

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2018年3月1日 (01.03.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/036117 A1

(51) 国际专利分类号:

C07K 16/36 (2006.01) *A61P 7/02* (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/074163

(22) 国际申请日: 2017年2月20日 (20.02.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201610705557.4 2016年8月22日 (22.08.2016) CN

(71) 申请人: 复旦大学 (FUDAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

(72) 发明人: 余科 (YU, Ker); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。 张学赛 (ZHANG, Xuesai); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。 林卿 (LIN, Qing); 中国上海市杨浦区邯郸路220号, Shanghai 200433 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。



WO 2018/036117 A1

(54) Title: ANTIBODY TARGETED TO TISSUE FACTOR, PREPARATION METHOD THEREFOR, AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向于组织因子的抗体、其制备方法和用途

(57) Abstract: The present invention provides a tissue factor (TF) monoclonal antibody and a preparation method therefor. The monoclonal antibody provided by the present invention can specifically bind with a TF antigen, has high affinity and low immunogenicity, and has the activity of resisting tumors and the like.

(57) 摘要: 本发明提供了一种组织因子(TF)单克隆抗体及其制备方法。本发明的单克隆抗体能够特异性地结合TF抗原, 其具有较高的亲和力及较低的免疫原性, 并且具有抗肿瘤等活性。

靶向于组织因子的抗体、其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及一种抗体，尤其涉及一种靶向于人组织因子的抗体、其制备方法和用途。

5

背景技术

组织因子(Tissue factor, TF)是一个47 kDa 的跨膜糖蛋白。正常生理状态下TF表达主要屏蔽于血管内皮下细胞层，一旦机体血管受到创伤，TF暴露于血流，通过结合并激活VII因子从而启动外源性凝血反应。

10 研究发现，TF在众多肿瘤组织中异常激活表达，在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用。特别是在癌症晚期，病人大多伴随自发性血栓，如深度静脉血栓(Deep-vein thrombosis, DVT)、弥漫性血管内凝血(Disseminated intravascular coagulation, DIC)和肺栓塞(Pulmonary embolism, PE)等(Thrombosis research, 2013, 131: S59-S62; Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2011, 9(s1): 306-315); 而TF在肿瘤细胞中的
15 异常表达则是这些症状发生的主要诱因。对众多肿瘤临床样本分析表明，TF的表达水平直接影响肿瘤的转移、病人血栓的发生等恶化指标，如在乳腺癌中TF异常表达率为85.8%，在胰腺癌中为88.5%，在肺癌中为83.6%，食道癌中为91.3%等(Blood, 2012, 119: 924-932)。

TF除了起始外源性凝血途径，TF/FVIIa复合物还能直接结合和诱导跨膜G蛋白偶联受体
20 体 Protease-activated receptor 2(PAR2)的活化。PAR2是调控炎症反应的重要信号通路，虽然对PAR2在肿瘤领域的研究目前还比较少，但可以想象，TF通过PAR2能影响细胞内一系列肿瘤功能信号。概而言之，TF-PAR2通过MAPK/ERK磷酸化，诱导关键生长因子、免疫调节因子和趋化因子的基因表达(如VEGF、CSF1/2、IL8、CXCL1等)，促进新生血管的形成，为肿瘤的生长提供了充足的养分、能量和适宜的微环境。此外，TF还可以通过
25 与Rac1、 β 1家族相关整合素的相互作用，以提高肿瘤细胞的迁移性和粘附性，从而在整体上增强肿瘤细胞的血行性转移能力(Journal of Thrombosis research, 2012, 130: S84-S87; Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2013, 11: 285-293; International Journal of Cancer, 2014, doi: 10.1002/ijc.28959; Blood, 2012, 119: 924-932)。

同时，TF-诱导的高凝状态又直接有助于肿瘤细胞的生存和血行性转移(Blood, 2008,
30 111: 190-9; Cancer Res., 2015, 75(1 Suppl): Abstract nr B19)，即TF/FVIIa起始的凝血反应，导致凝血酶的生成、纤维蛋白的沉积，这不仅使肿瘤细胞逃逸免疫攻击，还增加了肿瘤细胞与内皮细胞的相互作用，帮助肿瘤细胞的扩散和渗透，利于血行性转移的发生，这也正是当前癌症难治疗的重要原因。

研究表明，TF在血栓类疾病中也起作用。除了在肿瘤发生、发展中的作用，TF或
35 MPTF(Microparticle tissue factor)起始的凝血作用也是引发静脉血栓栓塞症(Venous thromboembolism, VTE)的重要原因，其在血液中的含量更是与VTE的严重程度成正比，目前更是有许多研究表明TF可以作为VTE病人临床诊断、评估病情的重要标志物和VTE治疗的潜在靶点(Thrombosis research, 2010, 125: 511-512; Lupus., 2010, 19: 370-378; Annual review of physiology, 2011, 73: 515-525)。同样，TF在动脉血栓类疾病中的作用

也不容忽视, 众多临床数据表明TF在动脉粥样硬化的形成和发展过程中起重要作用, 2009年, Steppich B A, Braun S L等对174位不稳定型心绞痛病人(unstable Angina pectoris, uAP)和112位急性心肌梗塞(Acute myocardial infarction, AMI)进行研究, 结果表明血浆中TF的活性直接影响心血管病病人的死亡率, 而且TF可以作为心血管类疾病的诊断和预后判断的标志物(Thrombosis research, 2012, 129: 279-284; Thromb J., 2009, 7(11): 1-9); 2014年, Jiang P, Xue D等通过光化学法致血栓模型和FeCl₃致血栓模型研究表明, 与内源凝血途径相比, TF起始的外源凝血途径在动脉血栓类疾病的发生、发展中起更重要的作用, 而且实验结果更证明TF起始的外源凝血途径可以作为动脉血栓类疾病治疗的靶标(Thrombosis research, 2014, 133(4): 657-666)。

TF在炎症及代谢疾病中也起作用。研究表明, 炎症性疾病的发生都伴随有异常的血管生成和凝血。Maria I Bokarewa等研究表明, 多种炎症刺激物都会促进TF在内皮细胞和单核细胞表面的表达, 而且他们的实验结果显示TF的过表达也是诱导和促进炎症发生的一个主要因子(Arthritis Res 2002, 4:190-195)。

同样, 研究表明TF在肥胖和糖尿病的治疗中起显著的调控作用, 如Leylla Badeanlou等研究表明, 通过靶向TF的特异性抗体或敲除TF以阻断TF-PAR2信号通路, 可明显的抑制饮食诱导的肥胖性疾病及脂肪组织炎症的发生并可以显著改善胰岛素对糖尿病的治疗效果(Nature medicine, 2011, 17(11): 1490-1497)。

因此, 鉴于TF在各类相关疾病中作用和功能, 开发靶向TF的特异性治疗抗体, 对TF在癌症、血栓、炎症等各类疾病中引起的血管增生、异常凝血等所导致的病理特征的诊断、治疗和预防是极其有益的。

发明内容

本发明目的就是提供了一种TF抗体, 它具有特异性靶向于人TF、具有抑制肿瘤生长和转移活性, 并具有抗凝血和抑制FXa生成活性等。

在本发明第一方面, 提供了一种抗体的重链可变区, 所述的重链可变区包括以下三个互补决定区 CDR:

SEQ ID NO:1 所示的 CDR1,
SEQ ID NO:2 所示的 CDR2, 和
SEQ ID NO:3 所示的 CDR3;

其中, 上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的, 并能够保留 TF 结合亲和力的衍生序列。

在本发明的第二方面, 提供了一种抗体的重链, 所述的重链具有第一方面的重链可变区。

在另一优选例中, 所述重链可变区具有 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。

在本发明的第三方面, 提供了一种抗体的轻链可变区, 所述轻链可变区具有选自下组的互补决定区 CDR:

SEQ ID NO:4 所示的 CDR1',
SEQ ID NO:5 所示的 CDR2', 和

SEQ ID NO:6 所示的 CDR3';

上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有 TF 结合亲和力的衍生序列。

5 在本发明的第四方面，提供了一种抗体的轻链，所述的轻链具有第三方面的轻链可变区。

在另一优选例中，所述轻链可变区具有 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列。

在本发明的第五方面，提供了一种抗体，所述抗体具有：

(1) 第一方面的重链可变区；和/或

(2) 第三方面的轻链可变区；

10 或者，所述抗体具有：第二方面的重链；和/或第四方面的轻链。

在另一优选例中，所述抗体选自：动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

在另一优选例中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的 40%。

在另一优选例中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为 1-7 个。

15 在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸序列为同源性为至少 80%的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸具有抑制 TF 相关信号通路的活性、抗凝血活性、抗 FXa 生成活性中的任意一种或几种。

20 在另一优选例中，所述的抗体选自下组：TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch、TF-mAb-H39、TF-mAb-H44。

在本发明的第六方面，提供了一种本发明所述抗体的应用，所述抗体用于(a)制备诊断试剂；和/或(b)制备预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。

在另一优选例中，所述TF相关的疾病选自下组：肿瘤的发生、生长和/或转移；血栓类相关疾病；炎症；代谢相关疾病；或其组合。

25 在另一优选例中，所述肿瘤为 TF 高表达的肿瘤。

在另一优选例中，所述的 TF 高表达指肿瘤组织中 TF 转录本和/或蛋白的水平 L1 与正常组织中转录本和/或蛋白的水平 L0 之比， $L1/L0 \geq 2$ ，较佳地 ≥ 3 。

在另一优选例中，所述的肿瘤选自下组：三阴性乳腺癌、胰腺癌、肺癌和恶性胶质瘤。

在另一优选例中，所述药物为抗体药物偶联物。

30 在本发明的第七方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i) 第一方面的重链可变区、第二方面的重链、第三方面的轻链可变区、第四方面的轻链、或第五方面的抗体；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在本发明的第八方面，提供了一种多核苷酸，它编码选自下组的多肽：

35 (1) 第一方面的重链可变区、第二方面的重链、第三方面的轻链可变区、第四方面的轻链、或第五方面的抗体；或

(2) 第七方面的重组蛋白。

在本发明的第九方面，提供了一种载体，它含有第八方面的多核苷酸。

在本发明的第十方面，提供了一种遗传工程化的宿主细胞，它含有第九方面的载体或

基因组中整合有第八方面的多核苷酸。

在本发明的第十一方面，提供了一种抗体药物偶联物，该抗体药物偶联物含有：

(a) 抗体部分，所述抗体部分选自下组：第一方面的重链可变区、第二方面的重链、第三方面的轻链可变区、第四方面的轻链、第五方面的抗体、或其组合；和

5 (b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分，所述偶联部分选自下组：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

在另一优选例中，所述的抗体部分与所述的偶联部分通过化学键或接头进行偶联。

在另一优选例中，所述的抗体药物偶联物中的抗体部分选自下组：TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch，或 TF-mAb-H29 至 TF-mAb-H48；更佳地，所述的抗体部分选自下组：
10 TF-mAb-H39、TF-mAb-H44。

在本发明的第十二方面，提供了一种免疫细胞，所述免疫细胞表达或在细胞膜外暴露有本发明第五方面的抗体。

在另一优选例中，所述的免疫细胞包括 NK 细胞、T 细胞。

在另一优选例中，所述的免疫细胞为人的。

15 在另一优选例中，所述的抗体为单链抗体。

在本发明的第十三方面，提供了一种药物组合物，它含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：第一方面的重链可变区、第二方面的重链、第三方面的轻链可变区、第四方面的轻链、或第五方面的抗体、第七方面的重组蛋白、第十一方面的抗体药物偶联物、第十二方面的免疫细胞、或其组合；以及

20 (ii) 药学上可接受的载体。

在本发明的第十四方面，提供了一种活性成分的用途，所述活性成分选自下组：第一方面的重链可变区、第二方面的重链、第三方面的轻链可变区、第四方面的轻链、或第五方面的抗体、第七方面的重组蛋白、第十一方面的抗体药物偶联物、第十二方面的免疫细胞、或其组合，其中所述活性成分被用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒。

25 在另一优选例中，所述试剂、检测板或试剂盒用于：

(1) 检测样品中 TF 蛋白；和/或

(2) 检测肿瘤细胞中内源性的 TF 蛋白；和/或

(3) 检测表达 TF 蛋白的肿瘤细胞；

而所述药剂用于治疗或预防表达 TF 蛋白的肿瘤、血栓类疾病、肥胖及糖尿病等疾病。

30 在本发明的第十五方面，提供了一种体外检测(包括诊断性或非诊断性)样品中 TF 蛋白的方法，所述方法包括步骤：

(1) 在体外，将所述样品与本发明抗体接触；

(2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 TF 蛋白。

35 在本发明的第十六方面，提供了一种检测板，所述的检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有第五方面的抗体或第十一方面的免疫偶联物。

在本发明的第十七方面，提供了一种试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中包括：

(1) 第一容器，所述第一容器中含有本发明的抗体；和/或

(2) 第二容器，所述第二容器中含有抗本发明抗体的二抗；

或者，

所述试剂盒含有第十六方面的检测板。

在本发明的第十八方面，提供了一种重组多肽的制备方法，该方法包括：

(a) 在适合表达的条件下，培养第十方面的宿主细胞；

5 (b) 从培养物中分离出重组多肽，所述的重组多肽是第五方面的抗体或第七方面的重组蛋白。

在本发明的第十九方面，提供了一种治疗肿瘤、血栓类疾病、炎症性疾病和/或代谢类疾病的方法，包括：使用(如给需要的对象施用)第五方面的抗体、所述抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的 CAR-T 细胞、或其组合。

在另一优选例中，所述的代谢类疾病包括：肥胖、或糖尿病。

10 在本发明的第二十方面，提供了一种抗 TF 抗体，其中该抗体对人 TF 蛋白的亲合力的 EC₅₀ 为 0.005-0.10nM，较佳地为 0.005-0.05nM，更佳地 0.01-0.03nM 或 0.01-0.02nM。

在另一优选例中，所述抗体不结合于野生型的鼠 TF 蛋白。

在另一优选例中，所述抗体具有选自下组的一个或多个特性：

15 (a) 抑制肿瘤细胞迁移或转移；

(b) 抑制肿瘤生长；

在另一优选例中，所述的抗体为 TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch 或 TF-mAb-H29 至 TF-mAb-H48；更佳地，所述的抗体选自下组：TF-mAb-SC1、TF-mAb-Ch、TF-mAb-H39、TF-mAb-H44。在本发明的第二十一方面，提供了一种制备人源化或嵌合抗体的方法，包括步骤：

20 将本发明的鼠源抗体可变区的核苷酸序列克隆入含有人抗体恒定区的表达载体后，通过转染动物细胞表达人-鼠嵌合抗体。

将本发明的含人源FR区的抗体可变区的核苷酸序列克隆入含有人抗体恒定区的表达载体后，通过转染动物细胞表达人源化抗体。

在另一优选例中，所述的抗体是部分或全人源化的单克隆抗体。

25 在本发明的第二十二方面，提供了一种抑制肿瘤细胞迁移的方法，其特征在于，包括步骤：给需要的对象施用本发明的抗体、所述抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的 CAR-T 细胞。

30 应理解，在本发明范围内，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

35 图1为一系列原始抗人 TF 单克隆抗体(original hybridoma)对人源 TF-阳性(MDA-MB-231和BxPC-3)、鼠源TF-阳性(B16-F10)细胞的结合活性(Cell binding activity)检测结果，在10 μg/mL浓度条件下，TF-mAb-SC1显示最佳结合活性。

图2为ELISA 测定TF-mAb-SC1对TF胞外区蛋白的结合亲和力(Binding affinity)。

图3为Western blot 测定一系列原始单克隆抗体对BxPC-3胞内信号通路TF-PAR2的抑制作用。

图4为人-鼠嵌合抗体(TF-mAb-Ch)表达质粒的单酶切、双酶切鉴定结果,其中,图4A为表达重链质粒的可变区单酶切、双酶切鉴定结果,图4B为表达轻链质粒的可变区单酶切、双酶切鉴定结果。

图5为TF-mAb-SC1对细胞表面TF的结合亲和力(Binding affinity)检测结果,其中,图5A为对BxPC-3结合亲和力,图5B为对MDA-MB-231结合亲和力,图5C为对U87MG结合亲和力,图5D为对H1975的结合亲和和活性。

