 g/dl	13,4	14,3	14,1	14,1	14,4	14	14
血细胞比容 l/l	40,5	43,5	42,5	43,5	43,4	0,4	41,4
MCV fl	71,1	74,0	73,9	74,2	74,4	74,6	71,4
MCH pg	23,5	24,3	24,5	24,1	24,7	24,2	24,1
MCMC g/dl	33,1	32,9	33,2	32,4	33,2	32,4	33,8
plt x 109/l	306	249	234	236	245	257	262
neut x 109/l	3,46	3,32	4,35	5,92	8,16	8,89	8,44
lymph x 109/l	3,62	3,21	3,04	2,80	2,75	2,88	2,32
单核细胞 x 109/l	0,36	0,36	0,46	0,58	0,61	0,50	0,73
嗜酸性粒细胞 x109/l	0,03	0,02	0,04	0,03	0,03	0,01	0,02
嗜碱性粒细胞 x109/l	0,01	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01
PT	9	10	10	10,00	10	10	10
aPTT	42	42	44	43	42	42	45
F VIII	107	89	83	88	80	78	78
vWF 浓度	25	46	39	15	26	48	17
% 聚集	no	no	no	no	no	no	no

[0507] 表 31. 研究 2

[0508]

	基线	盐水	0.01mg/kg	0.03mg/kg	0.1mg/kg	0.3mg/kg	1.0mg/kg	10mg/kg
WBC x 109/l	11,98	12,42	12,49	11,89	11,14	10,91	11,01	13,92
RBC x 1012/l	5,24	5,36	5,34	5,34	5,42	5,57	5,57	5,54
血红蛋白 g/dl	12,2	12,7	12,8	12,8	12,9	13,2	13,4	13,2
血细胞比容 l/l	34,1	34,9	34,8	34,7	35,1	36,1	36,1	36,1
MCV fl	65,1	65,1	65,2	65,0	64,8	64,8	64,8	65,2
MCH pg	23,3	23,7	24,0	24,0	23,8	23,7	24,1	23,8
MCMC g/dl	35,8	36,4	36,8	36,9	36,8	36,6	37,1	36,6
plt x 109/l	313	281	276	281	287	283	283	268
neut x 109/l	9,37	9,44	9,12	8,60	8,03	7,98	8,15	11,33
lymph x 109/l	2,20	2,55	2,84	2,82	2,68	2,51	2,46	2,10
单核细胞 x 109/l	0,38	0,40	0,47	0,42	0,37	0,36	0,32	0,38
嗜酸性粒细胞 x109/l	0,01	0,02	0,05	0,04	0,04	0,05	0,08	0,10
嗜碱性粒细胞 x109/l	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,01	0,01
PT	9	9	9	9	9	9	9	9
aPTT	55	?>120	53	60	61	55	55	58
F VIII	49	56	48	54	54	56	58	68
vWF 浓度	34	31	28	21	16	14	14	10
% 聚集	no	no	no	no	no	no	no	no

[0509] 表 32. 研究 3

[0510]

	基线	盐水	0.005mg/kg	0.01mg/kg	0.02mg/kg	0.03mg/kg	0.04mg/kg	0.05mg/kg	0.06mg/kg	0.07mg/kg
WBC x 109/l	4,97	5,63	5,10	6,36	7,22	8,8	11,56	13,5	14,06	14,38
RBC x 1012/l	8,13	6,25	6,2	6,1	6,22	6,19	6,27	6,17	6,16	5,65
血红蛋白 g/dl	14,0	14,6	14,8	14,7	14,5	14,4	14,7	14,7	14,8	13,5
血细胞比容 l/l	44,1	45,2	46,4	46,8	45,1	44,7	45,2	46,6	46,5	42,7
MCV fl	71,9	72,3	74,8	75,1	72,5	72,2	72,1	75,5	75,5	75,6
MCH pg	22,8	23,4	23,9	24,1	23,3	23,3	23,4	23,8	24,0	23,9
MCMC g/dl	31,7	32,3	31,9	32,1	32,2	32,2	32,5	31,5	31,8	31,6
plt x 109/l	373	331	327	342	342	334	360	321	318	286
neut x 109/l	3,21	3,83	3,11	4,13	5,26	6,85	9,73	11,80	12,36	12,80
lymph x 109/l	1,59	1,54	1,73	1,97	1,60	1,56	1,45	1,38	1,34	1,14
单核细胞 x 109/l	0,15	0,23	0,20	0,25	0,34	0,36	0,36	0,31	0,37	0,42
嗜酸性粒细胞 x109/l	0,01	0,01	0,05	0,00	0,01	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01
嗜碱性粒细胞 x109/l	0,01	0,01	0,00	0,01	0,01	0,02	0,01	0,01	0,00	0,01
PT	9	9	8	8	9	9	9	9	9	10
aPTT	39	41	40	40	39	39	39	38	41	42
F VIII	84	79	80	88	80	85	82	80	85	81
vWF 浓度	53	50	48	51	46	44	42	35	36	35
% 聚集	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no

[0511] GBR 600 似乎为动脉血栓过程中的血小板沉积的强力抑制剂,肾上腺素无法逆转

此抑制反应,对氯吡格雷也是。使用 GBR 600 时未发现严重的有害出血,即使当药物以目前看来像是高达有效剂量的 250 倍的剂量被输注时也是。在这些剂量下,通过切口出血模型所测量的出血量,产生与以有效剂量 4-8 倍加以输注的氯吡格雷类似的结果。GBR 600 对于凝血蛋白不具影响力,此由 PT 及 aPTT 结果加以显示;然而,存在冯维勒布兰德氏因子水平降低的情形,但在因子 VIII 水平上却未观察到清楚的效应。由于杀鼠灵 (warfarin) 通过降低机能性维生素 K 依赖的凝血蛋白的循环水平来抑制凝血系统,故此方面并非问题。在此研究中,对于全血计量参数并未观察到意料之外的效应。

[0512] 实施例 11 :人源化 NMC-4 变体的热稳定性

[0513] 利用量热法比较鼠类 NMC-4 的 Fab 片段的人源化 NMC-4 变体及 NMC-4-IgG1 嵌合体的热稳定性。单克隆抗体的熔融谱为其同种型的特征 (Garber 和 Demarest (2007), BBRC 355 :751-7);然而,即使在全长 IgG 的情况中,仍可轻易地识别出 Fab 片段的中点熔融温度。利用此种 Fab 片段的中点熔融温度来监测人源化候选者的单克隆抗体稳定性。

[0514] 在 VP-DSC 示差高灵敏度扫描热量计 (differential scanning microcalorimeter, MicroCal, Northampton, UK) 上进行量热法。槽 (cell) 体积为 0.128ml;加热速率为 1°C/min;且将超压 (excess pressure) 维持于 64psi;所有蛋白质片段皆于 PBS (pH 7.4) 中 1-0.5mg/mL (74 μM) 浓度下使用。通过与含有相同缓冲液的一式两份样本 (蛋白质以从中去除) 相比较,估计每一蛋白质的摩尔热容量;利用标准程序分析部分摩尔热容量及熔融曲线。在进一步于软件 Origin v7.0 中利用非两状态模型 (Non-Two State model) 分析温度记录图之前,以基线校正的并将浓度归一化。针对如实施例 3 中提及的 H14L10-IgG4 所获得的数据的例子显示于图 11。鼠类 NMC-4 的 Fab 片段在 74.7°C 时显现单一转化,而 H14L10-IgG4 的 Fab 片段转化则在 81.1°C 时显现,其对应于稳定性上的明显差异 (6.4°C)。为了探知人类 Fab 稳定结构域的影响,制备由经移植至人类 IgG1 (最稳定的人类同种型;Garber 和 Demarest (2007), BBRC 355 :751-7) 上的鼠类 NMC-4 可变结构域所组成的嵌合体。就 H14-L10Fab 而言,H14L10-IgG4 及 NMC-4-IgG1 嵌合体的表现 (apparent) Fab T<sub>m</sub> 值仍显示出稳定性上的明显增加 (ΔT<sub>m</sub> > 1°C)

[0515] 实施例 12 :编码 GBR 600 重链 (VH9) 及轻链 (VL9) 的基因的克隆

[0516] 用于克隆编码 GBR 600 的基因的材料及方法列出如下:

[0517] PfuUltra (Stratagene, Cat. -No. :600380)

[0518] SpeI (NEB, Cat. -No. :R0133)

[0519] HindIII (NEB, Cat. -No. :R0104)

[0520] CIP (NEB, Cat. -No. :M0290)

[0521] pCR-钝端 (Invitrogen, Cat. -No. :44-0302)

[0522] 引物 :Operon, Cologne, Germany

[0523] GLNPR107 :TAACTAGTCGTGAGGCTCCGGTGCCCGTC

[0524] GLNPR108 :AAGCTTACGGCTAGCTCAGCACCTGAAATGGAAG

[0525] GLNPR139 :CCTCAGACAGTGGTTCAAAG

[0526] GLNPR176 :GCTAGCGCCACCATGGAGACAGACACAC

[0527] GLNPR177 :TAAGCTTCTATCATTTACCCAGAGACAGGG

[0528] GLNPR178 :TAAGCTTCTATCAACACTCTCCCCTGTTG

- [0529] BGHREV ;由 Fasteris 所提供
- [0530] TMC 载体 pCI-NMC4-VL9 (p156) 及 pCI-NMC4-VH9 (p158) ( 由 Chromos 所提供 )
- [0531] Qiaquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Cat. -No. :28706)
- [0532] 1kb+ladder (Fermentas, Cat. -No. :R0491)
- [0533] pcDNA3. 1(-) (Invitrogen, Cat. -No. :V795-20)
- [0534] pEF-Dest51 [CD1 (RZPD, Cat. -No. :RZPDo839G0167-pEF-DEST51)
- [0535] 测序 ;Fasteris SA (Geneva, Switzerland)
- [0536] Gigaprep 试剂盒 (Macherey-Nagel, Cat. -No. :Nucleobond PC10000)
- [0537] 表达载体 pEFcDNA3. 1 的克隆
- [0538] 表达载体 pEFcDNA 通过以来自 pEF-DEST51 的 EF1- $\alpha$  启动子取代来自 pcDNA3. 1(-) (Invitrogen) 的 CMV 启动子而加以构建。为此目的,故利用引物 GLNPR107, 108 及 PfuUltra (Stratagene, 退火温度 55 $^{\circ}$ C, 30 个循环) 来扩增 EF1- $\alpha$  启动子 ;引物扩增全部的 EF1- $\alpha$  启动子,并在所扩增片段的 5' 端贴附 SpeI 侧而在 3' 端贴附 HindIII 侧。将 PCR 扩增子 (amplicon) 克隆入 pCR- 钝端 (Invitrogen), 并通过 SpeI/HindIII 消化来分析克隆。切下来自克隆 #4 的 SpeI/HindIII 片段,并将其克隆入利用相同酶组合及 CIPed 加以消化的 pcDNA3. 1(-) 骨架中。利用 SpeI 及 HindIII 分析克隆,克隆 #2 似乎呈阳性 ;以骨架及插入物进行第二次消化更证实了启动子片段的正确大小。
- [0539] 将 GBR 600 克隆至 pEFcDNA
- [0540] 利用 PfuUltra ( 标准条件,退火温度 55 $^{\circ}$ C, 30 个循环) 及引物 GLNPR176 及 177 来扩增 GBR 600VH9, 模板为 TMC 载体 p156 ;以如同对于重链所述,利用引物 GLNPR176 及 178 来扩增 GBR 600VL9,所使用的模板为 TMC 载体 p158。引物将 NheI 限制位点 5' 及 HindIII 限制位点 3' 附加至各自扩增子,将所获得的 PCR 片段克隆入 pCR- 钝端,并利用 NheI 及 HindIII 通过限制消化加以分析。切下轻链的克隆 #1 及重链的克隆 #3,并将其克隆入利用酶 NheI 及 HindIII 及 CIPed 打开的 pEFcDNA 中。该限制消化显示 :轻链的克隆 #6 及重链的克隆 #1 含有正确大小的片段,将此两克隆送至用作测序对照的 Fasteris,以作为样本 GS256 及 GS257。测序结果比对参考序列。由于少量制备 (miniprep)DNA 的质量不佳,故重链序列 GS257 无法确认至 100% 程度。利用编码 GBR 600 重链 VH9 (GS257) 及 GBR 600 轻链 VL9 (GS256) 以制备多量制备 (Gigapreps)。将质粒制备再度送至 Fasteris 以进行序列确认,此次的样本名为 GS265 (GBR 600 重链 VH9) 及 GS264 (GBR 600 重链 VL9)。由于其 DNA 质量较好,故可确认重链及轻链对于参考序列的序列同一性。
- [0541] 虽然本发明于此已通过参照各种特定材料、程序、及实施例加以说明,但应了解技术人员在阅读以上说明书及研究图式时将可实现各种的修改、增加、变更及其均等物。因此,本发明实施例应被视为例示性而非限制性,其真实范围及精神是由下列权利要求书所表示。本案中所参照的有参考数据、专利、专利申请通过参考文献方式将其整体并入于此。

