



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102317319 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 11

(21) 申请号 200980156348. 7

罗布 .N. 德琼格

(22) 申请日 2009. 12. 09

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

(30) 优先权数据

PA200801744 2008. 12. 09 DK

61/201, 335 2008. 12. 09 US

代理人 罗天乐

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 09

(51) Int. Cl.

C07K 16/36 (2006. 01)

A61P 35/00 (2006. 01)

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/066755 2009. 12. 09

(87) PCT申请的公布数据

W02010/066803 EN 2010. 06. 17

(71) 申请人 根马布股份公司

地址 丹麦哥本哈根

(72) 发明人 桑德拉 . 弗普洛根 戴维 . P. E. 萨廷

勒内 . M. A. 霍伊特 保罗 . 帕伦

詹 . 范德温克尔

维比克 . M. 布雷恩霍尔特

伊娃 . 埃恩鲁思 奥利 . 巴德斯加德

汤姆 . 文克 威廉 . K. 布利克

米沙 . 霍特坎普

马罗斯卡 . 奥德肖恩

权利要求书 10 页 说明书 72 页

序列表 28 页 附图 37 页

(54) 发明名称

针对组织因子的人抗体

(57) 摘要

公开了与人 TF 结合的分离的人单克隆抗体和基于抗体的相关组合物和分子。还公开了包括该抗体的药物组合物,以及使用该抗体的治疗和诊断方法。

1. 一种结合人组织因子的人抗体。
2. 权利要求 1 的抗体,其中当用实施例 13 中所述的测定方法进行测定时,该抗体以 3nM 或更低,例如 0.50nM 或更低,例如 0.35nM 或更低,例如 0.20nM 或更低,例如 0.1nM 或更低的表观亲和力 (EC_{50}) 与组织因子的胞外域结合。
3. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体结合表达组织因子的哺乳动物细胞,例如用编码组织因子的构建体转染的 A431 细胞,优选地,当用实施例 14 中所述的测定方法进行测定时,其表观亲和力 (EC_{50}) 为 10nM 或更低,例如 8nM 或更低,例如 5nM 或更低,例如 2nM 或更低,例如 1nM 或更低,例如 0.5nM 或更低,例如 0.3nM 或更低。
4. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体能够在 A431 细胞中诱发抗体依赖的细胞细胞毒性,优选地,当用实施例 20 中所述的测定方法进行测定时,其 EC_{50} 值为 2nM 或更低,例如 1nM 或更低,例如 0.7nM 或更低,或者 0.3nM 或更低,例如 0.20nM 或更低,或者 0.1nM 或更低,或者 0.05nM 或更低。
5. 前述权利要求中任一项的抗体,其中当用实施例 24 中所述的方法进行测定时,该抗体可有效抑制已建立的 MDA-MB-231 肿瘤的生长,和 / 或当用实施例 26 中所述的方法进行测定时,可有效抑制已建立的 BxPC3 肿瘤的生长。
6. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体抑制组织因子诱导的凝血,优选地,当用实施例 19 中所述的测定方法进行测定时,其中值抑制浓度小于 10nM,例如小于 5nM,例如小于 2nM,例如小于 1nM。
7. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体抑制 FVIIa 与组织因子结合,优选地,当用实施例 15 中所述的测定方法进行测定时,其抑制的最大抑制值大于 80%,例如大于 90%。
8. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体抑制 FVIIa 诱导的 MDA-MB-231 细胞的 IL-8 释放,优选地,当用实施例 17 中所述的测定方法进行测定时,抑制的最大抑制值大于 40%,例如大于 50%,例如大于 60%。
9. 前述权利要求中任一项中的抗体,其中该抗体抑制 FX 被 TF/FVIIa 复合体转变成 FXa,优选地,当用实施例 18 中所述的测定方法进行测定时,抑制小于 50%,例如小于 40%,例如在 1-30% 的范围内。
10. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体与包括包含序列 SEQ ID NO:9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:65 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。
11. 前述权利要求中任一项的抗体,其中与组织因子的结合不涉及组织因子的下述任一氨基酸:45 位的 W,46 位的 K 或 94 位的 Y。
12. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体与包括包含序列 SEQ ID NO:37 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO:93 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。
13. 前述权利要求中任一项的抗体,其中所述抗体抑制 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化,优选地,当用实施例 16 中所述的测定方法进行测定时,其中值抑制浓度小于 10nM,例如小于 5nM,例如小于 2nM。
14. 权利要求 1-7 和 9-13 中任一项的抗体,其中该抗体抑制 ERK 磷酸化,优选地,当用实施例 16 中所述的测定方法进行测定时,其中值抑制浓度小于 10nM,例如小于 5nM,例如小于 2nM,并且如实施例 17 中的测定方法所述的对 FVII 诱导的 IL-8 释放的抑制不超过最大