图6为TF-mAb-SC1对FVIIa激活的BxPC-3细胞胞内信号通路TF-PAR2的影响检测结果。

图7为TF-mAb-SC1抗凝血活性检测结果,分别以BxPC-3(图7A)和MDA-MB-231(图7B)细胞表面TF作为TF来源。

图8为TF-mAb-SC1抗FXa生成活性检测结果,分别以BxPC-3(8A)和MDA-MB-231(8B)细胞表面TF作为TF来源。

图9为TF-mAb-SC1抑制裸鼠皮下BxPC-3肿瘤生长的检测结果(箭头所指为开始给药时间)。

图10为TF-mAb-SC1抑制裸鼠皮下U87MG肿瘤生长的检测结果(箭头所指为开始给药时间)。

图11为TF-mAb-SC1抑制HCC1806原位移植瘤生长的检测结果(箭头所指为开始给药时间)。

图12为TF-mAb-SC1抑制BxPC-3肿瘤基质胶原的堆积的检测结果及其Image-pro plus进行统计分析的结果。

图13为TF-mAb-SC1减小BxPC-3肿瘤血管管腔面积及其统计结果。

图14为TF基因敲除情况下,MDA-MB-231(图14A)和BxPC-3(图14B)细胞的迁移水平的测定。

图15为TF-mAb-SC1抗肿瘤细胞迁移活性测定,其中图15A为TF-mAb-SC1抑制MDA-MB-231细胞的迁移水平的测定;图15B为TF-mAb-SC1抑制BxPC-3细胞的迁移水平的测定;

图16为TF基因敲除后,MDA-MB-231-luc细胞在小鼠体内血行性迁移水平检测及其荧光强度统计结果。

图17为TF-mAb-SC1抑制MDA-MB-231-luc细胞在小鼠体内血行性迁移能力检测及其荧光强度统计结果。

图18A为肺上的MDA-MB-231肿瘤转移灶及其统计分析结果;图18B为肺的重量比较结果。

图19为TF-mAb-SC1被细胞内吞(Internalization)至溶酶体的激光共聚焦显微镜观察结果。

图20为ELISA测定嵌合型抗体TF-mAb-Ch对TF胞外区蛋白的结合亲和力。

图21A为TF-mAb-Ch对TF-阳性肿瘤细胞MDA-MB-231的结合亲和力的测定,图21B为TF-mAb-Ch对TF-阳性肿瘤细胞HCC1806的结合亲和力的测定。

图22为TF-mAb-Ch对BxPC-3胞内信号通路TF-PAR2影响的检测结果。

图23为TF-mAb-Ch被细胞内吞(Internalization)至溶酶体的检测。

图24A为ELISA测定人源化抗体TF-mAb-H39对TF胞外区蛋白的结合亲和力；图24B为ELISA测定人源化抗体TF-mAb-H44对TF胞外区蛋白的结合亲和力。

图25为人源化抗体对BxPC-3胞内信号通路TF-PAR2影响的检测结果。

图26为人源化抗体抑制HCC1806原位移植瘤生长的检测结果。

5 图27为嵌合型抗体TF-mAb-Ch和人源化抗体TF-mAb-H39在不同剂量下对HCC1806原位移植瘤生长的抑制活性。

图28为TF蛋白在高侵袭、高转移的Basal-like乳腺癌(尤其是三阴性乳腺癌)细胞株群中和Luminal亚型乳腺癌细胞株群中的表达结果对比。

10 图29为根据数据库E-TABM-157(European Molecular Biology Laboratory-European Bioinformatics Institute, EMBL-EBI)分析TF mRNA在高侵袭、高转移的Basal-like乳腺癌(尤其是三阴性乳腺癌)细胞株群中和Luminal亚型乳腺癌细胞株群中的表达结果对比。

图30为TF蛋白在不同胰腺癌细胞株中的表达检测结果。

图31为根据数据库GSE15471(Gene Expression Omnibus,GEO)分析,发现与正常组织相比, TF mRNA在胰腺癌组织中异常激活。

15

具体实施方式

本发明人通过广泛而深入的研究,经过大量筛选,意外地获得一种抗TF单克隆抗体TF-mAb-SC1,实验结果表明,该针对TF蛋白的单克隆抗体为IgG2b型抗体。所述的抗体能够高特异性地结合TF抗原,其具有很高的亲和力(ELISA测定其EC₅₀约为0.019 nM)并且,所述的抗体具有显著的抗肿瘤活性,而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。此外,基于该TF-mAb-SC1而获得的嵌合抗体、人源化抗体以及相应的ADC也具有优异的特性。在此基础上完成了本发明。

20

抗体

25 如本文所用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白,其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH),其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL),另一端有恒定区;轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对,轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

30 如本文所用,术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同,它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而,可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区,它们大致上呈β-折叠构型,由形成连接环的三个CDR相连,在某些情况下可形成部分β折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等,NIH Publ. No. 91-3242,卷I,647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合,但是它们表现出不同的效应功能,例如参与抗体的依赖于抗

35

体的细胞毒性。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为κ和λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列, 免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 其中一些还可进一步分成亚类(同种型), 如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为α、δ、ε、γ、和μ。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

一般, 抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述, 称为可变区域(CDR), 将该段间隔成4个框架区域(FR), 4个FR的氨基酸序列相对比较保守, 不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构, 通过其间的FR形成的β折叠在空间结构上相互靠近, 重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

本发明不仅包括完整的抗体, 还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此, 本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

在本发明中, 抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体, 例如嵌合的和人源化的单克隆抗体, 包括人的和非人的部分, 可以通过标准的 DNA 重组技术获得, 它们都是有用的抗体。嵌合抗体是一个分子, 其中不同的部分来自不同的动物种, 例如具有来自鼠的单克隆抗体的可变区, 和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体(见例如美国专利 4,816,567 和美国专利 4,816,397, 在此通过引用方式整体引入本文)。人源化的抗体是指来源于非人物种的抗体分子, 具有一个或多个来源于非人物种的互补决定区(CDRs)和来源于人免疫球蛋白分子的框架区域(见美国专利 5,585,089, 在此通过引用方式整体引入本文)。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以采用本领域熟知的 DNA 重组技术制备。

在本发明中, 抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。在本发明中, 本发明的抗体还包括其保守性变体, 指与本发明抗体的氨基酸序列相比, 有至多10个, 较佳地至多8个, 更佳地至多5个, 最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

表 A

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg

Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

抗TF的抗体

本发明提供一种针对TF的高特异性和高亲和力的抗体，其包括重链和轻链，所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列，所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

5 优选地，重链可变区(VH)氨基酸序列和轻链可变区(VL)氨基酸序列的各自CDR选自下组：

a1)SEQ ID No.:1;

a2)SEQ ID No.:2;

a3)SEQ ID No.:3;

10 a4)SEQ ID No.:4;

a5)SEQ ID No.:5;

a6)SEQ ID No.:6;

a7)上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列。

15 在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性的至少80%，较佳地至少85%，更佳地至少为90%，最佳地至少95%的氨基酸序列。

优选地，所述的抗体具有抑制TF相关信号通路的活性；具有抗凝血活性；具有抗FXa生成活性、或其组合。

20 本发明的抗体可以是双链或单链抗体，并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体，更优选为全人源化抗体。

本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段，如：Fab、Fab'、(Fab')₂或该领域内其他已知的抗体衍生物等，以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

25 其中，所述动物优选为哺乳动物，如鼠。

本发明抗体可以是靶向人TF的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

在本发明的一种优选实施例中，上述SEQ ID No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列，位于重链可变区(VH)的CDR区。

30 在本发明的一种优选实施例中，上述SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列，位于轻链可变区(VL)的CDR区。

在本发明的一种更优选实施例中，VH CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID

No.:1-SEQ ID No.:3中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列；VL CDR1、CDR2、CDR3分别独立地选自SEQ ID No.:4-SEQ ID No.:6中任意一种或几种序列、或它们经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有TF结合亲和力的序列。

5 本发明上述内容中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%，更优选为不超过35%，更优选为1-33%，更优选为5-30%，更优选为10-25%，更优选为15-20%。

本发明上述内容中，更优选地，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，可以是1-7个，更优选为1-5个，更优选为1-3个，更优选为1-2个。

10 在另一优选例中，所述靶向TF的抗体为TF-mAb-SC1(原名称为TF-mAb)。

在另一优选例中，所述抗体TF-mAb-SC1的重链可变区(VH)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:7所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体TF-mAb-SC1的轻链可变区(V-Kappa)氨基酸序列为如SEQ ID NO.: 8所示的氨基酸序列。

15

抗体的制备

本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术，比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外，还可将轻链和重链的编码序列融合在一起，形成单链抗体。

20 一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

25 目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于)：CHO-S、HEK-293细胞。

30 通常，在适合本发明抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

35 所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如，单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用Munson等, Anal. Biochem.,107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域

技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

5 抗体-药物偶联物(ADC)

本发明还提供了基于本发明抗体的抗体偶联药物(antibody-drug conjugate, ADC)。

典型地,所述抗体偶联药物包括所述抗体、以及效应分子,所述抗体与所述效应分子偶联,并优选为化学偶联。其中,所述效应分子优选为具有治疗活性的药物。此外,所述效应分子可以是毒蛋白、化疗药物、小分子药物或放射性核素中的一种或多种。

10 本发明抗体与所述效应分子之间可以通过偶联剂进行偶联。所述偶联剂的例子可以是非选择性偶联剂、利用羧基的偶联剂、肽链、利用二硫键的偶联剂中的任意一种或几种。所述非选择性偶联剂是指使效应分子和抗体形成共价键连接的化合物,如戊二醛等。所述利用羧基的偶联剂可以是顺乌头酸酐类偶联剂(如顺乌头酸酐)、酰基脲类偶联剂(偶联位点为酰基脲)中的任意一种或几种。

15 抗体上某些残基(如 Cys 或 Lys 等)用于与多种功能基团相连,其中包括成像试剂(例如发色基团和荧光基团),诊断试剂(例如 MRI 对比剂和放射性同位素),稳定剂(例如乙二醇聚合物)和治疗剂。抗体可以被偶联到功能剂以形成抗体-功能剂的偶联物。功能剂(例如药物,检测试剂,稳定剂)被偶联(共价连接)至抗体上。功能剂可以直接地、或者是通过接头间接地连接于抗体。

20 抗体可以偶联药物从而形成抗体药物偶联物(ADCs)。典型地,ADC 包含位于药物和抗体之间的接头。接头可以是可降解的或者是不可降解的接头。可降解的接头典型地在细胞内环境下容易降解,例如在目标位点处接头发生降解,从而使药物从抗体上释放出来。合适的可降解的接头包括,例如酶降解的接头,其中包括可以被细胞内蛋白酶(例如溶酶体蛋白酶或者内体蛋白酶)降解的含有肽基的接头,或者糖接头例如,可以被葡糖苷酸酶
25 降解的含葡糖苷酸的接头。肽基接头可以包括,例如二肽,例如缬氨酸-瓜氨酸,苯丙氨酸-赖氨酸或者缬氨酸-丙氨酸。其它合适的可降解的接头包括,例如,pH 敏感接头(例如 pH 小于 5.5 时水解的接头,例如脲接头)和在还原条件下会降解的接头(例如二硫键接头)。不可降解的接头典型地在抗体被蛋白酶水解的条件下释放药物。

30 连接到抗体之前,接头具有能够和某些氨基酸残基反应的活性反应基团,连接通过活性反应基团实现。巯基特异性的活性反应基团是优选的,并包括:例如马来酰亚胺类化合物,卤代酰胺(例如碘、溴或氯代的);卤代酯(例如碘、溴或氯代的);卤代甲基酮(例如碘、溴或氯代),苄基卤代物(例如碘、溴或氯代的);乙烯基砜,吡啶基二硫化物;汞衍生物例如 3,6-二-(汞甲基)二氧六环,而对离子是醋酸根、氯离子或者硝酸根;和聚亚甲基二甲基硫醚硫代磺酸盐。接头可以包括,例如,通过硫代丁二酰亚胺连接到抗体上的马来酰亚胺。

35 药物可以是任何细胞毒性,抑制细胞生长或者免疫抑制的药物。在实施方式中,接头连接抗体和药物,而药物具有可以和接头成键的功能性基团。例如,药物可以具有可以和连接物成键的氨基,羧基,巯基,羟基,或者酮基。在药物直接连接到接头的情况下,药物在连接到抗体之前,具有反应的活性基团。

有用的药物类别包括,例如,抗微管蛋白药物、DNA 小沟结合试剂、DNA 复制抑制

剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱等。特别有用的细胞毒性药物类的例子包括，例如，DNA 小沟结合试剂、DNA 烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如 DM1 和 DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs)，吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑啉烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))和长春花生物碱(vinca alkaloids)。

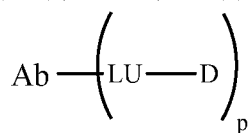
10 在本发明中，药物-接头可以用于在一个简单步骤中形成 ADC。在其它实施方式中，双功能连接物化合物可以用于在两步或多步方法中形成 ADC。例如，半胱氨酸残基在第一步骤中与接头的反应活性部分反应，并且在随后的步骤中，接头上的功能性基团与药物反应，从而形成 ADC。

15 通常，选择接头上功能性基团，以利于特异性地与药物部分上的合适的反应活性基团进行反应。作为非限制性的例子，基于叠氮化合物的部分可以用于特异性地与药物部分上的反应性炔基基团反应。药物通过叠氮和炔基之间的 1,3-偶极环加成，从而共价结合于接头。其它的有用的功能性基团包括，例如酮类和醛类(适合与酰肼类和烷氧基胺反应)，磷(适合与叠氮反应)；异氰酸酯和异硫氰酸酯(适合与胺类和醇类反应)；和活化的酯类，例如 N-羟基琥珀酰亚胺酯(适合与胺类和醇类反应)。这些和其它的连接策略，例如在《生物偶联技术》，第二版(Elsevier)中所描述的，是本领域技术人员所熟知的。本领域技术人员能够理解，对于药物部分和接头的选择性反应，当选择了一个互补对的反应活性功能基团时，该互补对的每一个成员既可以用于接头，也可以用于药物。

本发明还提供了制备 ADC 的方法，可进一步地包括：将抗体与药物-接头化合物，在足以形成抗体偶联物(ADC)的条件下进行结合。

25 在某些实施方式中，本发明方法包括：在足以形成抗体-接头偶联物的条件下，将抗体与双功能接头化合物进行结合。在这些实施方式中，本发明方法还进一步地包括：在足以将药物部分通过接头共价连接到抗体的条件下，将抗体接头偶联物与药物部分进行结合。

在一些实施方式中，抗体药物偶联物 ADC 如下分子式所示：



30

其中：

Ab 是抗体，

LU 是接头；

D 是药物；

35 而且下标 p 是选自 1 到 8 的值。

检测用途和试剂盒

本发明的抗体或其ADC可用于检测应用，例如用于检测样本，从而提供诊断信息。

本发明中，所采用的样本(样品)包括细胞、组织样本和活检标本。本发明使用的术语“活检”应包括本领域技术人员已知的所有种类的活检。因此本发明中使用的活检可以包括例如肿瘤的切除样本、通过内窥镜方法或器官的穿刺或针刺活检制备的组织样本。

5 本发明中使用的样本包括固定的或保存的细胞或组织样本。

本发明还提供了一种指含有本发明的抗体(或其片段)的试剂盒，在本发明的一个优选例中，所述的试剂盒还包括容器、使用说明书、缓冲剂等。在优选例中，本发明的抗体可以固定于检测板。

10 应用

本发明还提供了本发明抗体的用途，例如用于制备诊断制剂、或制备用于预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。所述TF相关的疾病包括肿瘤发生、生长和/或转移、血栓类相关疾病、炎症、代谢相关疾病等。

本发明抗体、ADC或CAR-T等的用途，包括(但不限于)：

15 (i)诊断、预防和/或治疗肿瘤发生、生长和/或转移，尤其是TF高表达的肿瘤。所述肿瘤包括(但不限于)：乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、胰腺癌、肺癌、恶性胶质瘤、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、结直肠癌、膀胱癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、宫颈癌、白血病、骨髓癌、血管肉瘤等；尤其是三阴性乳腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤和肺癌，更优选为三阴性乳腺癌和/或胰腺癌。