[0001]

## 序列表

<110> 格兰马克药品股份有限公司  
 <120> 对冯维勒布兰德氏因子特异的人源化抗体  
 <130> 16708/PCT  
 <160> 238  
 <170> PatentIn version 3.2  
 <210> 1  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> NMC-4 (鼠 mAb 的重链)  
 <400> 1  
 Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Lcu Val Ala Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
 35 40 45  
 Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60  
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65 70 75 80  
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Arg Tyr Tyr Cys Val  
 85 90 95  
 Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro

[0002]

115	120	125
Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met		
130	135	140
Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr		
145	150	155
Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro		
	165	170
		175
Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val		
	180	185
		190
Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His		
195	200	205
Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys		
210	215	
<210> 2		
<211> 208		
<212> PRT		
<213> 人 I.		
<220>		
<223> NMC-4 (鼠 mAb 的轻链)		
<400> 2		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
		15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr		
	20	25
		30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile		
35	40	45
Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro		

[0003]



65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Val Lys Arg Ala Asp Ala Ala			
	100	105	110
Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Scr Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly			
	115	120	125
Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile			
	130	135	140
Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu			
	145	150	155
Asn Scr Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser			
	165	170	175
Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr			
	180	185	190
Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser			
	195	200	205
<210> 3			
<211> 65			
<212> PRT			
<213> 人 I.			
<220>			
<223> 人种系 VH, 4-59			
<400> 3			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr			
	20	25	30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			

[0004]

	35		40		45														
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys																			
	50		55		60														
Ser																			
65																			
<210>	4																		
<211>	122																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	人抗体 AAC18165.1																		
<400>	4																		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu																			
1		5			10				15										
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr																			
	20				25				30										
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile																			
	35				40				45										
Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys																			
	50				55				60										
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu																			
65					70				75										80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala																			
					85				90										95
Arg Gly Tyr Arg Pro Gly Val Ala Ala His Ser Pro Phe Asp Tyr Trp																			
					100				105										110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser																			
					115				120										

[0005]

<210> 5  
 <211> 88  
 <212> PRT  
 <213> 人 I.  
  
 <220>  
 <223> 人种系 VL, 018  
  
 <400> 5  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                    25                    30  
  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
  
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65                    70                    75                    80  
  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   85

<210> 6  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人 I.  
  
 <220>  
 <223> 人抗体 AAK94808  
  
 <400> 6  
  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15  
  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                    25                    30

[0006]

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Leu Pro Leu  
 85 90 95

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

<210> 7

<211> 10

<212> PRT

<213> 人 H.

<220>

<223> HDCDR1

<400> 7

Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr Gly Val Asp  
 1 5 10

<210> 8

<211> 16

<212> PRT

<213> 人 H.

<220>

<223> HCDR2

<400> 8

Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

[0007]

<210> 9  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> HCDR3

<400> 9

Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr  
1                    5                    10

<210> 10  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> LCDR1

<400> 10

Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Leu Asn  
1                    5                    10

<210> 11  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> LCDR2

<400> 11

Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser  
1                    5

<210> 12

[0008]

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LCDR3

<400> 12

Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 13

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> H2

<400> 13

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr

20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp

100 105 110

[0009]

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

<210> 14  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> H4

<400> 14

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

<210> 15  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工

[0010]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; H5

&lt;400&gt; 15

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
20 25 30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

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

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 122

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人.1.

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; H6

&lt;400&gt; 16

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr

[0011]



20	25	30
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35	40	45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys 50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Val Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu 65	70	75 80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val 85	90	95
Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp 100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser 115	120	
<210> 17		
<211> 122		
<212> PRT		
<213> 人.1.		
<220>		
<223> H7		
<400> 17		
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu 1	5	10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr 20	25	30
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile 35	40	45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys 50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu		

[0012]

65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val			
	85	90	95
Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser			
	115	120	
<210> 18			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> 人.H			
<220>			
<223> H8			
<400> 18			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu			
1	5	10	15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys			
	50	55	60
Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu			
65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val			
	85	90	95
Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp			
	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Ser Leu Thr Val Ser Ser			

[0013]

115

120

<210> 19  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> H9

<400> 19

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                    40                    45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
                   50                    55                    60

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

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

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
                   100                    105                    110

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

<210> 20  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>

[0014]

<223> H12

<400> 20

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

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

Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile  
                  35                   40                   45

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
                  50                   55                   60

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

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

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
                  100                   105                   110

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

<210> 21

<211> 122

<212> PRT

<213> 人.1.

<220>

<223> H13

<400> 21

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

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

[0015]

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
 50 55 60

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

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

Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110

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

<210> 22

<211> 122

<212> PRT

<213> 人

<220>

<221> H14

<222> (1).. (122)

<400> 22

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

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

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

Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys  
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

[0016]

65	70	75	80
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	85	90	95
Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp	100	105	110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	115	120	
<210> 23			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人工			
<220>			
<223> L5			
<400> 23			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr	20	25	30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Val Lys Leu Leu Ile	35	40	45
Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp	85	90	95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	

[0017]

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> 人 I.

<220>

<223> L4

<400> 24

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

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Lys	Tyr
			20					25						30	

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

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

Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65					70					75				80	

Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Glu	Lys	Leu	Pro	Trp
				85					90					95	

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

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人 I.

<220>

<223> L6

<400> 25

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

[0018]

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 26  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> L7

<400> 26

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30

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

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

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

[0019]



Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 27  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人.1.

<220>  
 <223> L8

<400> 27

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 28  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人.1.

[0020]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L9

&lt;400&gt; 28

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
                   20                    25                    30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
                   85                    90                    95

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

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; L10

&lt;400&gt; 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
                   20                    25                    30

[0021]

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

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

<210> 30  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> L11

<400> 30

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Phe Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
 85 90 95

[0022]

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

<210> 31  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 转录元件

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2)..(2)  
 <223> n 为 a, c, g 或 t

<400> 31  
 cncaat 6

<210> 32  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 转录元件 1

<400> 32  
 aataaa 6

<210> 33  
 <211> 1602  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> IMAGE 克隆#4764579

<400> 33  
 ggcaccgagg gtttctgtcc tccaccatca tggggtaac cgccatcctc gccctcctcc 60

[0023]

tggctgttct ccaaggagtc tgtgccgagg tgcgcctgga gcagtctggg acagaggtga	120
aaaagccggg ggagtctctg aaaatctcct gtcaggcttc tggattcacc ttaccgact	180
actggatcgg ctgggtgctc cagctgcccg ggcaaggcct ggagtggatg ggcttcatcg	240
atcgtcttga ctctaaaata agatataacc cgtccttcca aggccaagtc accatgtcag	300
ccgacacgtc gataaccgcc gtctacctgc agtggagccg cctgaaggcc tcggacaccg	360
gcatttatta ttgtgctgacc tcggatacac ctctggactc ttactccttt gaattttggg	420
gccaggaag cctcgtcctc gtctcctcag cctccacca gggcccatcg gtcttcccc	480
tggcacctc ctccaagagc acctctgggg gcacagcggc cctgggctgc ctggtcaagg	540
actacttccc cgaaccgggt acgggtgcat ggaactcagg cgcctgacc agcggcgtgc	600
acaccttccc ggctgtccta cagtcctcag gactctactc cctcagcagc gtggtgaccg	660
tgccctccag cagcttgggc acccagacct acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagea	720
acaccaaggt ggacaagaaa gttgagccca aatcttgtga caaaactcac acatgcccac	780
cgtgcccagc acctgaactc ctggggggac cgtcagctt cctcttcccc ccaaaccca	840
aggacacct catgatctcc cggaccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc	900
acgaagacc tgaggtaag ttcaactggt acgtggacgg cgtggagggtg cataatgcca	960
agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg	1020
tcttgacca ggactggctg aatggcaagg agtacaagt caaggtctcc acaaaagccc	1080
tcccagcccc catcgagaaa accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg	1140
tgtacacct gccccatcc cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc	1200
tggtaaaagg ctctatccc agcagatcg ccgtggagt ggagagcaat gggcagccgg	1260
agaacaacia caagaccag cctcccgtgc tggactccga cggctcctc ttctctaca	1320
gcaagctcac cgtggacaag agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga	1380

[0024]

tgcatgaggc tctgcacaac cactacacgc agaagagcct ctccctgtct ccgggtaa	1440
gagtgcgacg gccggcaagc ccccgcctccc cgggctctcg cggtcgcacg aggatgcttg	1500
gcacgtaccc cctgtacata cttcccgggc gccacagcatg gaaataaagc acccagcgct	1560
gccctgggcc cctgcgaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa	1602
<210> 34	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> NMC-VH-coRI-F	
<400> 34	
gacgcgaatt cgcaggtgca gctgaaggag agc	33
<210> 35	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> NMC-VH-gG41gG1-R	
<400> 35	
cggatgggcc cttgggtggaa gcgctgctca cggtcacgct ggt	43
<210> 36	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> hlgG-F	
<400> 36	
gctccacca agggcccatc cg	22

[0025]

- <210> 37  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> hIgG-R
- <400> 37  
cagagacagg gagaggctct tctg 24
- <210> 38  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> hIgG BamH1-R
- <400> 38  
attagatcc ttatcattta cccagagaca gggagaggct 40
- <210> 39  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> hFc-L235E-F
- <400> 39  
ctcgaggggg gaccgtcagt cttectctt 29
- <210> 40  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> IgG1-L235E-R

[0026]