20 (ii)诊断、预防和/或治疗血栓类相关疾病。所述血栓类相关疾病包括(但不限于)：动脉粥样硬化、急性冠状动脉综合症、急性心肌梗塞、中风、高血压、深静脉血栓、肺栓塞、肾栓塞及动脉手术、冠状动脉旁路移植引起的血栓等。

25 (iii)诊断、预防和/或治疗炎症。所述炎症包括(但不限于)：风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、痛风、莱特尔综合征、牛皮癣性关节炎、感染性关节炎、结核性关节炎、病毒性关节炎、真菌性关节炎、肾小球性肾炎、全身性红斑狼疮、克罗恩病、溃疡性结肠炎、急性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病、特发性肺纤维化。

(iv)诊断、预防和/或治代谢相关疾病。所述代谢相关疾病包括(但不限于)：糖尿病、食源性肥胖和脂肪炎症等。

30 药物组合物

35 本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白或其ADC或相应的CAR-T细胞，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但不限于)：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明所述抗体也可以是由核苷酸序列在细胞内表达用于的细胞治疗，比如，所述抗体用于嵌合抗原受体T细胞免疫疗法(CAR-T)等。

本发明的药物组合物可直接用于结合TF蛋白分子，因而可用于预防和治疗肿瘤等疾

病。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量(如 0.001-99wt%,较佳地 0.01-90wt%，更佳地 0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体(或其偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无

菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约 1 微克/千克体重-约 5 毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的免疫偶联物施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约 10 微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约 50 毫克/千克体重，较佳地该剂量是约 10 微克/千克体重-约 20 毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围内的。

本发明的主要优点包括：

(a) 本发明抗体具有优异的生物活性和特异性，并具有很高的亲和力(ELISA测定其 EC_{50} 为0.01-0.03 nM)。此外，对细胞表面TF具有良好的结合亲和力，可用做靶向TF的抗体。

(b)本发明的人源化抗体不仅具有与鼠源抗体相当的活性，而且具有更低的免疫原性。

(c) 本发明抗体和ADC均具有显著的抗肿瘤活性，而对于哺乳动物本身没有可见的毒副作用。

(d) 本发明抗体和ADC不仅在多个肿瘤模型中有显著的治疗效应，而且还适用于其他与TF高表达有关的疾病，如血栓类疾病、代谢类疾病等。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如Sambrook等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。细胞株为常规的市售产品或购自ATCC，质粒均为市售产品。

实施例1 靶向人TF单克隆抗体的发现和制备

步骤①，杂交瘤细胞的制备：

首先将人TF蛋白的胞外区部分(UniProtKB/Swiss-Prot: P13726.1，从第34位到第251位氨基酸)免疫8周龄Balb/c雌性小鼠，TF胞外区蛋白的用量为100 μ g/只，以制备免疫脾细胞；适时的制备鼠骨髓瘤细胞(SP2/0)和饲养细胞以备融合之需。

待上述三种细胞准备完毕，通过PEG介导融合免疫脾细胞和SP2/0细胞，去除PEG，用含有饲养细胞的HAT完全培养基重悬，接种到96孔板中培养，通过ELISA法进行阳性孔筛选。最后再对阳性孔的细胞通过有限稀释法进行克隆化培养，通过ELISA或免疫荧光法筛选效价高、形态好、呈单克隆生长的细胞继续进行亚克隆筛选，直到连续三次筛选阳性克隆率全为100%，即可对该细胞株进行扩大培养和建库。

步骤②，靶向人TF鼠源单克隆抗体腹水的制备：

将步骤①中筛选出来的杂交瘤细胞扩大培养，小鼠适应性培养后腹腔注射降植烷(0.5mL/只)以为杂交瘤细胞生长提供有利环境，7-10d后，每只腹腔注射 10×10^6 的杂交瘤细胞，自第7天起，每天观察小鼠腹水产生状况和精神状态，采取腹水，离心去除油脂-80

步骤③，靶向人TF鼠源单克隆抗体的纯化：

将步骤②中冻存的腹水于冰上融化，经0.45 μ m滤膜过滤后，用PBS于4 $^{\circ}$ C透析过夜，最后通过FPLC技术对该抗体进行纯化并超滤浓缩至所需浓度，分装、-80 $^{\circ}$ C冻存备用。

步骤④，靶向人TF鼠源单克隆抗体的生物活性和靶向特异性确定：

经过初步筛选，选定约30个杂交瘤细胞进行二次有限稀释克隆筛选，然后在其中选定6个抗体，进行大量表达纯化，并在10 μ g/mL的浓度下利用流式细胞仪测定各个抗体对人乳腺癌细胞MDA-MB-231，人胰腺癌细胞BxPC-3和鼠黑色素瘤细胞B16-F10的亲和力。

结果如图1所示，测试的抗体可以特异性的靶向结合人源TF(MDA-MB-231和BxPC-3细胞)而不靶向结合鼠源TF(B16-F10细胞)，其中TF-mAb-SC1对人TF的亲和力比其他5个

用包被液将抗原(TF胞外区蛋白)稀释成0.5 μ g/mL，包被ELISA板，100 μ L/孔，4 $^{\circ}$ C，过夜。洗去多余抗原，用2%BSA于室温封闭2h，然后加入3倍梯度稀释的各单克隆抗体，100 μ L/孔，室温孵育2h；洗去未结合的抗体，加入合适浓度辣根过氧化物酶标记的抗鼠的二抗，100 μ L/孔，室温孵育1h。洗去未结合的二抗，加入TMB显色液，显色至适当颜色深浅，加入2M H₂SO₄，50 μ L/孔，终止显色反应，然后在450nm处测定其吸光度，并分析数据。如图2所示，TF-mAb-SC1对TF胞外区蛋白有很强的亲和性，EC₅₀约为0.019 nM。

同时，铺 3×10^5 个胰腺癌细胞BxPC-3于12孔板中，12小时之后，用无菌PBS洗涤细胞3次，然后加入无血清培养基于37 $^{\circ}$ C，5%CO₂培养箱饥饿4h，随后将各单克隆抗体按3倍梯度稀释，并与BxPC-3于培养箱中孵育1h，随后用25nM FVIIa激活BxPC-3胞内PAR2信号通路，37 $^{\circ}$ C作用15min后，用预冷的PBS洗涤细胞一次，并于冰上收集细胞蛋白并通过Western blot 鉴定TF-mAb-SC1对下游MAPK/ERK的磷酸化水平的影响，只做FVIIa刺激，未与单克隆抗体孵育的细胞作为阳性对照。仅含溶剂但未加抗体的，标记为Veh。通过Western blot 测定这6个抗体对BxPC-3胞内信号通路TF-PAR2的影响。

结果如图3所示，只有TF-mAb-SC1可以显著抑制下游MAPK/ERK的磷酸化水平并呈一定的剂量依赖性。

由于TF-mAb-SC1表现出非常高的特异性、非常高的亲和力以及对MAPK/ERK的磷酸化水平的显著抑制作用，故被选定用于测序以及后续研究。

采用常规测序，并通过Kabat数据库分析，得到以下序列信息：

重链可变区的CDR氨基酸序列为：

SEQ ID No.:1: SYWMN;

SEQ ID No.:2: MIYPADSETRLNQQKFKD;

SEQ ID No.:3: EDYGSSDY。

完整的VH氨基酸序列如SEQ ID NO.: 7所示。

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFISYWMNWWKQRPGQGLEWIGMIYPA

DSETRLNQQFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCAREDYGSSDYWGQG
TTLTVSS (SEQ ID NO.: 7)

轻链可变区的CDR氨基酸序列为:

- 5 SEQ ID No.:4: SASSSVSYMN;
SEQ ID No.:5: GISNLAS;
SEQ ID No.:6: QQKSSFPWT。

完整的VL氨基酸序列如SEQ ID NO.: 8所示:

- 10 EILLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSSVSYMNWYLQKPGSSPKIWIYGISNLASGVPA
RFSGSGSGTFSFTINSMETEDVATYYCQQKSSFPWTFGGGKLEIK(SEQ ID NO.: 8)

实施例2 人-鼠嵌合抗体的制备

在已获得的活性高、特异性强的鼠源TF-mAb-SC1的基础上, 构建人-鼠嵌合抗体。

通过相关数据库分析, 确定重链可变区的CDR氨基酸序列为:

- 15 SEQ ID No.:18: MIYPXDSETRLNXXFKD(X选自A、D、E、Q、Y中的任意一种)
SEQ ID No.:19: GYSFXSYWMN(X选自A、I、Y、Q、W中的任意一种)
SEQ ID No.:20: AREDYGXSDY(X选自S、P、G、D、M、N中的任意一种)。

通过相关数据库分析, 确定轻链可变区的CDR氨基酸序列为:

- 20 SEQ ID No.:21: QQXSSFXTWT(X选自S、P、K、G、H中的任意一种);
SEQ ID No.:22: SASXVSYMN(X选自A、P、D、S中的任意一种);
SEQ ID No.:23: GXSNLAS(X选自P、D、I、S中的任意一种)。

设计引物在重链可变区引入EcoR I和Nhe I, 在轻链可变区引入Age I和BsiW I限制性内切酶酶切位点, 然后将上述所获得抗体重链和轻链的可变区序列分别克隆入含有人IgG1重链恒定区和Kappa链恒定区的载体, 经鉴定无误后(图4A为重链酶切鉴定结果, 图4B为轻链酶切鉴定结果, 其中样品1为对应的重链/轻链空白载体, 样品2为克隆入重链/轻链可变区的载体, 3和4为单酶切后的样品, 5为双酶切后的样品), 利用转染技术和哺乳动物表达系统(CHO-S或HEK-293细胞)将构建的嵌合型抗体表达、纯化, 所获得的人-鼠嵌合型抗体, 命名为TF-mAb-Ch。

30 实施例3 TF-mAb-SC1对TF-阳性肿瘤细胞的结合亲和力(Cell binding affinity)的测定

本实验以细胞表面TF高表达的三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231、胰腺癌细胞BxPC-3、恶性胶质瘤细胞U87MG和非小细胞肺癌细胞H1975作为靶细胞, 将100 μ L按照3倍梯度从333.33nM稀释到0.15nM的TF-mAb-SC1作为一抗, 分别与悬浮于100 μ L RPMI-1640无血清培养基中的 3×10^5 个MDA-MB-231或BxPC-3混匀, 或将100 μ L按照3倍梯度从66.67nM
35 稀释到0.03nM的TF-mAb-SC1作为一抗与悬浮于100 μ L MEM无血清培养基中的 3×10^5 个U87MG混匀, 或将100 μ L 的33.33nM和3.33nM的TF-mAb-SC1作为一抗与悬浮于100 μ L RPMI-1640无血清培养基中的 3×10^5 个H1975混匀, 然后在4 $^{\circ}$ C孵育1h, PBS洗涤细胞两次以去除未结合的一抗, 再将靶细胞与200 μ L, 2 μ g/mL, PE标记的二抗4 $^{\circ}$ C孵育30min, PBS洗涤细胞两次以去除未结合的二抗, 最后将细胞重悬在400 μ L PBS中, 通过流式细胞

仪测定TF-mAb-SC1对相应细胞表面TF的结合亲和力(Binding affinity)。

如图5所示, TF-mAb-SC1对BxPC-3、MDA-MB-231和U87MG均有较好的结合亲和力, EC_{50} 分别为2.6nM(图5A)、2.5nM(图5B)和1.6nM(图5C), 图5D显示TF-mAb-SC1对H1975也有较好的结合亲和力。

5 这说明, 本实施例单克隆抗体能够以人源TF为作用靶点。

实施例4 TF-mAb-SC1对胞内信号通路TF-PAR2的影响

10 铺 3×10^5 个胰腺癌细胞BxPC-3于12孔板中, 12小时之后, 用无菌PBS洗涤细胞3次, 然后加入无血清培养基于 37°C , 5% CO_2 培养箱饥饿4h, 随后将TF-mAb-SC1按3倍梯度从100nM稀释到1.2nM, 并与BxPC-3于培养箱中孵育1 h, 随后用25nM FVIIa激活BxPC-3胞内PAR2信号通路, 37°C 作用15min后, 用预冷的PBS洗涤细胞一次, 并于冰上收集细胞蛋白并通过Western blot 鉴定TF-mAb-SC1对下游MAPK/ERK的磷酸化水平的影响, 只做FVIIa刺激, 未与TF-mAb-SC1孵育的细胞作为阳性对照。

15 检测结果如图6所示, TF-mAb-SC1显著抑制下游MAPK/ERK的磷酸化水平并呈一定的剂量依赖性。

实施例5 TF-mAb-SC1抗凝血活性测定

20 将100nM的TF-mAb-SC1倍比稀释到1.5625nM(终体积50 μL)并分别与悬浮于50 μL 含有5mM CaCl_2 的Hanks平衡盐溶液(Hanks Balanced Salt Solution, HBSS)中的 3×10^4 个MDA-MB-231和BxPC-3, 室温孵育15min, 然后加入50 μL 柠檬酸盐人血浆, 迅速混匀, 并在接下来2h内每隔15s于405nm处测定吸光值, 以计算对细胞表面TF起始凝血的抗凝作用。

25 图7中纵坐标代表凝血速率的时间, 横坐标代表TF-mAb-SC1的浓度, 以BxPC-3(图7A)和MDA-MB-231(图7B)细胞表面TF作为TF来源。实验结果均显示TF-mAb-SC1浓度 $\leq 12.5\text{nM}$ 时便具有显著抗凝血活性。

实施例6 TF-mAb-SC1抗FXa生成活性的测定

30 将100nM的TF-mAb-SC1倍比稀释到1.5625nM(终体积50 μL)并分别与悬浮于50 μL HBSS(含有3nM FVIIa)中的 1.5×10^4 个BxPC-3和MDA-MB-231细胞于室温振荡孵育20min, 然后加入50 μL FX(终浓度50nM)来起始反应, 5min后加入25 μL 1M的EDTA终止反应; 随后加入25 μL 3mM的S2765, 迅速混匀并在接下来60min内每隔15s测定其动力学反应曲线, 从而计算抗FXa的生成活性。

35 如图8所示, TF-mAb-SC1显示出较好的抗FXa生成活性, IC_{50} 分别为9.0nM(图8A)和6.4nM(图8B)。

实施例7 TF-mAb-SC1对体内肿瘤生长抑制活性的评定

随机将裸鼠分为两组, 每组10只, 首先将肿瘤细胞(1×10^7 的BxPC-3或 5×10^6 的U87MG或 2.5×10^6 的HCC1806)与100 μg 的TF-mAb-SC1混合, 室温孵育30min后, 共同接种到6周龄免疫缺陷型雌性小鼠(Balb/c裸鼠)背部或乳垫, 观察对BxPC-3皮下瘤生长的抑制作

用,另一组小鼠使用正常小鼠IgG(简称小鼠IgG)作为对照。定期测量裸鼠体重及肿瘤大小,绘制肿瘤生长曲线,评定活性。

如图9所示,相比于小鼠IgG,TF-mAb-SC1对BxPC-3皮下瘤生长抑制效果更为显著,抑制率最高可达80%,实验结束时的肿瘤生长抑制率为55%。

5 如图10所示,相比于小鼠IgG,TF-mAb-SC1对U87MG皮下瘤生长抑制效果更为显著,抑制率最高可达60%,实验结束时的肿瘤生长抑制率为36%。

如图11所示,相比于小鼠IgG,TF-mAb-SC1可以显著抑制HCC1806原位移植瘤生长,抑制率最高可达>90%,实验结束时的肿瘤生长抑制率高达83%。

10 实施例8 TF-mAb-SC1显著抑制肿瘤基质胶原堆积

收集来自实施例7的BxPC-3肿瘤,4%中性甲醛固定后,石蜡包埋切片,常规脱蜡至水并进行Masson染色。对经染色的每个样本在100×的放大倍数下(图例为100μm),采集5到10个视野并进行统计分析。

15 结果如图12所示,TF-mAb-SC1可以显著抑制肿瘤基质胶原的堆积(蓝色区域),从而导致肿瘤的生长抑制,右图为利用Image-pro plus进行统计分析的结果。

实施例9 TF-mAb-SC1显著减小肿瘤血管管腔面积

20 收集来自实施例7中的BxPC-3肿瘤,4%中性甲醛固定后,石蜡包埋切片,常规脱蜡至水并进行CD31免疫组化染色。对经免疫组化染色的每个样本在200×的放大倍数下(图例为50μm),采集5到10个视野并进行统计分析。

结果如图13所示,TF-mAb-SC1可以显著减小肿瘤血管管腔面积,右图为血管管腔面积的统计结果。

实施例10 TF-mAb-SC1 抗肿瘤细胞迁移活性测定

25 利用transwell小室系统在体外评价TF-mAb对肿瘤细胞迁移水平的影响:将 1×10^5 个MDA-MB-231或 8×10^4 个BxPC-3细胞分别与一定浓度的TF-mAb-SC1(100nM,33.3nM和11.1nM)或小鼠IgG(图中简称IgG)混合于200μL的无血清培养基中,加到上层小室中,小室下层加入600μL含10%FBS的完全培养基,于37℃,5%CO₂培养箱中培养,8h后,用湿棉签擦去小室膜上表面细胞,膜下表面细胞用95%乙醇固定30min后,于0.2%的结晶紫中染色30min,蒸馏水洗去多余的结晶紫,室温晾干后,在显微镜下,随机选取5个代表性的视野,分析统计迁移到小室膜下表面的细胞数。本实验同时以TF基因敲除的细胞(sh-TF)和相应载体对照细胞(sh-NT)进一步确认TF-mAb-SC1的抗肿瘤细胞迁移活性。

如图14所示,敲除TF基因,显著抑制MDA-MB-231(图14A)和BxPC-3(图14B)细胞的迁移。

35 如图15所示,TF-mAb-SC1可以显著的抑制MDA-MB-231(图15A)和BxPC-3(图15B)细胞的迁移水平,并呈浓度依赖性。

上述结果提示,通过抑制TF,可以有效抑制肿瘤细胞的迁移。

实施例11 TF-mAb-SC1显著抑制肿瘤细胞的体内血行转移

利用实验性血行转移模型在体内评价TF-mAb-SC1对肿瘤细胞迁移水平的影响：将
2×10⁶荧光素酶标记的MDA-MB-231细胞(MDA-MB-231-luc)与100μg的TF-mAb-SC1或
5 小鼠IgG混合于200μL PBS中，冰上孵育20min后，通过尾静脉缓慢注射到6周龄的Balb/c
雌性裸鼠体内；4h后，麻醉裸鼠，将荧光素钾盐PBS溶液，按照150mg/kg的剂量，腹腔
注射到裸鼠体内，6min后于小动物活体成像仪中(IVIS SPECTRUM)曝光1min，测定荧光
强度，统计分析，每组5只裸鼠。

如图16所示，敲除TF基因可以显著抑制MDA-MB-231-luc的血行性迁移能力。同样，
10 如图17所示，TF-mAb-SC1也可以显著的抑制MDA-MB-231-luc细胞的血行性迁移能力，
右图为迁移到肺细胞荧光强度的统计结果。

将3×10⁶的MDA-MB-231细胞与100μg的TF-mAb-SC1或IgG混合于200μL PBS中，冰
上孵育20min后，通过尾静脉缓慢注射到6周龄的雌性SCID Beige小鼠体内，6周后，处死
小鼠，取出肺经Bouin's液固定后，拍照并称重，并记录每个肺上转移灶的个数，每组7个
15 小鼠。

结果如图18所示，TF-mAb-SC1显著抑制小鼠肺上肿瘤转移灶的形成和生长。

实施例12 TF-mAb-SC1 可以迅速高效的被细胞内吞(Internalization)至溶酶体

铺50%密度MDA-MB-231细胞于激光共聚焦专用培养皿中，约16h后，加入10μg/mL
20 的TF-mAb-SC1分别于37℃或4℃孵育1h，用预热的PBS洗涤三次去除未与细胞结合的抗
体，之后用4%的多聚甲醛于室温固定30min。PBS洗涤三次后，37℃孵育Lamp-2(兔抗人)
抗体1h，以标记细胞溶酶体的位置，PBS洗去未结合的抗体，37℃孵育Alexa Fluor 594
标记的驴抗鼠和Alexa Fluor 488标记的驴抗兔二抗30 min。洗去未结合抗体，用DAPI染
色以标记细胞核位置，之后用激光共聚焦显微镜观察抗体的细胞内吞情况。

25 如图19所示，TF-mAb-SC1可以被细胞内吞至溶酶体。

实施例13 TF-mAb-Ch的生物活性测定：

实验方法参照实施例1，步骤④。

结果如图20所示，TF-mAb-Ch对TF胞外区蛋白有很强的亲和性，EC₅₀约为0.011nM。

30

实施例14 TF-mAb-Ch对TF-阳性肿瘤细胞的结合亲和力(Cell binding affinity)的测定

参照实施例3中的实验方法。

结果表明，TF-mAb-Ch对MDA-MB-231(图21A)和HCC1806(图21B)细胞均有较好的
结合亲和力，EC₅₀为分别为2.3nM和2.1nM。

35

实施例15 TF-mAb-Ch对胞内信号通路TF-PAR2的影响

实验方法参照实施例4。

结果如图22所示，TF-mAb-Ch浓度依赖性的抑制FVIIa诱导的MAPK/ERK的磷酸化水
平。

实施例16 TF-mAb-Ch 可以迅速高效的被细胞内吞(**Internalization**)至溶酶体
实验方法参照实施例12。

结果如图23所示, TF-mAb-Ch可以被细胞内吞至溶酶体。

5 上述实验提示, 由于本发明TF-mAb抗体易于被内吞, 因此适合被开发成抗体偶联药物(Antibody-drug conjugate, ADC)并应用于TF高表达的相关肿瘤的治疗。

实施例17 TF-mAb-SC1的人源化及活性测定

参照TF-mAb-SC1的抗体重链可变区序列(SEQ ID NO.: 7)和轻链可变区序列(SEQ ID NO.: 8), 在Germline数据库中选取与其非CDR区匹配最好的人源化模板。然后将鼠源抗体TF-mAb-SC1的CDR区移植到所选择的人源化模板上, 替换人源模板的CDR区, 再与IgG1/kappa恒定区重组, 同时以鼠源抗体的三维结构为基础, 对包埋残基、与CDR区有直接相互作用的残基, 以及对VL和VH的构象有重要影响的残基进行回复突变, 得到5个人源化重链的可变区(SEQ ID NO.: 9, SEQ ID NO.: 10, SEQ ID NO.: 11, SEQ ID NO.: 12, SEQ ID NO.: 13)及4个人源化轻链的可变区(SEQ ID NO.: 14, SEQ ID NO.: 15, SEQ ID NO.: 16, SEQ ID NO.: 17)。

SEQ ID NO.:	序列	可变区
9	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGMIYPADSETRLNQKFKDQATLSVDKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
10	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKG LEWMGMIYPADSETRLNQKFKDKATLSVDKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
11	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVKQMPGKG LEWMGMIYPADSETRLNQKFKDKATLSVDKSISTAYLQWSSLKAS DTAMYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
12	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFISYWMNWVRQAPGQG LEWIGMIYPADSETRLNQKFKDRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
13	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYSFISYWMNWVRQAPGQG LEWIGMIYPADSETRLNQKFKDRAVLSVDKSVSTAYLQICSLKAED TAVYYCAREDYGSSDYWGQGTTVTVSS	VH
14	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQAPRIWI YGISNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQKSSFPW TFGGGTKVEIK	VL
15	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMNWYQQKPGQSPRIWI YGISNLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQKSSFP	VL

	WTFGGGTKVEIK	
16	DIQLTQSPSSLASVGDRTITCSASSSVSYMNWYQQKPGKSPKIWI YGISNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQKSSFPW TFGGGTKVEIK	VL
17	EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSVSYMNWYQQKPDQSPKIWI YGISNLASGVPSRFSGSGSGTDFLTINSLEAEDAATYYCQQKSSFP WTFGGGTKVEIK	VL

基于所述改造的VH和VL，分别组合表达这些人源化的重链及轻链，最终共得到的20个人源化抗体，即TF-mAb-H29至TF-mAb-H48。各抗体相应的重链和轻链组合如下表所示：

5

序列编号	SEQ ID NO.:9	SEQ ID NO.:10	SEQ ID NO.:11	SEQ ID NO.:12	SEQ ID NO.:13
SEQ ID NO.:14	TF-mAb-H29	TF-mAb-H30	TF-mAb-H31	TF-mAb-H32	TF-mAb-H33
SEQ ID NO.:15	TF-mAb-H34	TF-mAb-H35	TF-mAb-H36	TF-mAb-H37	TF-mAb-H38
SEQ ID NO.:16	TF-mAb-H39	TF-mAb-H40	TF-mAb-H41	TF-mAb-H42	TF-mAb-H43
SEQ ID NO.:17	TF-mAb-H44	TF-mAb-H45	TF-mAb-H46	TF-mAb-H47	TF-mAb-H48

首先通过ELISA结合实验测定这20个人源化抗体对TF胞外区蛋白的亲合活性(实验方法参照实施例1，步骤④)，结果如表1所示。其中TF-mAb-H39和TF-mAb-H44对TF胞外区蛋白的结合亲和力曲线分别如图24A和图24B所示。

10

表1 人源化抗体对TF胞外区蛋白的结合亲和力

抗体	EC ₅₀ (nM)	抗体	EC ₅₀ (nM)
TF-mAb-Ch	0.0100	TF-mAb-H39	0.0125
TF-mAb-H29	0.0178	TF-mAb-H40	0.0131
TF-mAb-H30	0.0147	TF-mAb-H41	0.0134
TF-mAb-H31	0.0145	TF-mAb-H42	0.0128
TF-mAb-H32	0.0168	TF-mAb-H43	0.0116
TF-mAb-H33	0.0189	TF-mAb-H44	0.0120
TF-mAb-H34	0.0154	TF-mAb-H45	0.0138
TF-mAb-H35	0.0105	TF-mAb-H46	0.0119
TF-mAb-H36	0.0234	TF-mAb-H47	0.0130
TF-mAb-H37	0.0173	TF-mAb-H48	0.0153
TF-mAb-H38	0.0178	IgG(阴性对照)	>6.67

通过流式细胞仪测定这20个人源化抗体分别在10µg/mL和1µg/mL浓度下，对MDA-MB-231细胞的结合亲和力，实验方法参照实施例3，结果如表2所示。

15

表2 人源化抗体对MDA-MB-231的结合亲和力;

抗体	MFI	
	10µg/mL	1µg/mL
TF-mAb-Ch	3544	3369
TF-mAb-H29	3584	2958
TF-mAb-H30	3240	2930
TF-mAb-H31	3468	3079
TF-mAb-H32	3009	2400
TF-mAb-H33	2837	2420
TF-mAb-H34	3272	2462
TF-mAb-H35	3015	2931
TF-mAb-H36	3094	3037
TF-mAb-H37	2989	2459
TF-mAb-H38	3152	2871
TF-mAb-H39	3383	3177
TF-mAb-H40	3311	3182
TF-mAb-H41	3613	3004
TF-mAb-H42	3350	2968
TF-mAb-H43	3302	2818
TF-mAb-H44	3428	3195
TF-mAb-H45	3478	3101
TF-mAb-H46	3410	3115
TF-mAb-H47	3151	2995
TF-mAb-H48	2903	2611
IgG(阴性对照)	0	0

还测定了9个人源化抗体对胞内信号通路TF-PAR2的影响，实验方法参照实施例4。

实验结果如图25所示，各人源化抗体不同程度的抑制FVIIa诱导的MAPK/ERK的磷酸化水平，并呈浓度依赖性。

5 此外，还测定6个人源化抗体(各100µg)分别与肿瘤细胞HCC1806共同孵育后，原位接种至裸鼠乳垫，对肿瘤的生长抑制作用，实验方法参照实施例7。

此外，还测定6个人源化抗体(各100µg)分别与肿瘤细胞HCC1806共同孵育后，原位接种至裸鼠乳垫，对肿瘤的生长抑制作用，实验方法参照实施例7。

10 实验结果如图26所示，所有人源化抗体均表现出显著抑制肿瘤生长活性，其中TF-mAb-H35、TF-mAb-H39、TF-mAb-H40、TF-mAb-H44和TF-mAb-H45表现出优异的抑制肿瘤生长活性。

同时，还测定人源化抗体TF-mAb-H39和嵌合型抗体TF-mAb-Ch在不同剂量下(100µg, 30µg和10µg)分别与肿瘤细胞HCC1806孵育后，接种至裸鼠乳垫，对HCC1806原位移植瘤的生长抑制作用，实验方法参照实施例7。实验结果如图27所示，结果表明人源化抗体TF-mAb-H39抑制肿瘤生长活性与嵌合型抗体TF-mAb-Ch活性相当。

实施例18 TF在基底样和三阴性乳腺中高度异常激活

首先针对多种不同组织来源的肿瘤细胞株，制备细胞总蛋白，精确定量后，通过Western blot检测TF蛋白的表达水平。

结果显示，TF蛋白在一些高侵袭、高转移的基底样(Basal-like或Basal A/B)和三阴性
5 乳腺癌(如图28)细胞株呈高度异常激活表达，而在相对恶性程度较低的管腔型(Luminal)
乳腺癌细胞株中仅少数高表达。

然后，对数据库E-TABM-157 (European Molecular Biology Laboratory-European
Bioinformatics Institute, EMBL-EBI)中乳腺癌细胞株的TF mRNA表达水平进行分析。结
果表明，高侵袭、高转移的Basal A/B和三阴性乳腺癌(尤其是三阴性乳腺癌)细胞株群中TF
10 mRNA的表达水平普遍高于Luminal-亚型乳腺癌细胞株群且具有统计学意义(图29)。因此，
本发明以TF为靶点的抗体，在诊断、预防和治疗三阴性乳腺癌的应用中具有更为显著的效果。

实施例19 TF在胰腺癌中高度异常激活

15 首先针对多种不同组织来源的肿瘤细胞株，制备细胞总蛋白，精确定量后，通过
Western blot检测TF蛋白的表达水平。结果显示，TF蛋白在高侵袭、高转移的胰腺癌(如
图30)细胞株普遍呈高度异常激活表达。

然后，对数据库GSE15471 (Gene Expression Omnibus, GEO)中胰腺癌细胞株的TF
mRNA表达水平进行分析，结果表明，TF mRNA在胰腺肿瘤组织中普遍呈较高水平的表
20 达(图31)。因此，本发明以TF为靶点的抗体，在诊断、预防和治疗胰腺癌的应用中具有更
为显著的效果。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用
作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以
25 对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范
围。

权 利 要 求

1. 一种抗体的重链可变区，其特征在于，所述的重链可变区包括以下三个互补决定区 CDR：

- 5 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1，
 SEQ ID NO:2 所示的 CDR2，和
 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留 TF 结合亲和力的衍生序列。

- 10 2. 一种抗体的重链，其特征在于，所述的重链具有如权利要求 1 所述的重链可变区。

3. 一种抗体的轻链可变区，其特征在于，所述轻链可变区具有选自下组的互补决定区 CDR：

- 15 SEQ ID NO:4 所示的 CDR1'，
 SEQ ID NO:5 所示的 CDR2'，和
 SEQ ID NO:6 所示的 CDR3'；

上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的具有 TF 结合亲和力的衍生序列。

- 20 4. 一种抗体的轻链，其特征在于，所述的轻链具有如权利要求 3 所述的轻链可变区。

5. 一种抗体，其特征在于，所述抗体具有：

- (1) 如权利要求 1 所述的重链可变区；和/或
(2) 如权利要求 3 所述的轻链可变区；

25 或者，所述抗体具有：如权利要求 2 所述的重链；和/或如权利要求 4 所述的轻链。

6. 根据权利要求 5 所述的抗体，其特征在于，所述抗体选自：动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体、或其组合。

7. 根据权利要求 5 中所述的抗体，其特征在于，所述抗体的重链可变区序列选自下组：SEQ ID NO.: 7、9、10、11、12、或 13；和/或

30 所述的抗体的轻链可变区序列选自下组：SEQ ID NO.:8、14、15、16、或 17。

8. 根据权利要求 5 所述的抗体，其特征在于，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为 1-7 个。