<400> 40		
aagaggaaga ctgacggtcc cccctcgag		29
<210> 41		
<211> 30		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> CH2-C1q(-)-F		
<400> 41		
ggcgtacgcg tgcgcggtct ccaacaaagc		30
<210> 42		
<211> 31		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> CH2-C1q(-)-R		
<400> 42		
ccgcgcacgc gtacgccttg ccattcagcc a		31
<210> 43		
<211> 96		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> 4-59 前导-Hind111-NMC-4		
<400> 43		
attaagcttg ccgccacat gaaacatctg tggttcttcc ttctctggt ggcagctccc		60
agg1gggtcc tgtcccaggt gcagctgaag gagagc		96
<210> 44		

[0027]



<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	IgG1-BamH1-R	
<400>	44	
	taaggatcct tatcatttac ccggagacag ggagag	36
<210>	45	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	NMC-VL-EcoR1-F	
<400>	45	
	gagcgaatt cggacatcca gatgaccag agcc	34
<210>	46	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	NMC-VL- $\kappa$ -R	
<400>	46	
	gaagacagat ggtgcagcca cagttcgctt cacctccagc ttggtgcc	48
<210>	47	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	K-F	
<400>	47	

[0028]

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtctt	26
<210> 48	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> K-BamHI-R	
<400> 48	
aattcggatc ctactaaca ctctccctg ttgaagetct t	41
<210> 49	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> Hind III-Ko-AJW-F	
<400> 49	
gllaagcttg ccgccacat ggattttggg ctgatttttt ttattgtt	48
<210> 50	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HuFab-H-R	
<400> 50	
gaatggccc ttggtggaag cggaggaaac ggtcacgagg gta	43
<210> 51	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0029]

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Xho1-Ko-AJW-F

&lt;400&gt; 51

aatctcgagg cggccacat gagtgtgccc actcaggtcc tgg

43

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 56

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人.1.

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NMC-4 VL

&lt;400&gt; 52

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

1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Leu

20                    25                    30

Tyr Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Ala Val Lys Leu Leu Ile

35                    40                    45

Phe Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser

50                    55

&lt;210&gt; 53

&lt;211&gt; 65

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人.1.

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; NMC-4 VH

&lt;400&gt; 53

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln

1                    5                    10                    15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr

[0030]

	20		25		30	
Gly Val Asp Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu						
	35		40		45	
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys						
	50		55		60	

Ser  
65

<210> 54  
<211> 98  
<212> DNA  
<213> 人.1.

<220>  
<223> 4-59 huNMC-F

<400> 54  
gtaaagcttg cgcaccat gaaacatctg tggttcttcc ttctcttggt ggcagctccc 60  
  
aggtaggtcc tgcaccaggt gcagctgcag gaatccgg 98

<210> 55  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人.1.

<220>  
<223> Hu-VH-R

<400> 55  
ggatgggccc ttggtggaag cggaggaaac ggtagcagg gta 43

<210> 56  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人.1.

<220>

[0031]

<223> pcDNA6-F	
<400> 56	
cactgcttac tggcttatcg aaatta	26
<210> 57	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH-93A-For	
<400> 57	
gacaccgctg ttactactg cgctcgtgac ccggtgact	40
<210> 58	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VH-V93A-Rev	
<400> 58	
agtcagccgg gtcacgaccg cagtagtaaa cagcgggtgtc	40
<210> 59	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HC-L67V-F	
<400> 59	
cigaaatccc gtgttaccat ctccaaagac	30
<210> 60	
<211> 30	

[0032]

- <212> DNA  
 <213> 人.1.  
  
 <220>  
 <223> HC-L67V-R  
  
 <400> 60  
 gtcctttggag atggtaacac gggatttcag 30
- <210> 61  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人.1.  
  
 <220>  
 <223> HC-N73T-F  
  
 <400> 61  
 accatctcca aagacacctc caaaaac 27
- <210> 62  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> 人.1.  
  
 <220>  
 <223> HC-N73T-R  
  
 <220>  
 <221> HC-N73T-R  
 <222> (1)..(27)  
  
 <400> 62  
 gtttttggag gtgtctttgg agatggt 27
- <210> 63  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> 人.1.  
  
 <220>

[0033]

<223> HC-V78F-F	
<400> 63	
aactcaaaa accagttctc cctgaaac	28
<210> 64	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HC-V78F-R	
<400> 64	
gtttcagggga gaactggttt ttggagtt	28
<210> 65	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HC-K71V-F (H9)	
<400> 65	
cttaccatct ccgtagacaa ctccaaaaac	30
<210> 66	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> HC-K71V-R	
<400> 66	
gtttttggag ttgtctacgg agatggtaag	30
<210> 67	
<211> 30	

[0034]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> hu-VH-K71V-F(H9)	
<400> 67	
cgtgttacca tctccgtaga cacctcaaaa	30
<210> 68	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> hu-VH-K71V-R(H9)	
<400> 68	
tttggaggtg tctacggaga tggtaacacg	30
<210> 69	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> Fab-L-For	
<400> 69	
atacatatgg acatccagat gaccagagc	30
<210> 70	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> Fab-L-Rev	
<400> 70	
agactcgagt tatcaaacact ctcccctggt gaagct	36

[0035]



- <210> 71  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> NMC4-VL-EcoR1-F
- <400> 71  
gacgcgaatt cggacatcca gatgaccag agcc 34
- <210> 72  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 5'-IRES
- <400> 72  
agctggttta gtga 14
- <210> 73  
<211> 17  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> 3'-IRES
- <400> 73  
caagcggctt cggccag 17
- <210> 74  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>

[0036]

<223> LC-Y49F-F

<400> 74

ccaagctgct gatcttctac acca

24

<210> 75

<211> 24

<212> DNA

<213> 人 工

<220>

<223> LC-Y49F-R

<400> 75

tgggttagaa gatcagcagc ttgg

24

<210> 76

<211> 30

<212> DNA

<213> 人 工

<220>

<223> LC-F831-F

<400> 76

cagcccgagg acatcgccac ctactactgc

30

<210> 77

<211> 30

<212> DNA

<213> 人 工

<220>

<223> LC-F831-R

<400> 77

gcagtagtag gtggcgatgt cctcgggctg

30

<210> 78

<211> 30

[0037]

<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> LC-P44V-F	
<400> 78	
aagccccggca aggccgtcaa gctgctgatc	30
<210> 79	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> LC-P44V-R	
<400> 79	
gatcagcagc ttgacggcct tgccgggctt	30
<210> 80	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> LC-F49Y-F	
<400> 80	
gccgtcaagc tgctgatcta ctacaccag	29
<210> 81	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> LC-F49Y-R	
<400> 81	
ciggtgtagt agatcagcag cttgacggc	29

[0038]

- <210> 82  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> LC-Y71F-F  
  
 <400> 82  
 ggcagcggca ccgacttcac cctgaccatc 30  
  
 <210> 83  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> LC-Y71F-R  
  
 <400> 83  
 gatggtcagg gtgaagtcgg tgccgctgcc 30  
  
 <210> 84  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> HuLC-V44P, F49Y-F  
  
 <400> 84  
 ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accag 35  
  
 <210> 85  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>

[0039]

- <223> HuLC-V44P, F49Y-R
- <400> 85  
ctggtgtagt agatcagcag cttgggggcc ttgcc 35
- <210> 86  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huL10-F
- <400> 86  
accatcacct gccaaagccag ccaggacatc agcaactacc tgaactgg 48
- <210> 87  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huL10-R
- <400> 87  
ccagttcagg tagttgctga tgcctggct ggcttggcag gtgatggt 48
- <210> 88  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huL11-F
- <400> 88  
cccaagctgc tgatctacga cgccagcaac ctggaaaccg gcgtgccc 48
- <210> 89  
<211> 48

[0040]

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> huL11-R

<400> 89

gggcacgccg gtttccaggt tgctggcgtc gtagatcagc agcttggg

48

<210> 90

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> huH12-F

<400> 90

gtttccggig gctccatctc cgactacggt gttgactgga

40

<210> 91

<211> 40

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> huH12-R

<400> 91

tccagtcaac accgtagtcg gagatggagc caccggaac

40

<210> 92

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> huH13-F

<400> 92

gtttccggig gctccatctc cgatacgggt gggactggat ccgtcag

47

[0041]

<210> 93  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> huH13-R

<400> 93  
 ctgcaggatc cagtcccaac cgtagtcgga gatggagcca ccggaaac

48

<210> 94  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> huH14-F

<400> 94  
 gtccaccga ctacaacccc tctctgaaat cccgt

35

<210> 95  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> huH14-R

<400> 95  
 acgggatttc agagaggggt tgtagtcggt ggaac

35

<210> 96  
 <211> 48  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>

[0042]

- <223> huH15-F
- <400> 96  
gtttccggtg gctccatctc ctctactat tggctctgga tccgtcag 48
- <210> 97  
<211> 48  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huH15-R
- <400> 97  
ctgacggatc caggaccaat agtaggagga gatggagcca ccggaac 48
- <210> 98  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huH16-F
- <400> 98  
gaatggatcg gttatatcta ttattccggt tccaccaact acaaccctc t 51
- <210> 99  
<211> 51  
<212> DNA  
<213> 人工
- <220>  
<223> huH16-R
- <400> 99  
agaggggttg tagttggtgg aaccggaata atagatataa ccgatccatt c 51
- <210> 100  
<211> 42

[0043]



<212> DNA	
<213> 人.I.	
<220>	
<223> IgKLF	
<400> 100	
ccatctcga gaagcttcca ccatggagac agacacactc ct	42
<210> 101	
<211> 55	
<212> DNA	
<213> 人.I.	
<220>	
<223> IgKHmcR	
<400> 101	
accggaccg gattcctgca gctgcacctg tccagtggaa cctggaacc agagc	55
<210> 102	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人.I.	
<220>	
<223> 14VHF	
<400> 102	
caggtgcagc tgcaggaatc cggtcgg	27
<210> 103	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人.I.	
<220>	
<223> 14VHR	
<400> 103	
cetatgcggc cgcgggcct tgggtggaagc ggaggaaacg gt	42

[0044]

<210> 104  
<211> 55  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> IgKLMCR

<400> 104  
gctgctgggg ctctgggtca tctggatgic tccagtggaa cctggaaccc agagc 55

<210> 105  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> 10VLF

<400> 105  
gacatccaga tgaccagag cc 22

<210> 106  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> 人工

<220>  
<223> hKcR

<400> 106  
cctatgcggc cgcggatcct atcaacactc tcccctgttg aagctct 47

<210> 107  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>

[0045]

<223> Ig 前导序列

<400> 107

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1                    5                    10                    15

Gly Ser Thr Gly Asp  
                  20

<210> 108

<211> 973

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> I. M. A. G. E 克隆#4704496

<400> 108

gacaggact cctcagttca ccttctcaca atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg      60  
ctaagctctt gggteccagg atccagtggg gatggttga tgactcagtc tccactctcc      120  
ctgcccgtca cccttggaca gccggcctcc atctctgca ggtctactca aagcctcgta      180  
tacagtgatg gaaacaccta cttgaattgg ttccagcaga ggccaggcca atctccaagg      240  
cgcctaattt ataaggtttc taaccgggac tctggggctc cagacagatt cagcggcagt      300  
gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc accagggtgg aggctgagga tgttggggtt      360  
tatttctgca tgcagggtac aactggcgg tccacttttg gccaggggac caagctggag      420  
atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc ttcactctcc cgccatctga tgagcagttg      480  
aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa      540  
gtacagtgga aggtggataa gcacctcaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag      600  
caggacagca aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac      660  
tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa gtcaccatc agggcctgag ctgcccgtc      720