9. 根据权利要求 5 所述的抗体，其特征在于，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代的至少一个氨基酸序列为同源性为至少 80%的氨基酸序列。

35 10. 一种权利要求 5 所述抗体的应用，其特征在于，所述抗体用于(a)制备诊断试剂；

和/或(b)制备预防和/或治疗TF相关的疾病的药物。

11. 根据权利要求10所述的应用, 其特征在于, 所述TF相关的疾病选自下组:
肿瘤的发生、生长和/或转移;

血栓类相关疾病;

5 炎症; 和

代谢相关疾病。

12. 根据权利要求11所述的应用, 其特征在于, 所述肿瘤为TF高表达的肿瘤。

13. 一种重组蛋白, 其特征在于, 所述的重组蛋白具有:

10 (i) 如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3
所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5所述的抗体; 以及
(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

14. 一种多核苷酸, 其特征在于, 它编码选自下组的多肽:

15 (1) 如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3
所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5所述的抗体; 或
(2) 如权利要求13所述的重组蛋白。

15. 一种载体, 其特征在于, 它含有本发明权利要求14所述的多核苷酸。

16. 一种遗传工程化的宿主细胞, 其特征在于, 它含有权利要求15所述的载体或
基因组中整合有权利要求14所述的多核苷酸。

17. 一种抗体药物偶联物, 其特征在于, 该抗体药物偶联物含有:

20 (a) 抗体部分, 所述抗体部分选自下组: 如权利要求1所述的重链可变区、如权利
要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、如
权利要求5所述的抗体、或其组合; 和

(b) 与所述抗体部分偶联的偶联部分, 所述偶联部分选自下组: 可检测标记物、药物、
毒素、细胞因子、放射性核素、酶、或其组合。

25 18. 一种免疫细胞, 其特征在于, 所述免疫细胞表达或在细胞膜外暴露有权利要
求5所述的抗体。

19. 一种药物组合物, 其特征在于, 它含有:

30 (i) 活性成分, 所述活性成分选自下组: 如权利要求1所述的重链可变区、如权利
要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、
或如权利要求5所述的抗体、如权利要求13所述的重组蛋白、如权利要求17所述的
抗体药物偶联物、权利要求18所述的免疫细胞、或其组合; 以及

(ii) 药学上可接受的载体。

35 20. 一种活性成分的用途, 其特征在于, 所述活性成分选自下组: 如权利要求1所
述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利
要求4所述的轻链、或如权利要求5所述的抗体、如权利要求13所述的重组蛋白、

或如权利要求 17 所述的抗体药物偶联物、权利要求 18 所述的免疫细胞、或其组合，其中所述活性成分被用于制备药剂、试剂、检测板或试剂盒。

21. 一种体外检测样品中 TF 蛋白的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

(1) 在体外，将所述样品与权利要求 5 所述的抗体接触；

5 (2) 检测是否形成抗原-抗体复合物，其中形成复合物就表示样品中存在 TF 蛋白。

22. 一种检测板，其特征在于，所述的检测板包括：基片(支撑板)和测试条，所述的测试条含有权利要求 5 所述的抗体或权利要求 17 所述的免疫偶联物。

23. 一种重组多肽的制备方法，该方法包括：

(a) 在适合表达的条件下，培养权利要求 16 所述的宿主细胞；

10 (b) 从培养物中分离出重组多肽，所述的重组多肽是权利要求 5 所述的抗体或权利要求 13 所述的重组蛋白。

24. 一种治疗肿瘤、血栓类疾病、炎症性疾病和/或代谢类疾病的方法，其特征在于，包括：使用如权利要求5所述抗体、所述抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的CAR-T细胞。