[0046]

acaaagagct tcaacagggg agagtgttag agggagaagt gccccacct gtcctcagt 780  
 tccagcctga cccctccca tcctttggcc tctgaccctt ttccacagg ggacctacc 840  
 ctattgCGGT cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt 900  
 atgctaattg tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttcaaaaaaa aaaaaaaaaa 960  
 aaaaaaaaaa aaa 973

<210> 109

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 来自人种系 4-59 VH 的前导序列

<400> 109

Met Lys His Leu Trp Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp  
 1                    5                    10                    15

Val Leu Ser

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> H15 CDRH1

<400> 110

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr Trp Ser  
 1                    5                    10

<210> 111

<211> 10

[0047]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> H14 CDRH1

<400> 111

Gly Gly Ser Ile Ser Asp Tyr Gly Trp Asp

1

5

10

<210> 112

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> vWf-A1-For

<400> 112

cccaggaatt cctcgaacc gcgttgcac

29

<210> 113

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> vWF-A1-Rev

<400> 113

ccgatgcggc cgctcacctc ttgggccccca g

31

<210> 114

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工

<220>

<223> 大鼠-VWF-A1-F

[0048]

<400> 114	
agcgaattcc cccgaacccc ccctgcacaa cttc	34
<210> 115	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 大鼠-VWPF-A1-R	
<400> 115	
agtgcggccg cttatcacct ttgggtcct ggtgatgaaa cc	42
<210> 116	
<211> 426	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 人抗体 AAC18165.1 (mRNA 登录号 AF062129.1)	
<400> 116	
atgaaacatc tgtggttctt cctctcctg gtggcagctc ccagatgggt cctgtcccag	60
gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg gtgaagcctt cggagaccct gtccctcacc	120
tgcactgtct ctggtggctc catcagtagt tactactgga gctggatccg gcagccccc	180
gggaagggac tggagtggat tgggtatata tattacagtg ggagcaccaa ctacaacccc	240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt ctccctgaag	300
ctgagctctg tgaccgtgc ggacacggcc gigtattact gtgcgagagg ctacagaccg	360
gggtagctg cccacagccc atttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc	420
tcaggg	426
<210> 117	
<211> 322	

[0049]

<212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> 人抗体 AAK94808 (mRNA)  
  
 <400> 117  
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc aggcgagtc ggacattagc aactatttaa attggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctacgat gcatccaatt tggaaacagg ggtcccatca 180  
 aggttcagtg gaagtggatc tgggacagat tttactttca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagatattg caacatatta ctgtcaacag tatgataatc tccctctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa ac 322

<210> 118  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> 人种系 018 CDR-L2

<400> 118

Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr  
 1                    5

<210> 119  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VH4-59 CDR H2

<400> 119

[0050]

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

<210> 120

<211> 321

<212> DNA

<213> 人 I.

<220>

<223> L5 DNA

<400> 120

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60

atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccg tcaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccccagc 180

cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccttgac cttcggccag 300

ggcaccaagg tggagatcaa g 321

<210> 121

<211> 321

<212> DNA

<213> 人 I.

<220>

<223> L4 (DNA)

<400> 121

gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc 60

atcaccitgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc 120

ggcaaggccc ccaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccccagc 180

cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacaccctga ccatcagcag cctgcagccc 240

gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaage tgccttgac cttcggccag 300

[0051]



ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 122	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> L6 (DNA)	
<400> 122	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc	60
atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc tcaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccccagc	180
cgttcagcg gcagcggcag cggcaccgac tacacctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag	300
ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 123	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> L7 (DNA)	
<400> 123	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc	60
atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc tcaagctgct gatcttctac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccccagc	180
cgttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcacctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag	300

[0052]

ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 124	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人.II	
<220>	
<223> L8 (DNA)	
<400> 124	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgctgacc	60
atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccagc	180
cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacatcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgcctggac cttcggccag	300
ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 125	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人.II	
<220>	
<223> L9 (DNA)	
<400> 125	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgctgacc	60
atcacctgca gcgccagcca ggacatcaac aagtacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccagc	180
cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgcctggac cttcggccag	300

[0053]

ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 126	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人 I.	
<220>	
<223> L10 (DNA)	
<400> 126	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc	60
atcacctgcc aagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctactac accagcagcc tgcacagcgg cgtgccagc	180
cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag	300
ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 127	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人 I.	
<220>	
<223> L11 (DNA)	
<400> 127	
gacatccaga tgaccagag cccagcagc ctgagcgcca gcgtgggcca ccgcgtgacc	60
atcacctgcc aagccagcca ggacatcagc aactacctga actggtacca gcagaagccc	120
ggcaaggccc ccaagctgct gatctacgac gccagcaacc tggaaccgg cgtgccagc	180
cgcttcagcg gcagcggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatcagcag cctgcagccc	240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacgagaagc tgccctggac cttcggccag	300

[0054]

ggcaccaagg tggagatcaa g	321
<210> 128	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H2 (DNA)	
<400> 128	
caggatgcagc tgcaggaatc cggatccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
acctgcaccg ttccgggttt ctccctgacc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac	180
tccgctctga aatcccgctt taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg	240
aaactgtcct ccgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actcgttctg tgaccggct	300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtacctc cctgaccgtt	360
tccctccgt	369
<210> 129	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H4 (DNA)	
<400> 129	
caggatgcagc tgcaggaatc cggatccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
acctgcaccg ttccgggttt ctccctgacc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac	180
tccgctctga aatcccgctt taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg	240

[0055]

aaactgtcct cgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggt	300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtacctc cctgaccgtt	360
tctecgct	369
<210> 130	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H5 (DNA)	
<400> 130	
caggtgcagc tgcaggaatc cggtcgggt ctggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
acctgcaccg ttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg	120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggatg atctggggtg acggtccac cgactacaac	180
tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca ggtctccctg	240
aaactgtcct cgttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggt	300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtacctc cctgaccgtt	360
tctecgct	369
<210> 131	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H6 (DNA)	
<400> 131	
caggtgcagc tgcaggaatc cggtcgggt ctggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
acctgcaccg ttccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat ccgtcagccg	120

[0056]

ccgggtaaag gcttggaatg gatcggtatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc gtagacaact ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct cggttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt 360  
 tcctccgct 369

<210> 132  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> H7 (DNA)

<400> 132  
 cagggtgcagc tgcaggaatc cggtcgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 accigcaccg ttcccggttt ctccctgacc gactacggtg ttgactggat cgcgcagccg 120  
 ccgggtaaag gcttggaatg gatcggtatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacacct ccaaaaacca ggtctccctg 240  
 aaactgtcct cggttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt 360  
 tcctccgct 369

<210> 133  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> H8 (DNA)

[0057]

<400> 133  
 caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg ttccggttt ctccctgacc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggtatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtct taccatctcc aaagacaact ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgetgacacc gctgtttact actgcgttcg tgaccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt 360  
 tctctcgct 369

<210> 134  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人工

<220>  
 <223> H9 (DNA)

<400> 134  
 caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg 60  
 acctgcaccg ttccggttt ctccctgacc gactacgggtg ttgactggat ccgtcagccg 120  
 ccgggtaaag gtctggaatg gatcggtatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac 180  
 tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg 240  
 aaactgtcct ccgttaccgc tgetgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct 300  
 gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggttacctc cctgaccgtt 360  
 tctctcgct 369

<210> 135  
 <211> 369  
 <212> DNA  
 <213> 人工

[0058]

<220>		
<223>	H12 (DNA)	
<400>	135	
caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg		60
acctgcaccg tttccggtag ctccatctcc gactacgggt ttgactggat ccgtcagccg		120
ccgggtaaag gctctggaatg gatcggtagt atctgggggt acggttccac cgactacaac		180
tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg		240
aaactgtcct ccgttaccgc tgetgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct		300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtaccct cgtgaccgtt		360
tcctccgct		369
<210>	136	
<211>	369	
<212>	DNA	
<213>	人 I.	
<220>		
<223>	H13 (DNA)	
<400>	136	
caggtgcagc tgcaggaatc cgggccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg		60
acctgcaccg tttccggtag ctccatctcc gactacgggt gggactggat ccgtcagccg		120
ccgggtaaag gctctggaatg gatcggtagt atctgggggt acggttccac cgactacaac		180
tccgctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg		240
aaactgtcct ccgttaccgc tgetgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct		300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtaccct cgtgaccgtt		360
tcctccgct		369

[0059]



<210>	137	
<211>	369	
<212>	DNA	
<213>	人.I.	
<220>		
<223>	H14 (DNA)	
<400>	137	
cagggtgcagc tgcaggaatc cgggtccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg		60
acctgcaccg ttcccggtgg ctccatctcc gactacgggt gggactggat ccgtcagccg		120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac		180
ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg		240
aaactgtcct cegttaccgc tgcagacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct		300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtaccct cgtgaccgtt		360
tectccgct		369
<210>	138	
<211>	369	
<212>	DNA	
<213>	人.I.	
<220>		
<223>	H15 (DNA)	
<400>	138	
cagggtgcagc tgcaggaatc cgggtccgggt ctggttaaac cgtccgaaac cctgtccctg		60
acctgcaccg ttcccggtgg ctccatctcc tctactatt ggtcctggat ccgtcagccg		120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcgggatg atctgggggtg acggttccac cgactacaac		180
ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg		240
aaactgtcct cegttaccgc tgcagacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct		300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtaccct cgtgaccgtt		360

[0060]

tcctccgct	369
<210> 139	
<211> 369	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> H16 (DNA)	
<400> 139	
caggtgcagc tgcaggaatc cggtcgggt ctggtaaac cgtccgaaac cctgtccctg	60
acctgcaccg ttccgggtgg ctccatctcc tctactatt ggtcctggat cegtcagccg	120
ccgggtaaag gtctggaatg gatcggttat atctattatt cgggtccac caactacaac	180
ccctctctga aatcccgtgt taccatctcc gtagacacct ccaaaaacca gttctccctg	240
aaactgtcct cegttaccgc tgctgacacc gctgtttact actgcgctcg tgaccggct	300
gactacggta actacgacta cgctctggac tactggggtc aggtaccct cgtgaccgtt	360
tcctccgct	369
<210> 140	
<211> 60	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> VL-前导 (DNA)	
<400> 140	
atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactgga	60
<210> 141	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0061]

<220>		
<223>	K 恒定区 (DNA)	
<400>	141	
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct		60
ggaactgcct ctgtttgttg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag		120
tggaaggtgg ataacgcct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac		180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc acctgacgc tgagcaaagc agactacgag		240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag		300
agcttcaaca ggggagagtg t		321
<210>	142	
<211>	78	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	VH-前导 (DNA)	
<400>	142	
atgaaacatc tgtggttctt ctttctcctg gtggcagcta tgaaacatct gtggttcttc		60
cttctcctgg tggcagct		78
<210>	143	
<211>	993	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	IgG1-恒定区 (DNA)	
<400>	143	
tccaccaagg gccatccgt cttccccctg gcacctctc ccaagagcac ctctgggggc		60
acageggccc tgggtgcct ggtaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcatgg		120

[0062]

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga	180
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac	240
atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa	300
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcga ggggggaccg	360
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccecaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag	420
gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac	480
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc	540
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggcg	600
tacgcgtgcg cggctctcaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa	660
gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg	720
accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatgcc	780
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccagcc tcccgtgctg	840
gactccgacg gtccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag	900
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag	960
aagagcctct cctgtctct gggtaaatga taa	993

<210> 144

<211> 997

<212> DNA

<213> 人.1.