15 25. 一种抗 TF 抗体，其特征在于，该抗体对人 TF 蛋白的亲力的 EC_{50} 为 0.01-0.03nM。

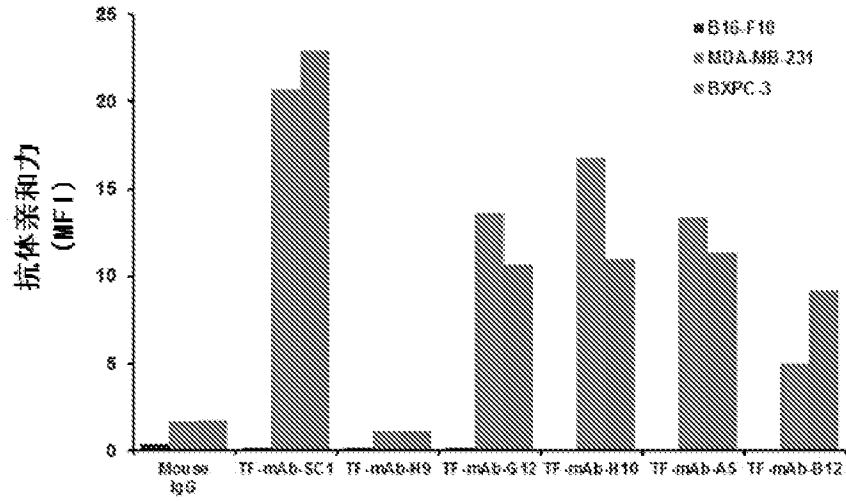


图 1

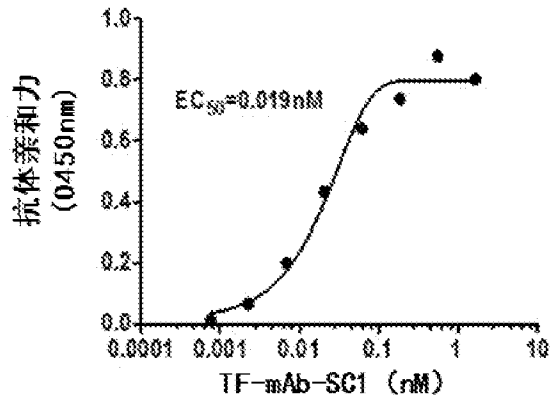


图 2

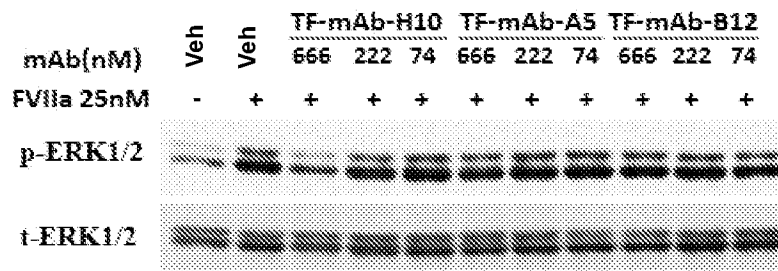


图 3

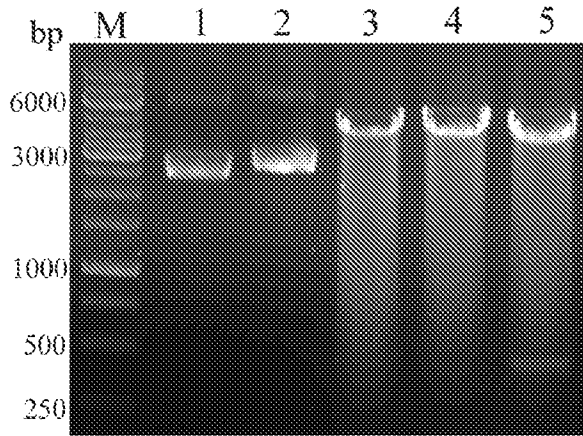


图 4A

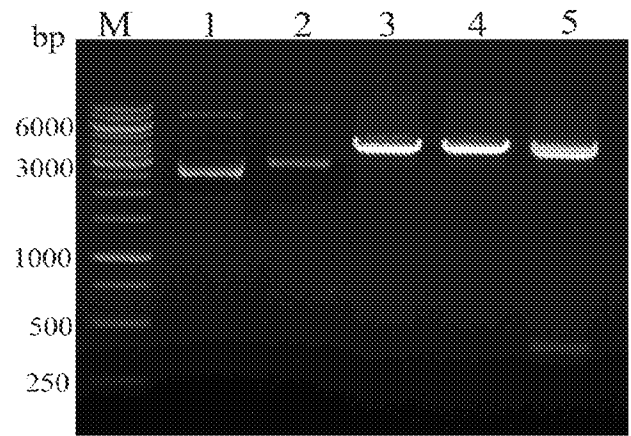


图 4B

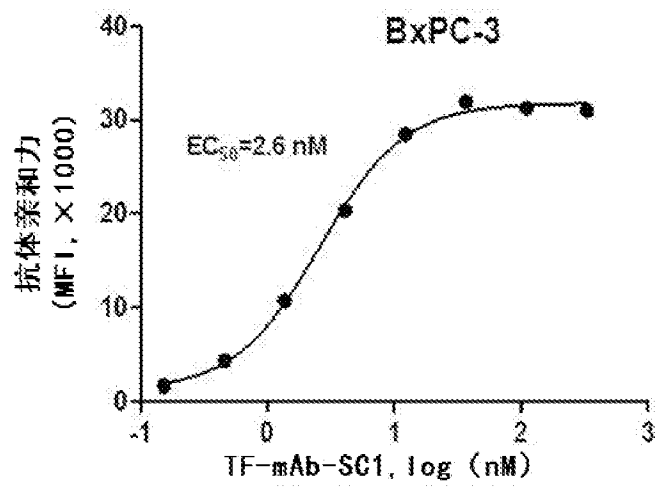


图 5A

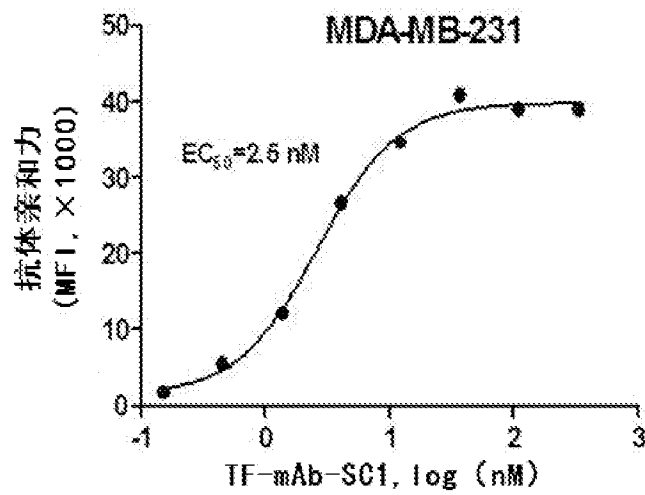


图 5B

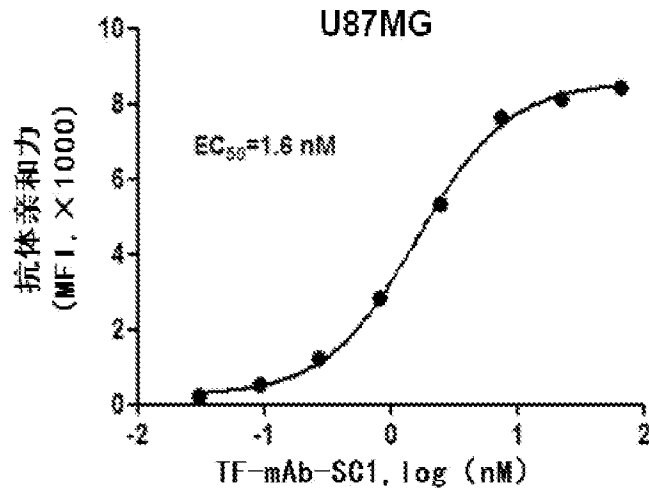


图 5C

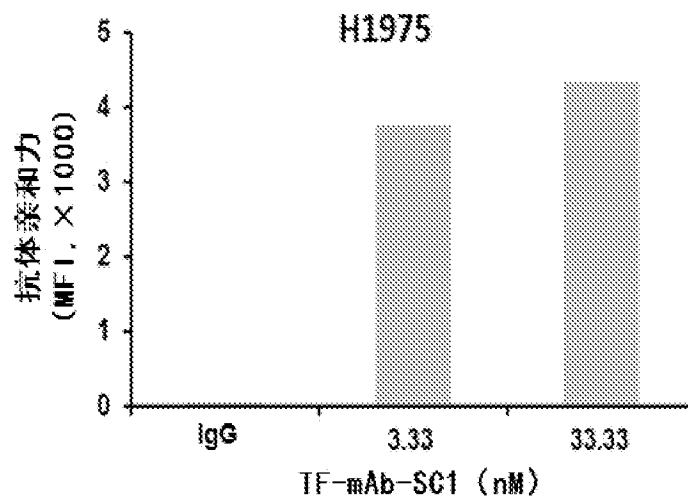


图 5D

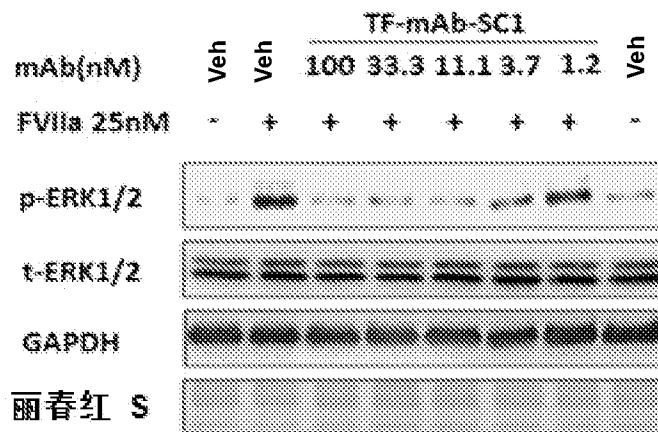


图 6

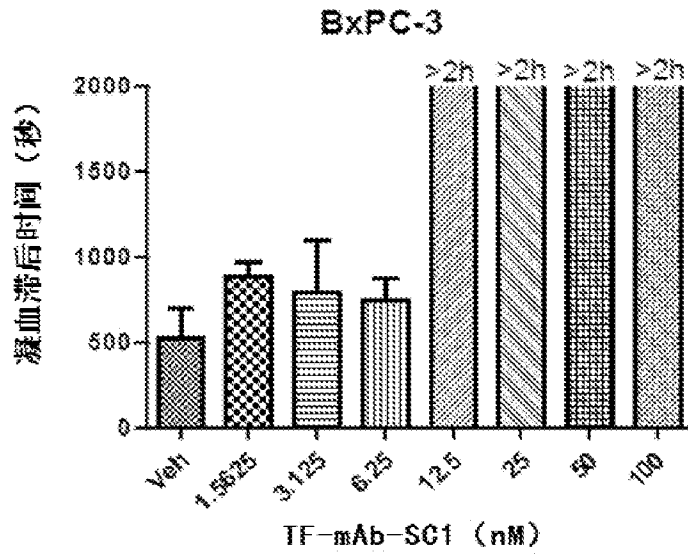


图 7A

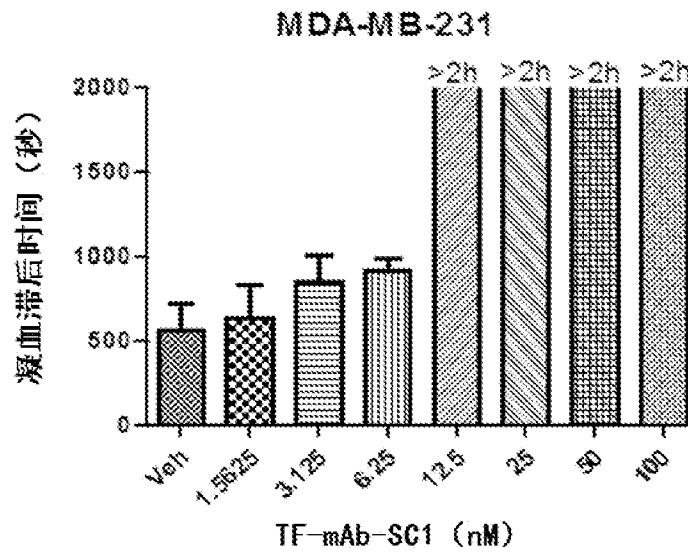


图 7B

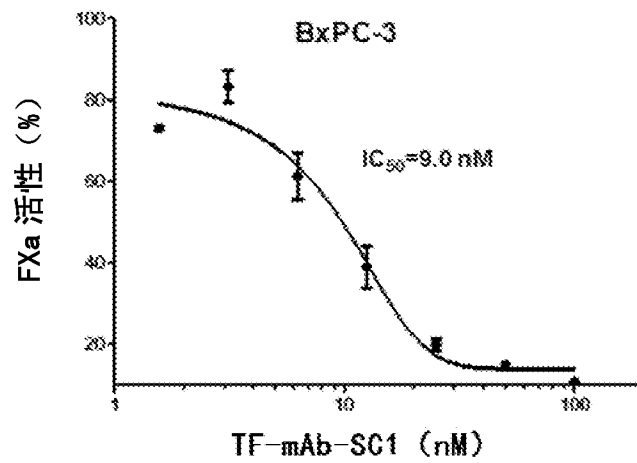


图 8A

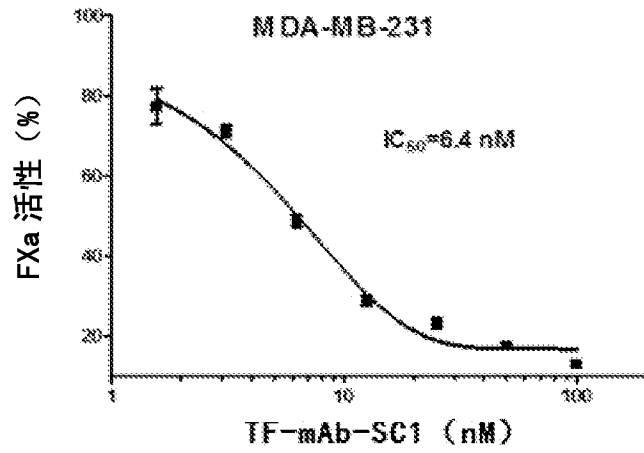


图 8B

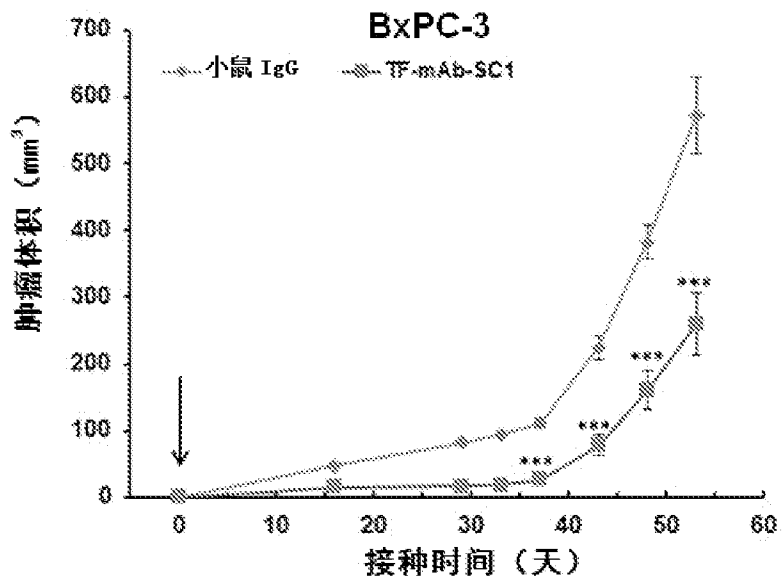


图 9

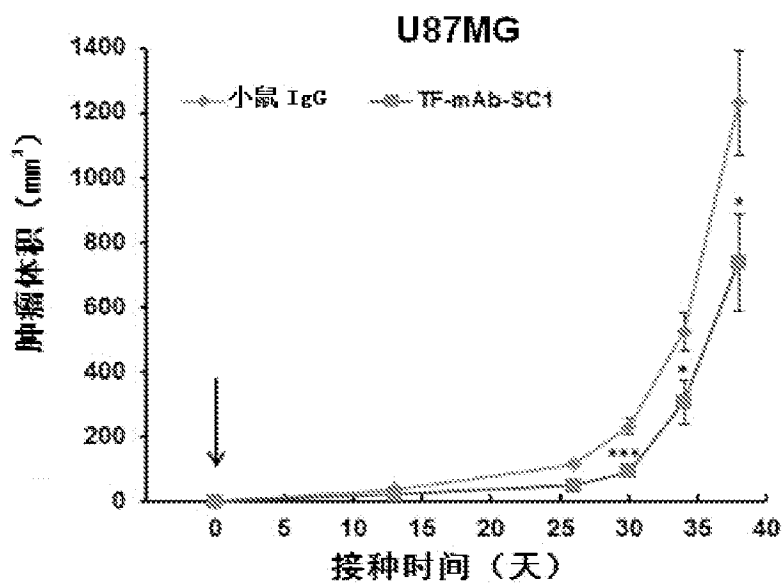


图 10

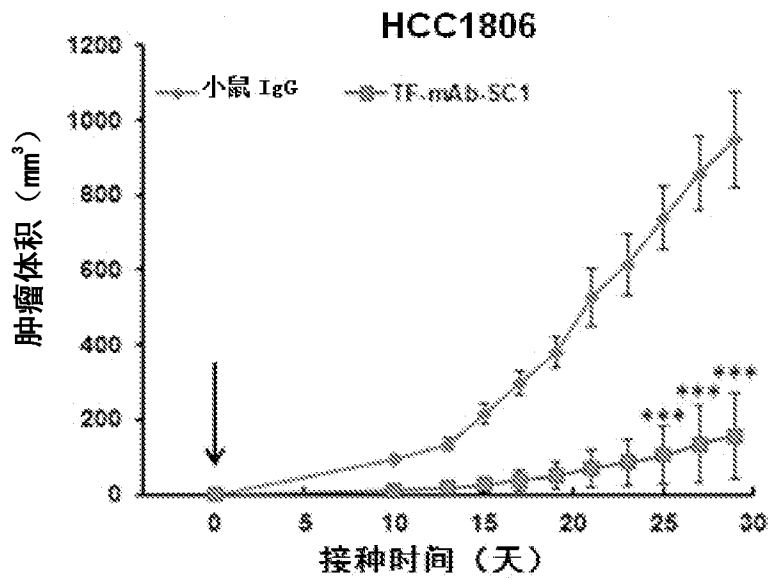


图 11

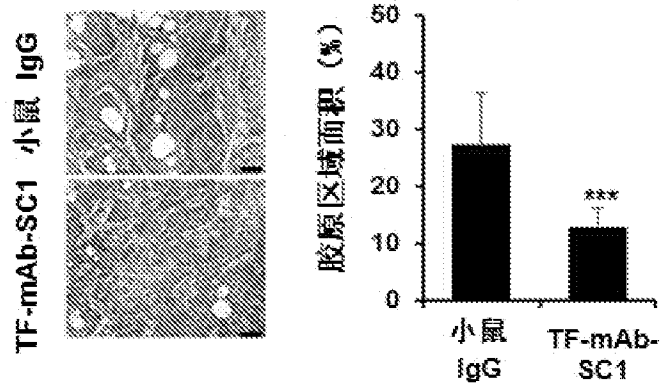


图 12

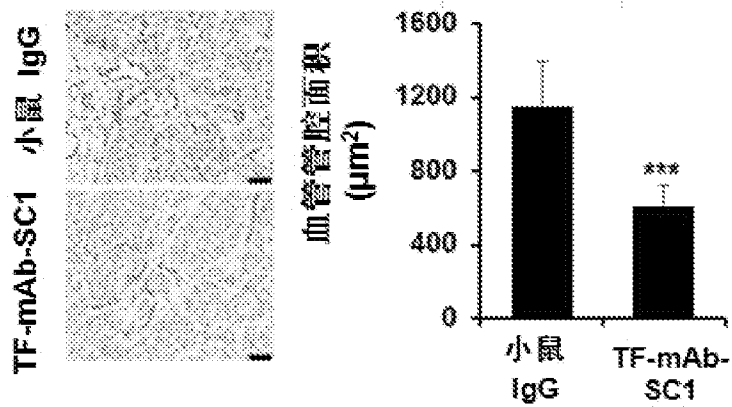


图 13

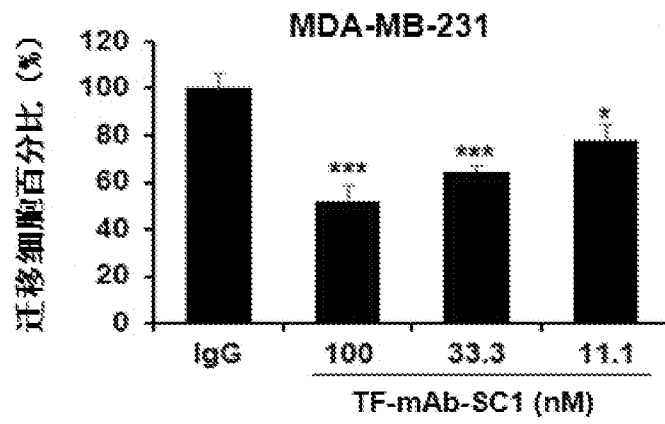
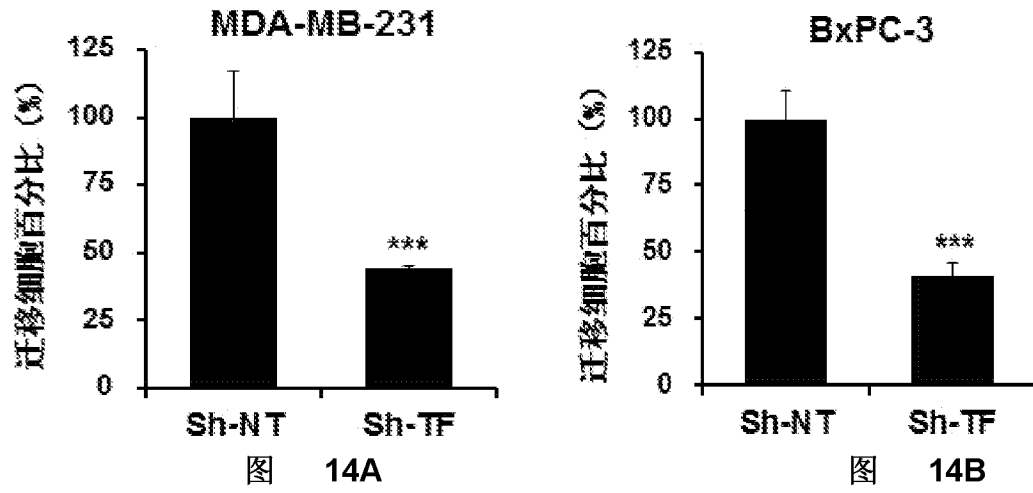