<220>

<223> IgG4-恒定区 (DNA)

<220>

<221> IgG4-恒定区 (DNA)

<222> (1).. (997)

[0063]

<400> 144	
tccaccaagg gcccatccgt ctccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc	60
acagccgccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg	120
aactcaggcg cctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga	180
ctctactecc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttggggcac gaagacctac	240
acctgcaacg tagatcacia gccccagcaac accaagggtg acaagagagt tgagtccaaa	300
tatggcccc catgccatc atgccagca cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc	360
ctgttcccc caaaaccaa ggacactctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420
gtgggtggtg acgtgagcca ggaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc	480
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt	540
gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc	600
aaggctctca acaaaggcct cccgtctctc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg	660
cagccccgag agccacaggt gtacacctg ccccatccc aggaggagat gaccaagaac	720
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg	780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	840
ggctccttct tcctctacag caggctaacc gtggacaaga gcaggtggca ggaggggaat	900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggt ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc	960
tcctgtctc tgggtaaag ataggatccg cggccgc	997
<210> 145	
<211> 122	
<212> PRT	
<213> 人 I.	
<220>	
<223> H15	

[0064]



	35		40		45														
Gly	Tyr	Ile	Tyr	Tyr	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys				
	50					55					60								
Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu				
	65					70				75					80				
Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
				85					90					95					
Arg	Asp	Pro	Ala	Asp	Tyr	Gly	Asn	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp				
			100					105						110					
Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
	115						120												

<210> 147

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-04, 框架区 1)

<400> 147

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

Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser
			20					25

<210> 148

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-04, 框架区 2)

<400> 148

[0066]







<211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VH4 (4-30.1, 框架区 2)

<400> 154

Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1                    5                    10

<210> 155  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VH4 (4-30.1, 框架区 3)

<400> 155

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1                    5                    10                    15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   20                    25                    30

<210> 156  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VH4 (4-30.2, 框架区 1)

<400> 156

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser

[0069]

20

25

&lt;210&gt; 157

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH4 (4-30.2, 框架区 2)

&lt;400&gt; 157

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                            5                            10

&lt;210&gt; 158

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH4 (4-30.2, 框架区 3)

&lt;400&gt; 158

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Arg Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
1                            5                            10                            15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                          20                            25                            30

&lt;210&gt; 159

&lt;211&gt; 25

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VH4 (4-30.4, 框架区 1)

&lt;400&gt; 159

[0070]





<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH4 (4-34, 框架区 1)

<400> 165

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr  
                  20                   25

<210> 166  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH4 (4-34, 框架区 2)

<400> 166

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

<210> 167  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>  
<223> VH4 (4-34, 框架区 3)

<400> 167

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
1                   5                   10                   15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                  20                   25                   30

[0073]







<400> 173

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   20                   25                   30

<210> 174

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-61, 框架区 1)

<400> 174

Gln Leu Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu  
 1                   5                   10                   15  
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser  
                   20                   25

<210> 175

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-61, 框架区 2)

<400> 175

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1                   5                   10

<210> 176

<211> 32

<212> PRT

[0076]

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-61, 框架区 3)

<400> 176

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
1                   5                   10                   15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                  20                   25                   30

<210> 177

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-b, 框架区 1)

<400> 177

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Ser  
                  20                   25

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VH4 (4-b, 框架区 2)

<400> 178

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
1                   5                   10

[0077]

<210> 179  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VH4 (4-b, 框架区 3)

<400> 179

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys  
 1                   5                   10                   15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
                   20                   25                   30

<210> 180  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (012, 框架区 1)

<400> 180

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
                   20

<210> 181  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (012, 框架区 2)

<400> 181

[0078]



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VK1 (02 , 框架区 2)

&lt;400&gt; 184

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1                           5                           10                           15

&lt;210&gt; 185

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人.H

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VK1 (02 , 框架区 3)

&lt;400&gt; 185

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                           5                           10                           15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                           20                           25                           30

&lt;210&gt; 186

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人.H

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VK1 (018 衍生抗体 AAK94808, 框架区 1)

&lt;400&gt; 186

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
                           20

&lt;210&gt; 187

[0080]

<211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (018 衍生抗体 AAK94808, 框架区 2)

<400> 187

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 188  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (018 衍生抗体 AAK94808, 框架区 3)

<400> 188

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                    5                    10                    15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   20                    25                    30

<210> 189  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (08, 框架区 1)

<400> 189

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

[0081]

20

<210> 190  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (08 , 框架区 2)

<400> 190

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 191  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (08 , 框架区 3)

<400> 191

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10						15

Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ile	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25							30

<210> 192  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (A20, 框架区 1)

<400> 192

[0082]





<223> VK1 (A30, 框架区 1)

<400> 195

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 196

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (A30 , 框架区 2)

<400> 196

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile Tyr  
1                   5                   10                   15

<210> 197

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (A30 , 框架区 3)

<400> 197

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20                   25                   30

<210> 198

<211> 23

[0084]

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L14, 框架区 1)

<400> 198

Asn Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ala Met Ser Ala Ser Val Gly  
1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 199

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L14 , 框架区 2)

<400> 199

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys His Leu Ile Tyr  
1                    5                    10                    15

<210> 200

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L14 , 框架区 3)

<400> 200

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
1                    5                    10                    15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20                    25                    30

[0085]

<210> 201  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L1, 框架区 1)

<400> 201

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 202  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L1, 框架区 2)

<400> 202

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 203  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L1, 框架区 3)

<400> 203

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

[0086]

1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys			
	20	25	30

<210> 204

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L15, 框架区 1)

<400> 204

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys	
	20

<210> 205

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L15, 框架区 2)

<400> 205

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr			
1	5	10	15

<210> 206

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L15, 框架区 3)

[0087]

<400> 206

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                  20                   25                   30

<210> 207

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L4, 框架区 1)

<400> 207

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
                  20

<210> 208

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L4, 框架区 2)

<400> 208

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1                   5                   10                   15

<210> 209

<211> 32

<212> PRT

[0088]

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L4 , 框架区 3)

<400> 209

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1                   5                   10                   15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                  20                   25                   30

<210> 210

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L18, 框架区 1)

<400> 210

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
                  20

<210> 211

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L18 , 框架区 2)

<400> 211

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1                   5                   10                   15

[0089]

<210> 212  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L18 , 框架区 3)

<400> 212

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                   5                   10                   15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   20                   25                   30

<210> 213  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L5, 框架区 1)

<400> 213

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly  
 1                   5                   10                   15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
                   20

<210> 214  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L5 , 框架区 2)

<400> 214

[0090]





<220>

<223> VK1 (L19 , 框架区 2)

<400> 217

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 218

<211> 32

<212> PRT

<213> 人.I.

<220>

<223> VK1 (L19 , 框架区 3)

<400> 218

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 219

<211> 23

<212> PRT

<213> 人.I.

<220>

<223> VK1 (L8, 框架区 1)

<400> 219

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 220

[0092]

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L8 , 框架区 2)

<400> 220

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 221

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L8 , 框架区 3)

<400> 221

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr  
 1                    5                    10                    15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   20                    25                    30

<210> 222

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L23, 框架区 1)

<400> 222

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Phe Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

[0093]

20

<210> 223  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L12 , 框架区 2)

<400> 223

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Ala	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 224  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L23 , 框架区 3)

<400> 224

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr
1				5					10						15

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
			20					25							30

<210> 225  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L9, 框架区 1)

<400> 225

[0094]

Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Phe Ser Ala Ser Thr Gly  
 1                    5                    10                    15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 226

<211> 15

<212> PRT

<213> 人.工.

<220>

<223> VK1 (L9, 框架区 2)

<400> 226

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 227

<211> 32

<212> PRT

<213> 人.工.

<220>

<223> VK1 (L9, 框架区 3)

<400> 227

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 1                    5                    10                    15

Leu Thr Ile Ser Cys Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20                    25                    30

<210> 228

<211> 23

<212> PRT

<213> 人.工.

<220>

[0095]



<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L11, 框架区 1)

<400> 231

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 232

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L11, 框架区 2)

<400> 232

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
1                      5                      10                      15

<210> 233

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> VK1 (L11, 框架区 3)

<400> 233

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
1                      5                      10                      15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20                      25                      30

[0097]

<210> 234  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L12, 框架区 1)

<400> 234

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 235  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L12 , 框架区 n2)

<400> 235

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 1                    5                    10                    15

<210> 236  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工

<220>  
 <223> VK1 (L12 , 框架区 3)

<400> 236

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr

[0098]

1	5	10	15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys	20	25	30
<210> 237			
<211> 449			
<212> PRT			
<213> 人.H.			
<220>			
<223> H9IgG4 (重链)			
<400> 237			
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu	5	10	15
1			
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asp Tyr	20	25	30
Gly Val Asp Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	35	40	45
Gly Met Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys	50	55	60
Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu	65	70	75
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	85	90	95
Arg Asp Pro Ala Asp Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Leu 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 Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr	130	135	140
Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr			

[0099]



145	150	155	160
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 Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp			
	195	200	205
His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr			
	210	215	220
Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
	245	250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp			
	260	265	270
Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
	275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
	290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys			
	325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
	340	345	350
Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
	355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
	370	375	380

[0100]

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu  
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys  
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu  
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly  
435 440 445

Lys

<210> 238

<211> 214

<212> PRT

<213> 人 L

<220>

<223> L9IgG4 (轻链)

<400> 238

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr  
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Lys Leu Pro Trp  
85 90 95

[0101]

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

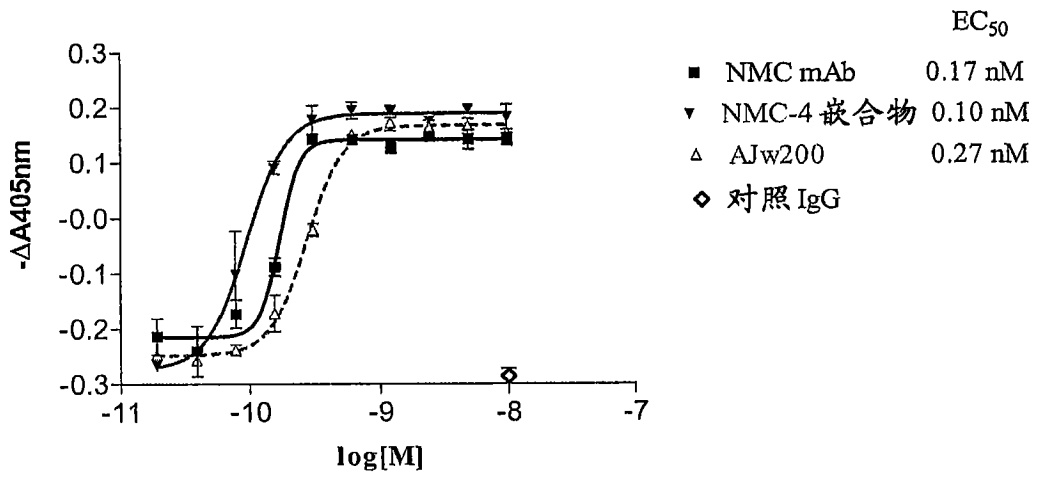
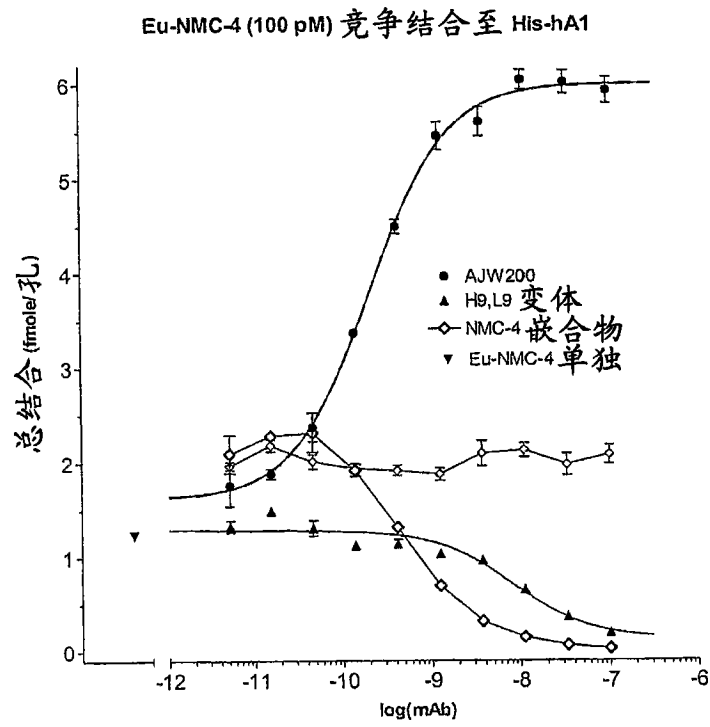


图 1

A.



B.