图 15A

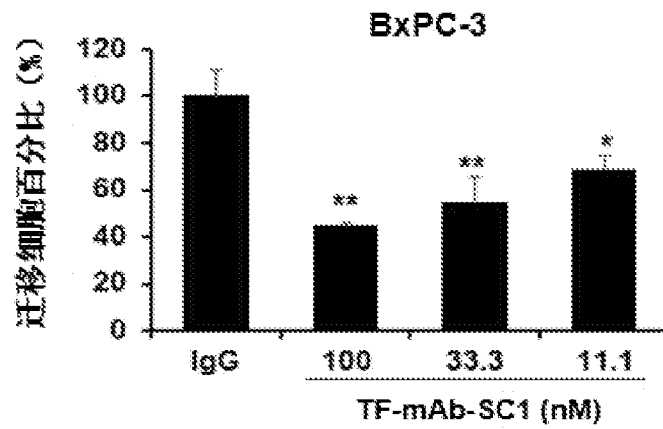


图 15B

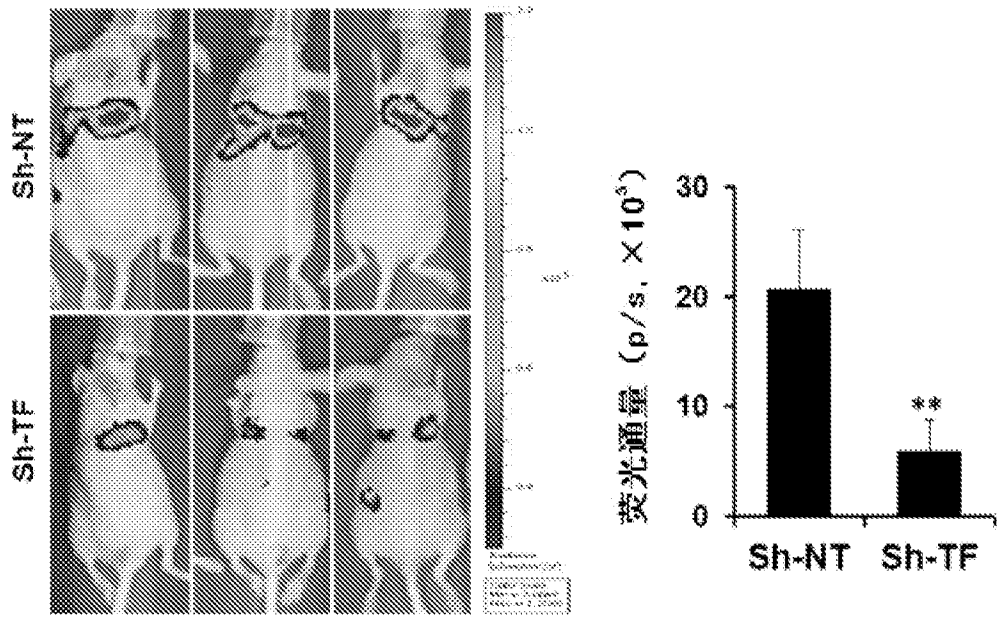


图 16

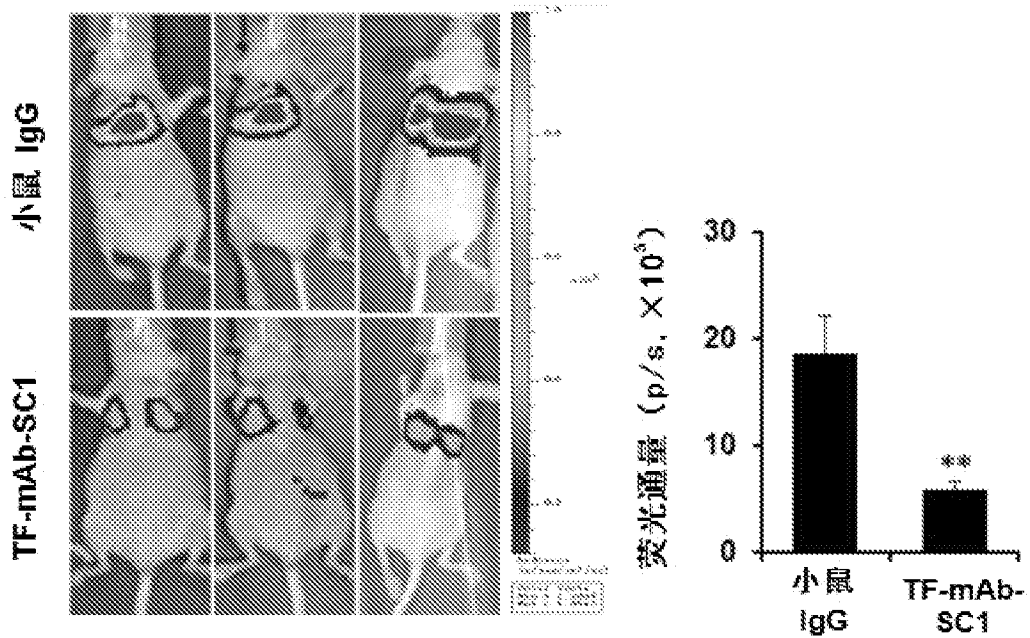


图 17

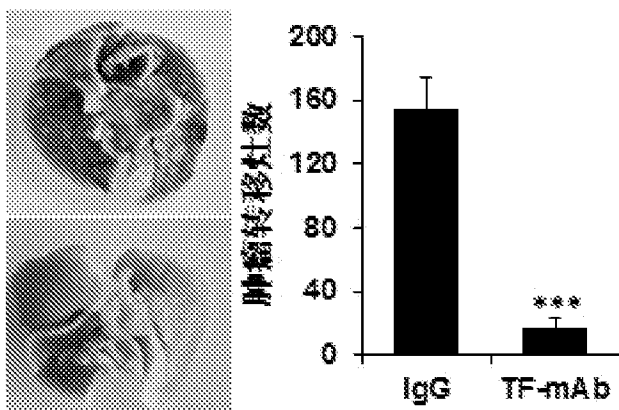


图 18A 8/14

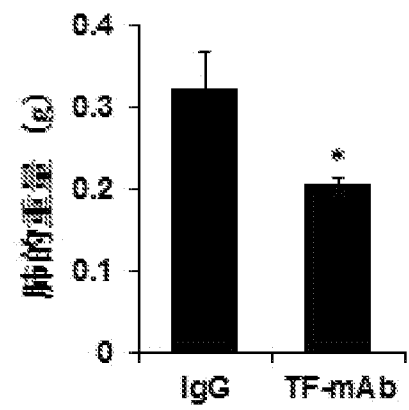


图 18B

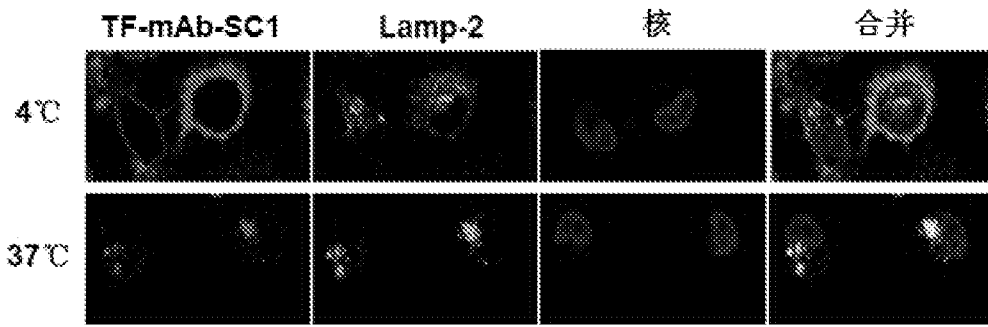


图 19

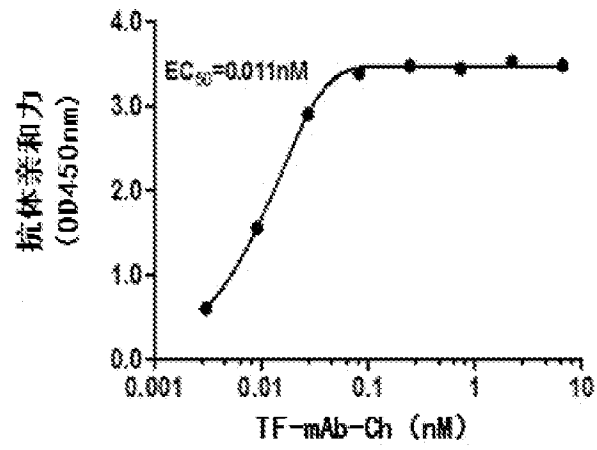


图 20

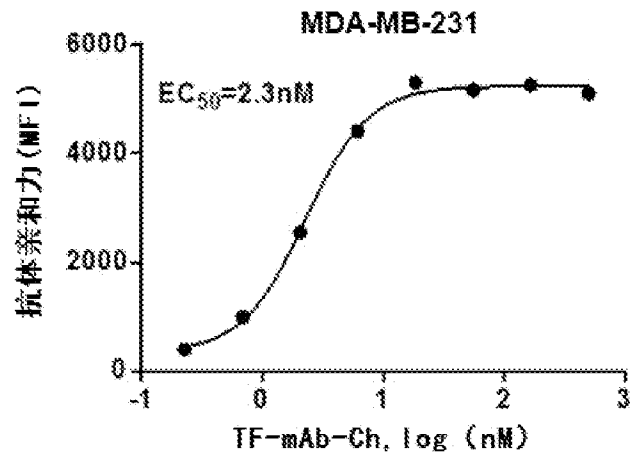


图 21A

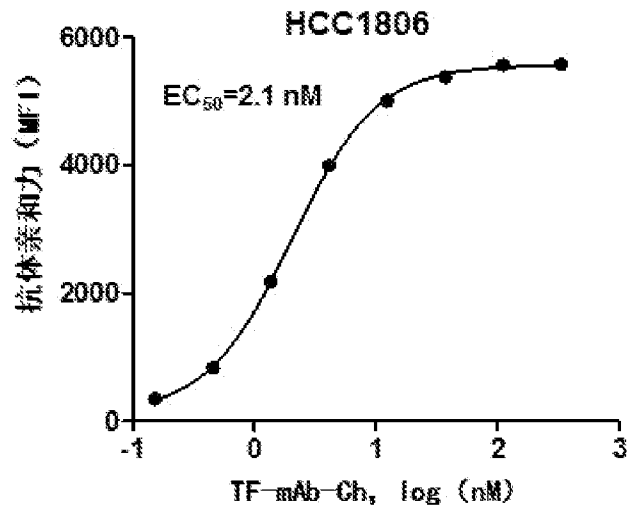


图 21B

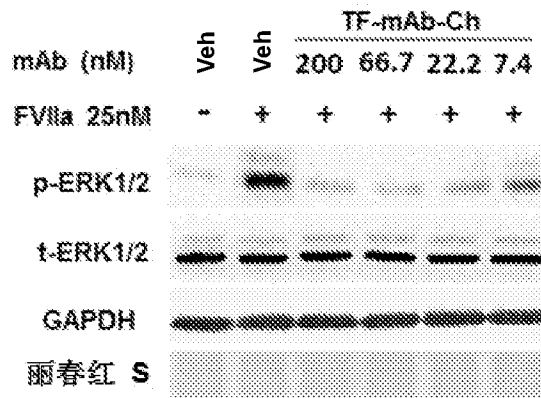


图 22

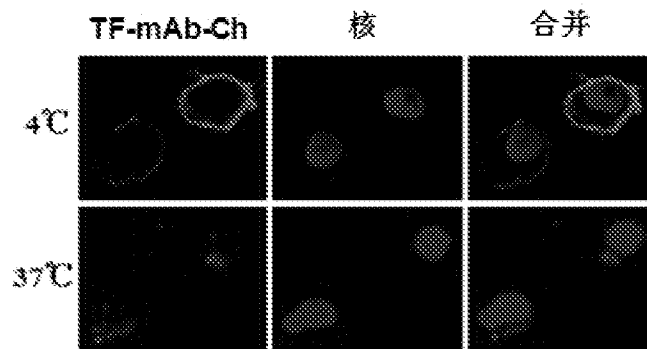


图 23

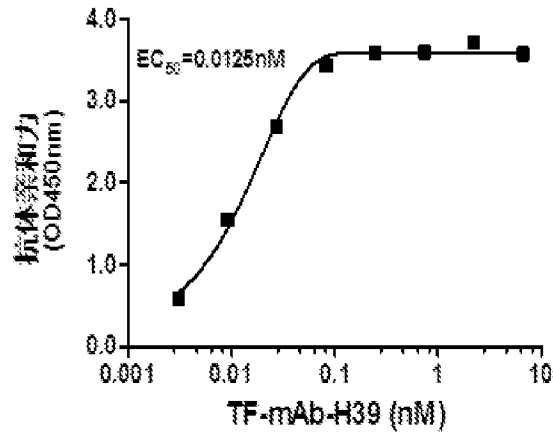


图 24A

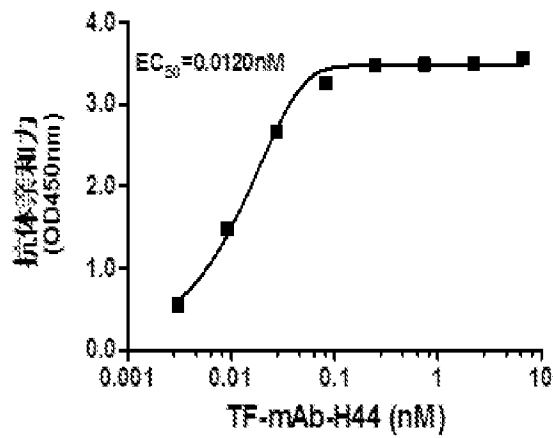
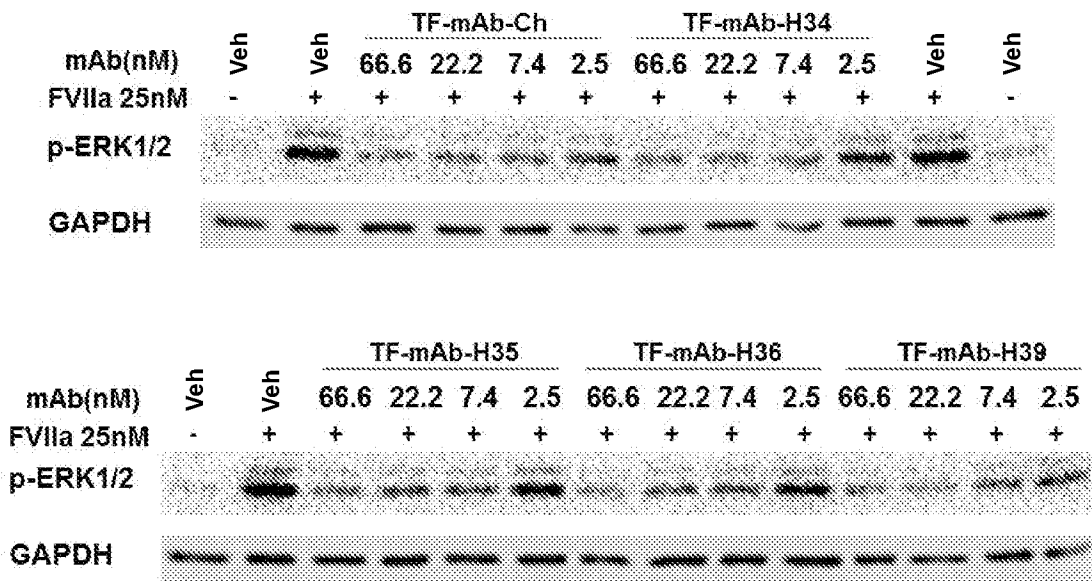