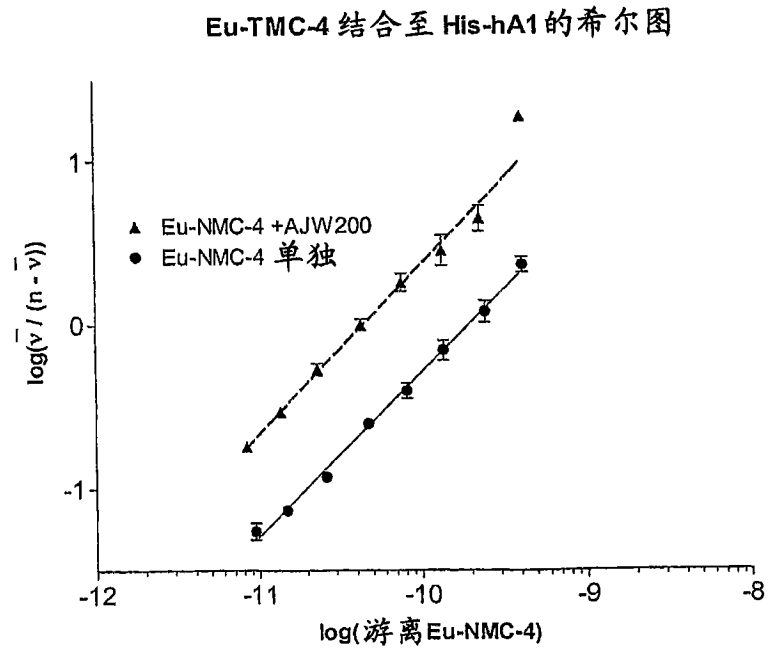


图 2

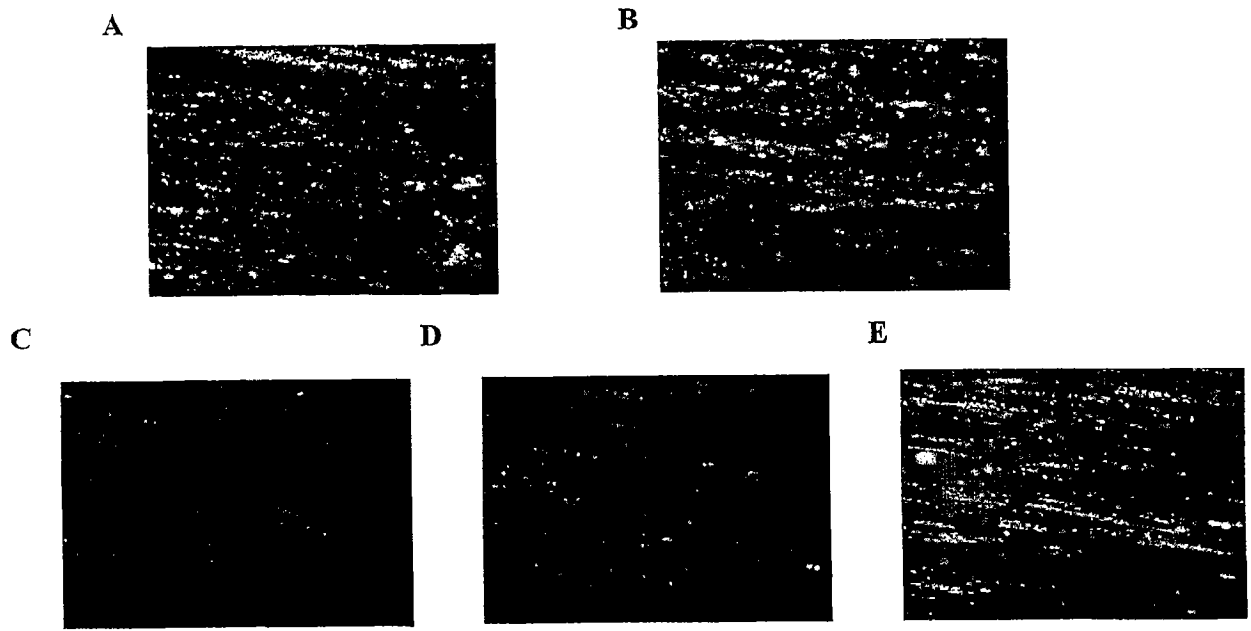


图 3

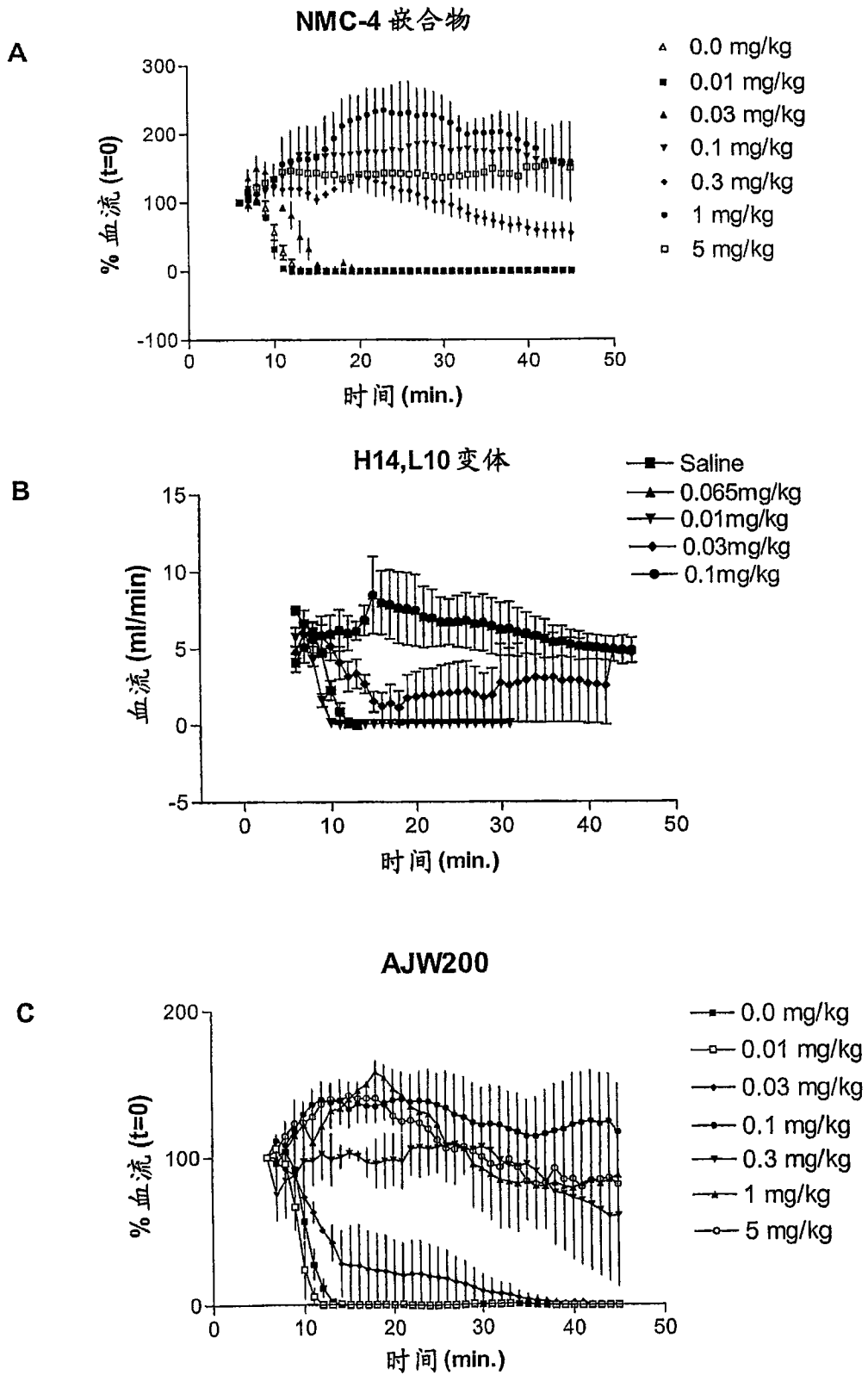


图 4

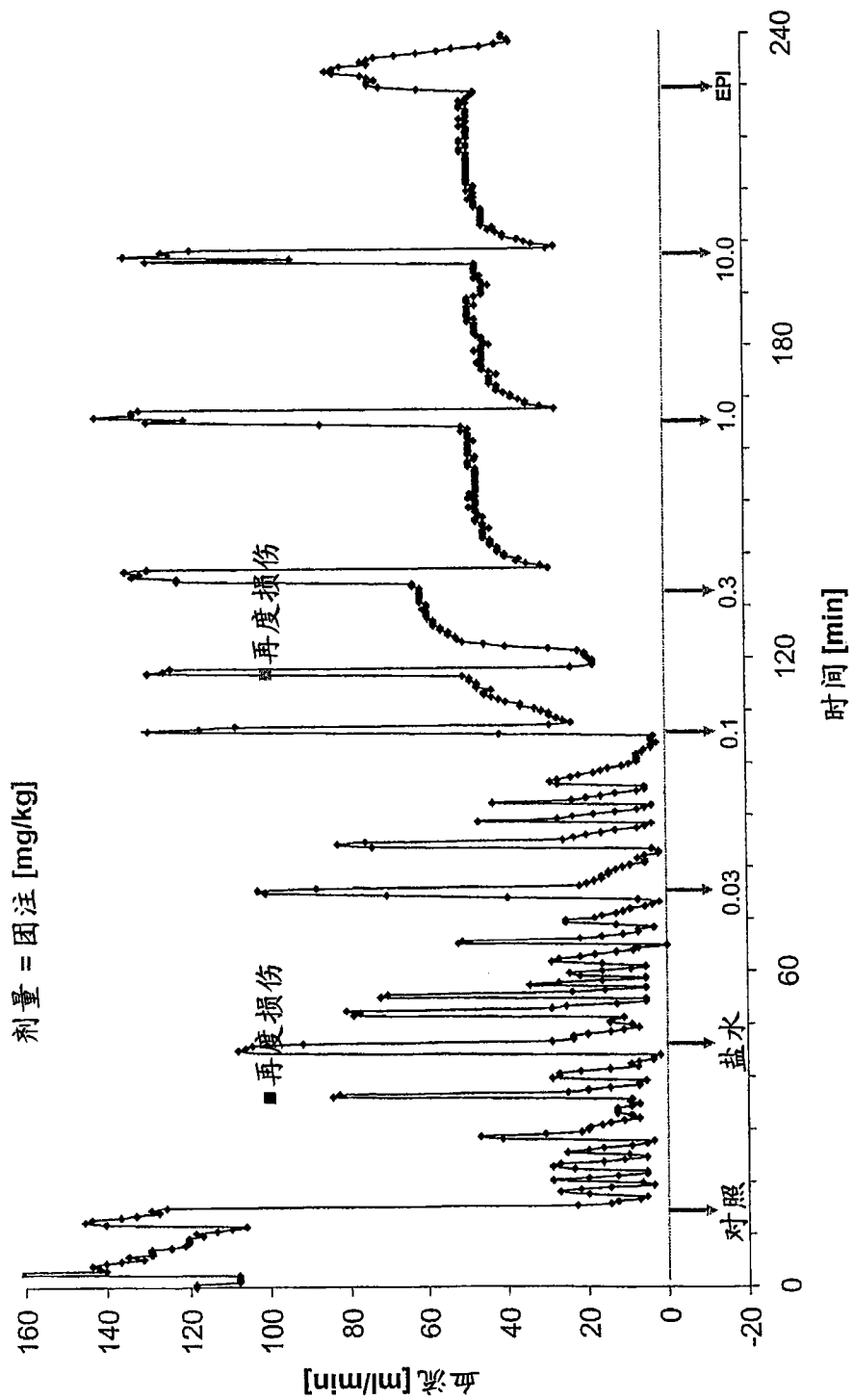


图 5



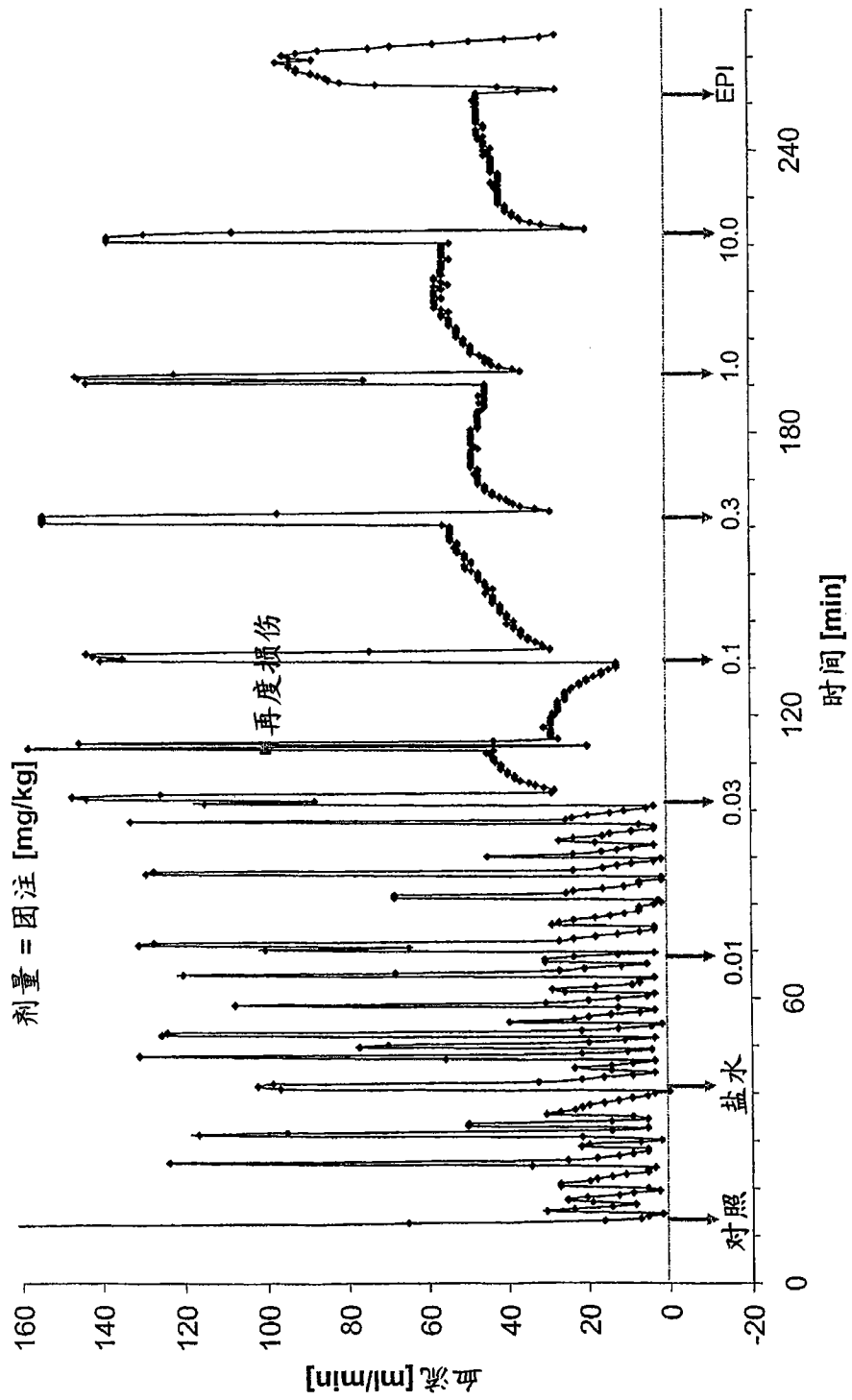


图 6

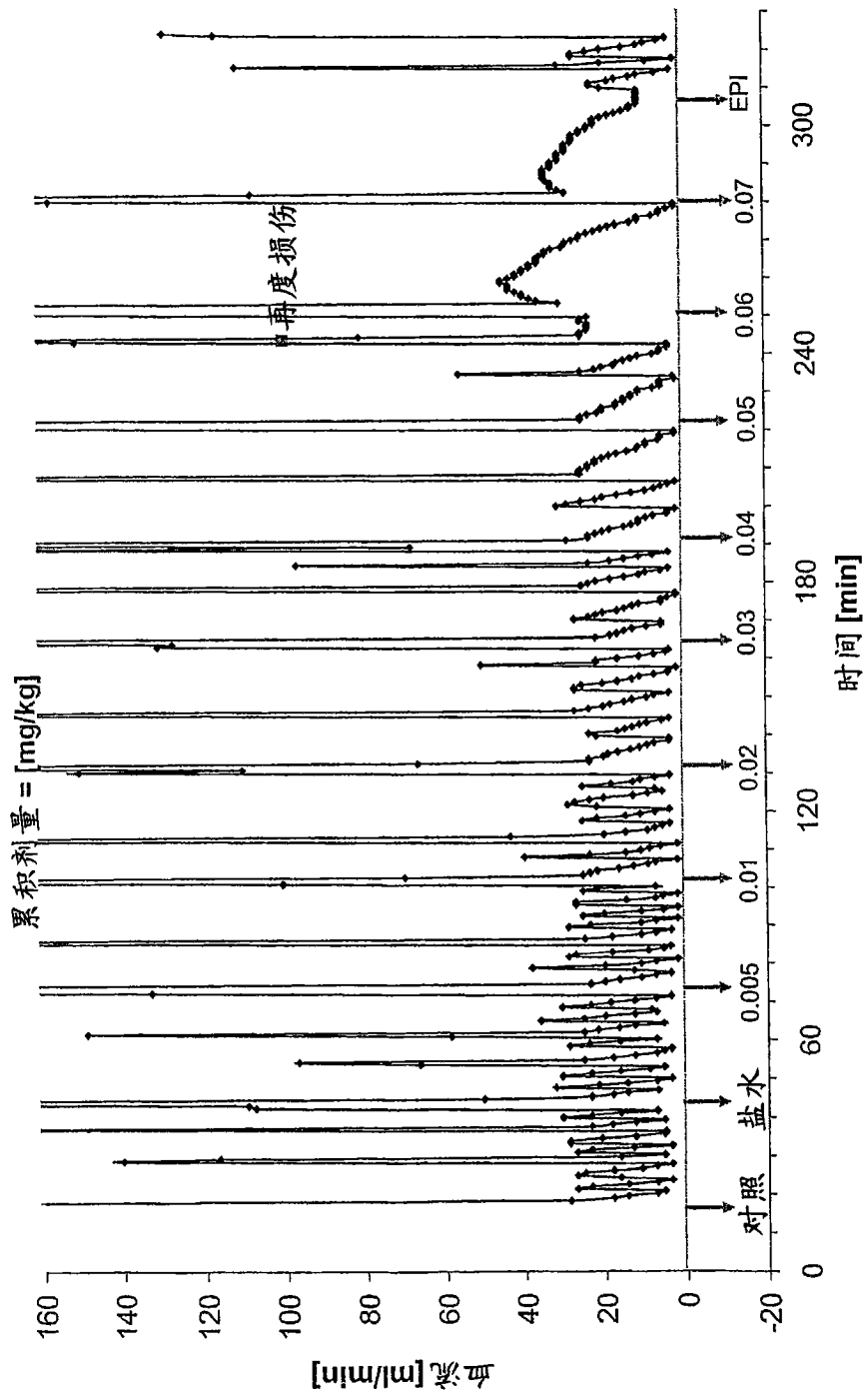