图 24B



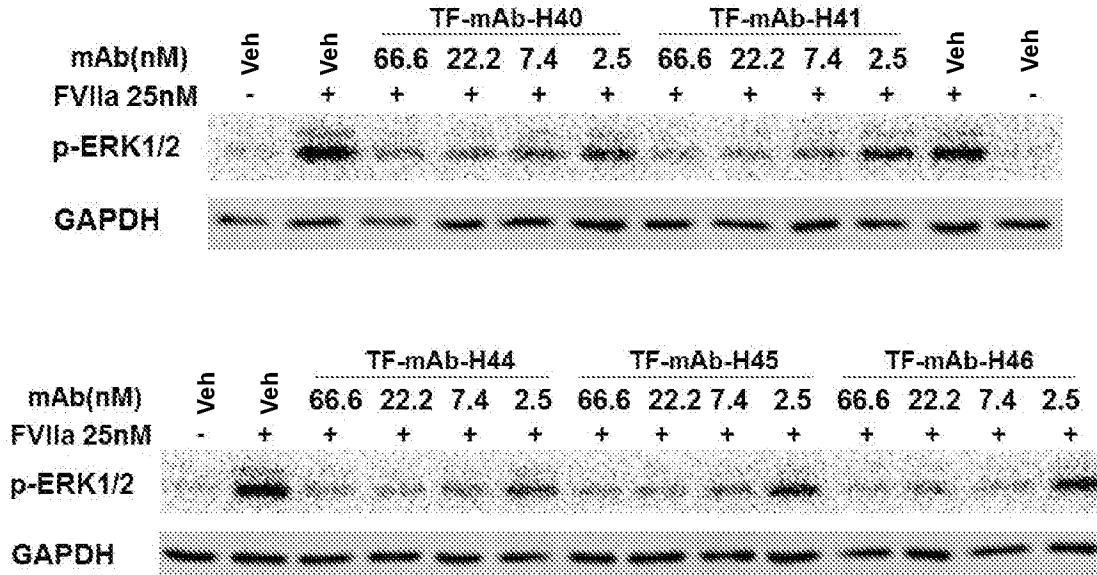


图 25

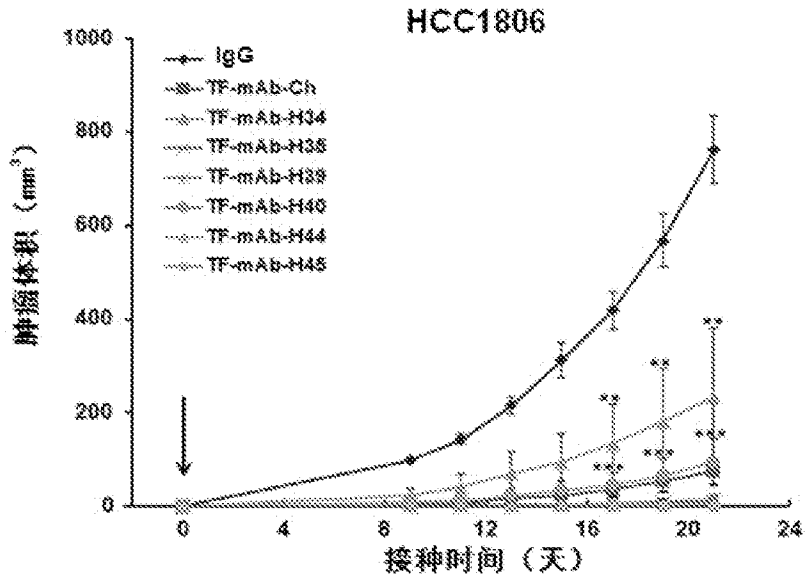


图 26

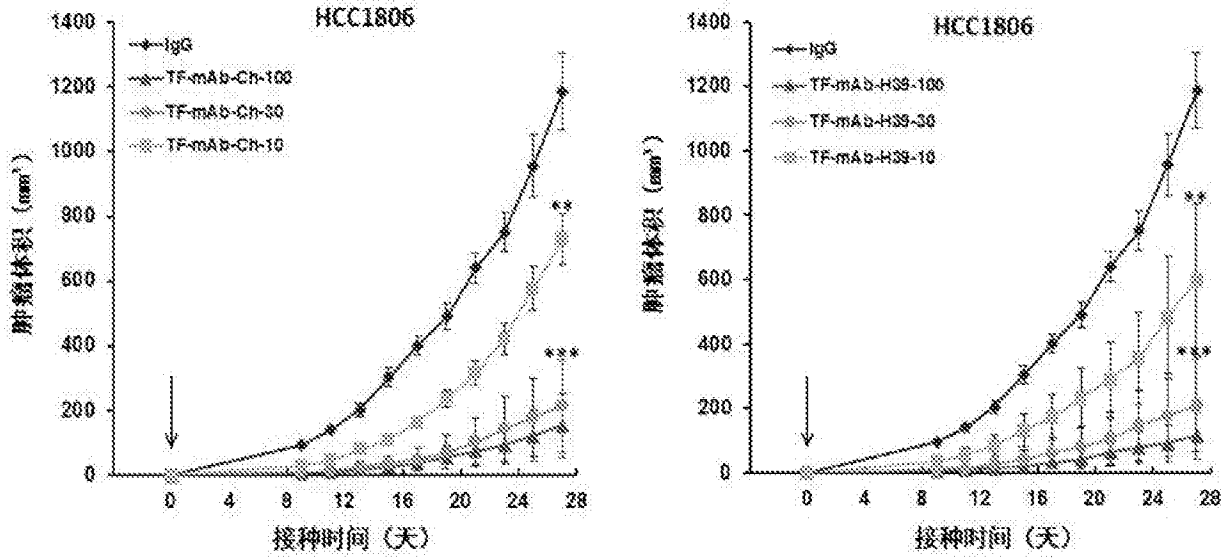


图 27

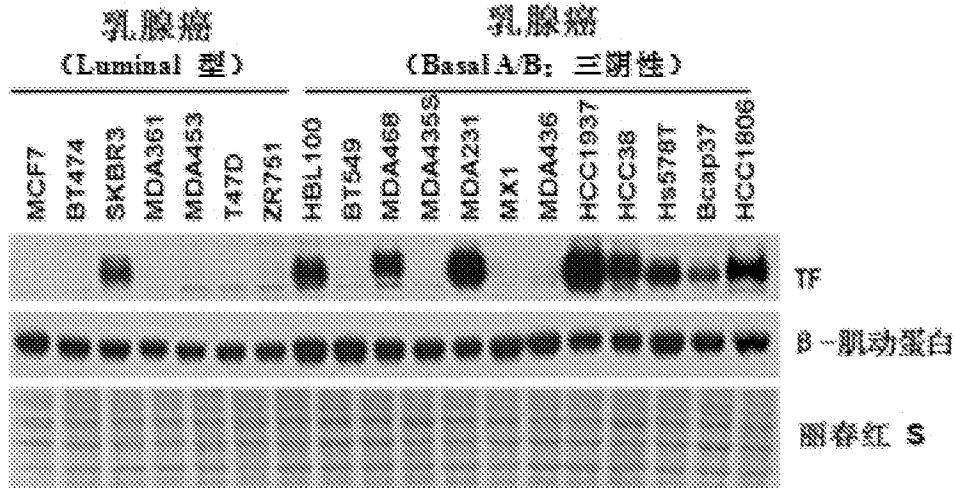


图 28

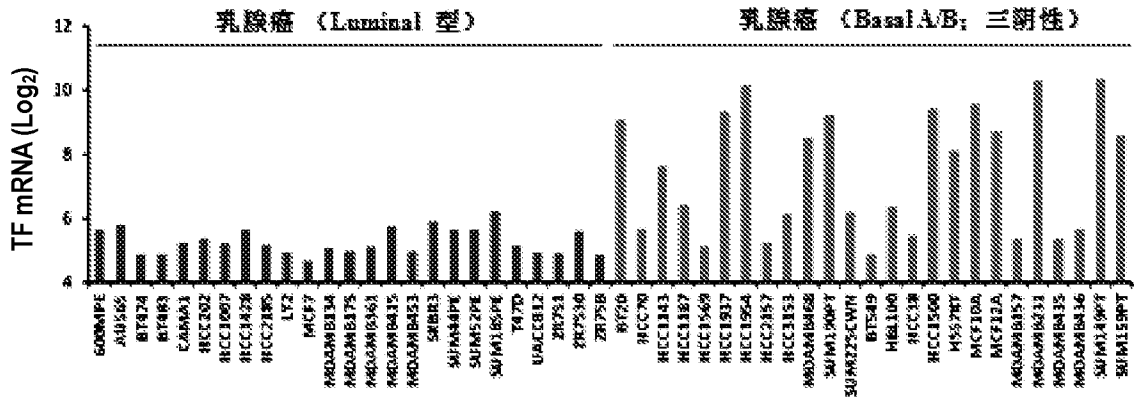


图 29

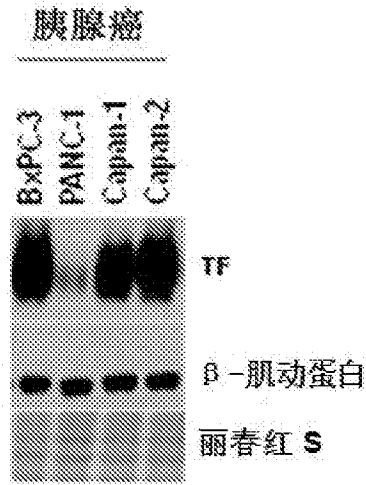


图 30

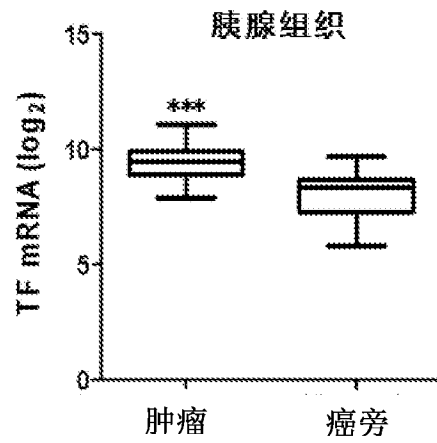


图 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2017/074163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/36 (2006.01) i; G01N 33/86 (2006.01) i; A61K 39/395 (2006.01) i; A61P 35/00 (2006.01) i; A61P 7/02 (2006.01) i; A61P 29/00 (2006.01) i; A61P 3/00 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K, G01N, A61K, A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and keywords: 组织因子, TF, 抗体, 抗原, 重链可变区, 轻链可变区, 互补决定区, CDR, 凝血, 血栓, 癌症, 肿瘤, tissue factor, antibody, antigen, variable region of heavy chain, VH, viable region of light chain, VL, complementarity determining region, coagulation, thrombus, tumor, cancer etc.

NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT; Genbank; EMBL and the sequences searched: SEQ ID NOs:1-23

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102317319 A (GENMAB A/S), 11 January 2012 (11.01.2012), see entire document, in particular, claims 1-4, 19, 25-49 and 68-88, and description, paragraphs [0047], [0082], [0352], [0359], [0395], [0508] and [0535]-[0585]	1-6, 8, 10-24
Y	CN 102317319 A (GENMAB A/S), 11 January 2012 (11.01.2012), see entire document, in particular, claims 1-4, 19, 25-49 and 68-88, and description, paragraphs [0047], [0082], [0352], [0359], [0395], [0508] and [0535]-[0585]	7, 9, 25
Y	邱雪峰等. “组织因子在心血管疾病中的分子机制及其意义”, 中国循环杂志, 22(6), 31 December 2007 (31.12.2007), see page 480, left-hand column, paragraph 2, (Chinese Circulation Journal), non-official translation (QU, Xuefeng et al., “Molecular Mechanism of Tissue Factor in Cardiovascular Disease and Significance Thereof”)	7, 9, 25
A	CN 104387474 A (NATIONAL CENTER FOR NANOSCIENCE AND TECHNOLOGY), 04 March 2015 (04.03.2015), see entire document	1-25
A	CN 103119065 A (GENMAB A/S), 22 May 2013 (22.05.2013), see entire document	1-25

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

<p>Date of the actual completion of the international search</p> <p style="text-align: center;">11 May 2017</p>	<p>Date of mailing of the international search report</p> <p style="text-align: center;">25 May 2017</p>
<p>Name and mailing address of the ISA</p> <p>State Intellectual Property Office of the P. R. China</p> <p>No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao</p> <p>Haidian District, Beijing 100088, China</p> <p>Facsimile No. (86-10) 62019451</p>	<p>Authorized officer</p> <p style="text-align: center;">WANG, Ying</p> <p>Telephone No. (86-10) 62412197</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/074163

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1575302 A (NOVO NORDISK A/S), 02 February 2005 (02.02.2005), see entire document	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/074163

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim No.: 24
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) - a surgical method or a treatment method for the disposal of a human body or animal body. The reasonably expected subject matter of the above-mentioned claim is: use of the antibody of claim 5, an antibody-drug conjugate of the antibody, or a CAR-T cell expressing the antibody in preparing drugs for treating tumours, thrombotic diseases, inflammatory diseases, and/or metabolic diseases.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/074163

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102317319 A	11 January 2012	JP 5860285 B2 US 9150658 B2 US 2011300156 A1 KR 20110104944 A JP 2012511314 A EA 201100923 A1 SI 2376537 T1 CN 102317319 B MX 2011005669 A EP 3159358 A1 MX 338754 B JP 2016138089 A EP 2376537 A2 SG 10201500140 V A WO 2010066803 A2 IL 212856 D0 WO 2010066803 A3 AU 2009324412 B2 US 2016053020 A1 IL 212856 A ES 2604635 T3 UA 109633 C2 CA 2746101 A1 ZA 201103723 B EP 2376537 B1 DK 2376537 T3 BR PI 0922350 A2 AU 2009324412 A1	16 February 2016 06 October 2015 08 December 2011 23 September 2011 24 May 2012 30 December 2011 28 February 2017 29 June 2016 17 June 2011 26 April 2017 29 April 2016 04 August 2016 19 October 2011 30 March 2015 17 June 2010 31 July 2011 19 August 2010 21 April 2016 25 February 2016 29 September 2016 08 March 2017 25 September 2015 17 June 2010 26 September 2012 28 September 2016 23 January 2017 12 January 2016 30 June 2011
CN 104387474 A	04 March 2015	WO 2016078549 A1	26 May 2016
CN 103119065 A	22 May 2013	KR 20130117751 A US 2016067349 A1 MX 2012014552 A CA 2802782 A1 NZ 604718 A US 9492565 B2 EP 2582728 A2 US 2013101608 A1 AU 2011267106 B2 CN 103119065 B WO 2011157741 A2 WO 2011157741 A3 BR 112012031727 A2 JP 6055404 B2 EA 201300016 A1 AU 2011267106 A1 US 9168314 B2 JP 2013532148 A CN 106084053 A	28 October 2013 10 March 2016 29 January 2013 22 December 2011 30 January 2015 15 November 2016 24 April 2013 25 April 2013 14 May 2015 03 August 2016 22 December 2011 08 March 2012 11 October 2016 27 December 2016 28 June 2013 10 January 2013 27 October 2015 15 August 2013 09 November 2016
CN 1575302 A	02 February 2005	RU 2004113373 A EP 1434802 A1	27 March 2005 07 July 2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/074163

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		NO 20041802 A	30 April 2004
		WO 03029295 A1	10 April 2003
		PL 368989 A1	04 April 2005
		HU 0401658 A2	29 November 2004
		IL 160998 D0	31 August 2004
		ZA 200402303 B	25 November 2004
		BR 0213046 A	28 June 2005
		ZA 200402303 A	25 November 2004
		CA 2460917 A1	10 April 2003
		MX PA 04003051 A	05 July 2004
		JP 2005512970 A	12 May 2005
		CZ 20040454 A3	15 September 2004
		KR 20040045478 A	01 June 2004

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/36(2006.01)i; G01N 33/86(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 7/02(2006.01)i; A61P 29/00(2006.01)i; A61P 3/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, G01N, A61K, A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 组织因子, TF, 抗体, 抗原, 重链可变区, 轻链可变区, 互补决定区, CDR, 凝血, 血栓, 癌症, 肿瘤, tissue factor, antibody, antigen, variable region of heavy chain, VH, viable region of light chain, VL, complementarity determining region, coagulation, thrombus, tumor, cancer等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-23。</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段</td> <td>1-6、8、10-24</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段</td> <td>7、9、25</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>邱雪峰等. "组织因子在心血管疾病中的分子机制及其意义" 中国循环杂志, 第22卷, 第6期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 见第480页左栏第2段</td> <td>7、9、25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104387474 A (国家纳米科学中心) 2015年 3月 4日 (2015 - 03 - 04) 见全文</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103119065 A (根马布股份公司) 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22) 见全文</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段	1-6、8、10-24	Y	CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段	7、9、25	Y	邱雪峰等. "组织因子在心血管疾病中的分子机制及其意义" 中国循环杂志, 第22卷, 第6期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 见第480页左栏第2段	7、9、25	A	CN 104387474 A (国家纳米科学中心) 2015年 3月 4日 (2015 - 03 - 04) 见全文	1-25	A	CN 103119065 A (根马布股份公司) 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22) 见全文	1-25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段	1-6、8、10-24																		
Y	CN 102317319 A (根马布股份公司) 2012年 1月 11日 (2012 - 01 - 11) 见全文尤其权利要求1-4、19、25-49、68-88, 说明书第[0047]、[0082]、[0352]、[0359]、[0395]、[0508]、[0535]-[0585]段	7、9、25																		
Y	邱雪峰等. "组织因子在心血管疾病中的分子机制及其意义" 中国循环杂志, 第22卷, 第6期, 2007年 12月 31日 (2007 - 12 - 31), 见第480页左栏第2段	7、9、25																		
A	CN 104387474 A (国家纳米科学中心) 2015年 3月 4日 (2015 - 03 - 04) 见全文	1-25																		
A	CN 103119065 A (根马布股份公司) 2013年 5月 22日 (2013 - 05 - 22) 见全文	1-25																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 5月 11日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 5月 25日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>王颖</p> <p>电话号码 (86-10)62412197</p>																		

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 1575302 A (诺沃挪第克公司) 2005年 2月 2日 (2005 - 02 - 02) 见全文	1-25

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a), 对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 24
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题, 即:
[1] PCT细则39.1(iv) — 处置人体或者动物体的外科方法或治疗方法。上述权利要求合理预期的主题为: 权利要求5所述抗体、该抗体的抗体-药物偶联物、或表达所述抗体的CAR-T细胞在制备治疗肿瘤、血栓类疾病、炎症性疾病和/或代谢类疾病的药物中的应用。
2. 权利要求:
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索, 具体地说:
3. 权利要求:
因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/074163

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	102317319	A	2012年 1月 11日	JP	5860285	B2	2016年 2月 16日
				US	9150658	B2	2015年 10月 6日
				US	2011300156	A1	2011年 12月 8日
				KR	20110104944	A	2011年 9月 23日
				JP	2012511314	A	2012年 5月 24日
				EA	201100923	A1	2011年 12月 30日
				SI	2376537	T1	2017年 2月 28日
				CN	102317319	B	2016年 6月 29日
				MX	2011005669	A	2011年 6月 17日
				EP	3159358	A1	2017年 4月 26日
				MX	338754	B	2016年 4月 29日
				JP	2016138089	A	2016年 8月 4日
				EP	2376537	A2	2011年 10月 19日
				SG	10201500140V	A	2015年 3月 30日
				WO	2010066803	A2	2010年 6月 17日
				IL	212856	D0	2011年 7月 31日
				WO	2010066803	A3	2010年 8月 19日
				AU	2009324412	B2	2016年 4月 21日
				US	2016053020	A1	2016年 2月 25日
				IL	212856	A	2016年 9月 29日
				ES	2604635	T3	2017年 3月 8日
				UA	109633	C2	2015年 9月 25日
				CA	2746101	A1	2010年 6月 17日
				ZA	201103723	B	2012年 9月 26日
				EP	2376537	B1	2016年 9月 28日
				DK	2376537	T3	2017年 1月 23日
				BR	PI0922350	A2	2016年 1月 12日
AU	2009324412	A1	2011年 6月 30日				
CN	104387474	A	2015年 3月 4日	WO	2016078549	A1	2016年 5月 26日
CN	103119065	A	2013年 5月 22日	KR	20130117751	A	2013年 10月 28日
				US	2016067349	A1	2016年 3月 10日
				MX	2012014552	A	2013年 1月 29日
				CA	2802782	A1	2011年 12月 22日
				NZ	604718	A	2015年 1月 30日
				US	9492565	B2	2016年 11月 15日
				EP	2582728	A2	2013年 4月 24日
				US	2013101608	A1	2013年 4月 25日
				AU	2011267106	B2	2015年 5月 14日
				CN	103119065	B	2016年 8月 3日
				WO	2011157741	A2	2011年 12月 22日
				WO	2011157741	A3	2012年 3月 8日
				BR	112012031727	A2	2016年 10月 11日
				JP	6055404	B2	2016年 12月 27日
				EA	201300016	A1	2013年 6月 28日
				AU	2011267106	A1	2013年 1月 10日
				US	9168314	B2	2015年 10月 27日
				JP	2013532148	A	2013年 8月 15日
CN	106084053	A	2016年 11月 9日				
CN	1575302	A	2005年 2月 2日	RU	2004113373	A	2005年 3月 27日
				EP	1434802	A1	2004年 7月 7日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/074163

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		NO	20041802	A	2004年 4月 30日
		WO	03029295	A1	2003年 4月 10日
		PL	368989	A1	2005年 4月 4日
		HU	0401658	A2	2004年 11月 29日
		IL	160998	D0	2004年 8月 31日
		ZA	200402303	B	2004年 11月 25日
		BR	0213046	A	2005年 6月 28日
		ZA	200402303	A	2004年 11月 25日
		CA	2460917	A1	2003年 4月 10日
		MX	PA04003051	A	2004年 7月 5日
		JP	2005512970	A	2005年 5月 12日
		CZ	20040454	A3	2004年 9月 15日
		KR	20040045478	A	2004年 6月 1日