图 7

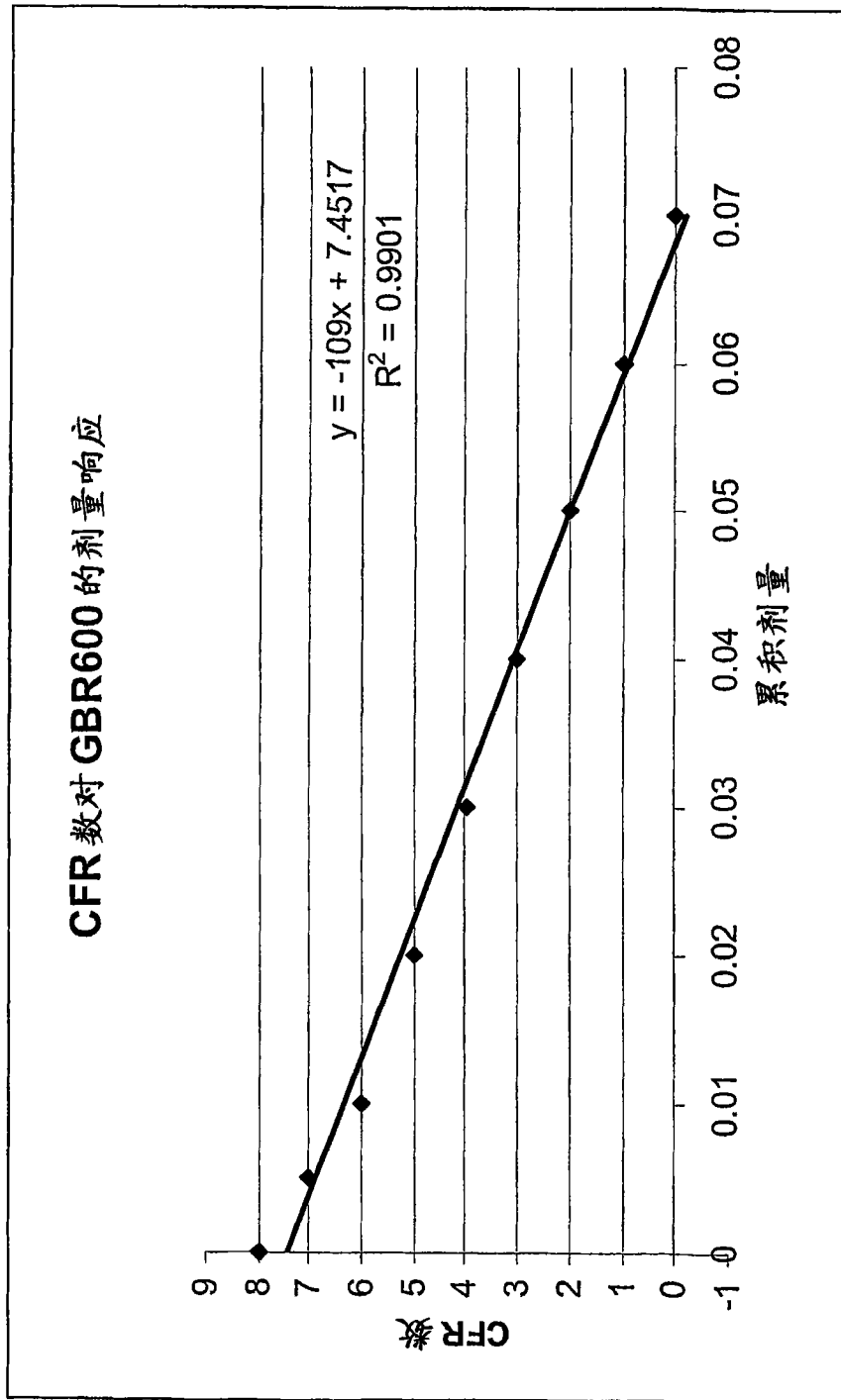


图 8

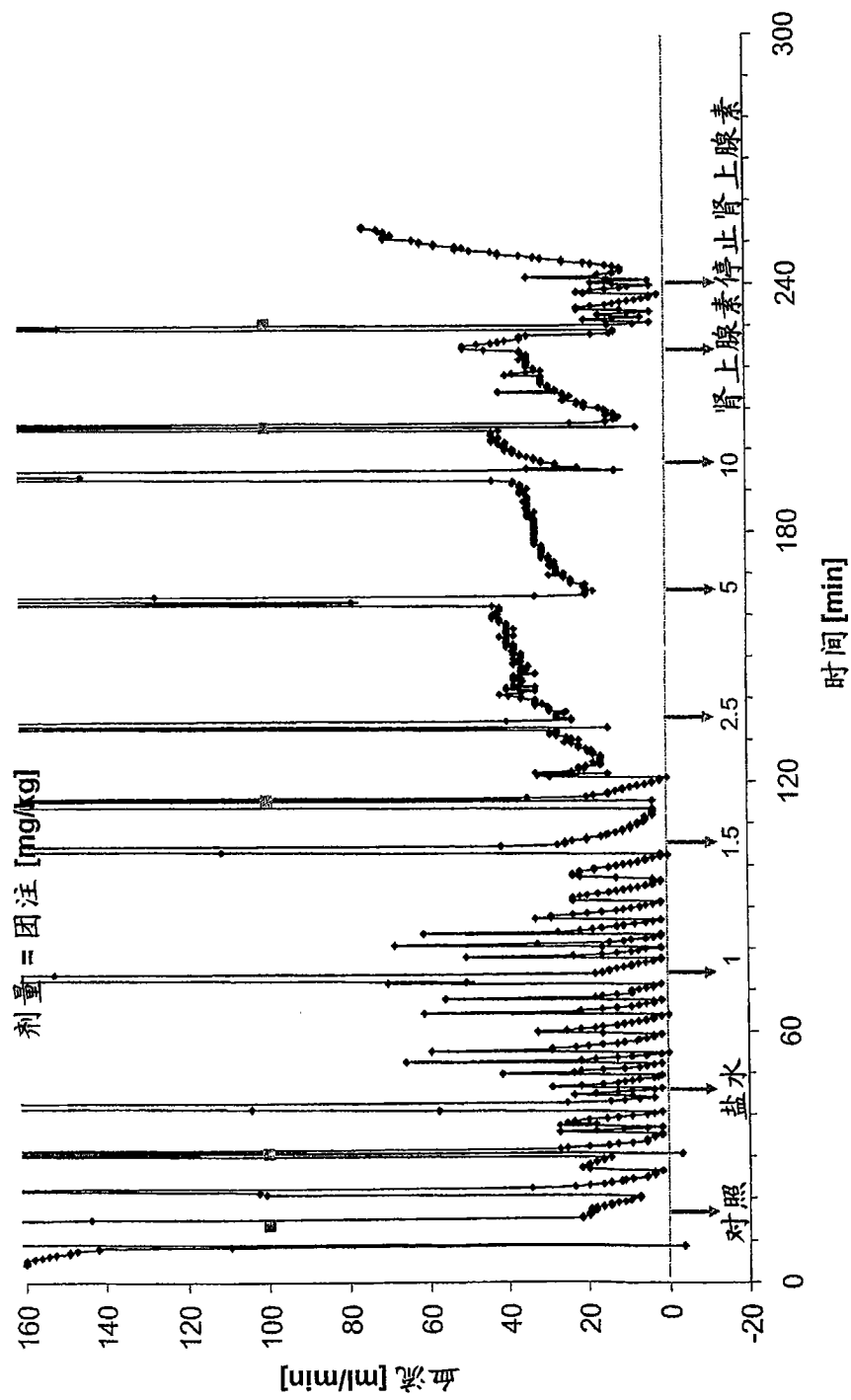


图 9

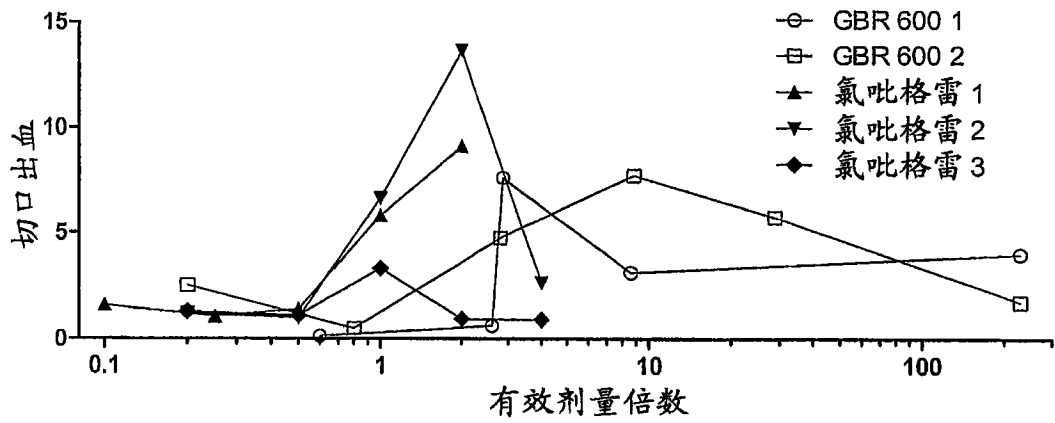
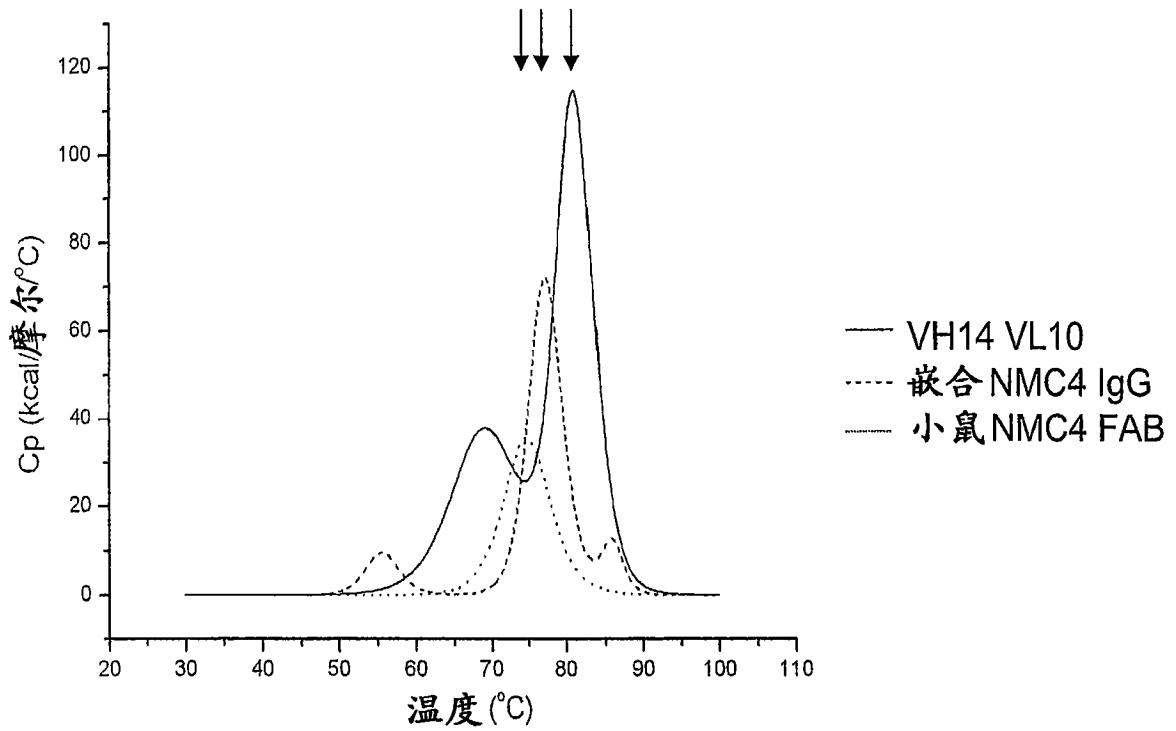


图 10



	FAB Tm (°C)
VH14 VL10 IgG	81.1
嵌合 NMC4 IgG	79.1
小鼠 NMC4 FAB	74.7

图 11