10%。

15. 前述权利要求中任一项的抗体,其中抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积,优选地,如实施例 21 中所述进行测定,该抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积。

16. 前述权利要求中任一项的抗体,其中如实施例 28 所述,抗体 Fab 片段与组织因子胞外域结合,用 ELISA 测得的 EC50 值低于 $0.1 \mu\text{g/mL}$,例如低于 $0.05 \mu\text{g/mL}$,例如低于 $0.04 \mu\text{g/mL}$ 。

17. 权利要求 1-15 中任一项的抗体,其中如实施例 28 所述,抗体 Fab 片段与组织因子胞外域结合,按照 ELISA 测得的 EC50 值高于 $1.0 \mu\text{g/mL}$ 。

18. 权利要求 1-15 中任一项的抗体,其中如实施例 28 所述,抗体 Fab 片段与组织因子胞外域结合,EC50 值低于 $10 \mu\text{g/mL}$,例如低于 $1 \mu\text{g/mL}$,例如低于 $0.5 \mu\text{g/mL}$,或者低于 $0.2 \mu\text{g/mL}$ 。

19. 上述任一权利要求的抗体,其中该抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,其与改组构建体 42-84mm 显示降低的结合,该改组构建体包含人的 TF 序列,只是氨基酸 42-84 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

20. 权利要求 1-18 的抗体,其中该抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,其与改组构建体 85-122mm 显示降低的结合,该改组构建体包含人的 TF 序列,只是氨基酸 85-122 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

21. 权利要求 1-18 的抗体,其中该抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,其与改组构建体 123-137mm 显示降低的结合,该改组构建体包含人的 TF 序列,只是氨基酸 123-137 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

22. 权利要求 1-18 的抗体,其中该抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,其与改组构建体 185-225mm 显示降低的结合,该改组构建体包含人的 TF 序列,只是氨基酸 185-225 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

23. 权利要求 1-18 的抗体,其中该抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,其与改组构建体 226-250mm 显示降低的结合,该改组构建体包含人的 TF 序列,只是氨基酸 226-250 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

24. 根据权利要求 19-23 中任一项的抗体,其中相比于与人 TF 的结合,其与超过 1 种改组构建体显示降低的结合,例如与下列改组构建体的降低的结合:

如权利要求 19 中所定义的改组构建体 42-84mm 和如权利要求 20 中所定义的改组构建体 85-122mm,或

如权利要求 21 中所定义的改组构建体 123-137mm,和如权利要求 22 中所定义的改组构建体 185-225mm,和如权利要求 23 中所定义的改组构建体 226-250mm。

25. 前述权利要求中任一项中的抗体,其中所述抗体

- 与包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合,并且

- 不与包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。

26. 权利要求 25 的抗体,其中所述抗体包括这样的 VH CDR3 区,其具有

a) 如下所示的序列

-SEQ ID No :12,
-SEQ ID No :16,
-SEQ ID No :20,
-SEQ ID No :24,
-SEQ ID No :28,

或者

b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2、3、4、或 5 个氨基酸修饰,优选替换例如保守替换的变体。

27. 权利要求 26 的抗体,其中该抗体包括具有如 SEQ ID NO :12 所示的序列或其变体的 VH CDR3 区,其中该变体在位置 2、3、6、9 和 11 中一个或多个位置处包含修饰,优选地,其中该修饰是替换,更优选地,其中该替换选自下组:

- a) 位置 2 处的 R 被 K 替换,
- b) 位置 3 处的 S 被 A 或 T 替换,
- c) 位置 6 处的 G 被 T 替换,
- d) 位置 9 处的 L 被 F 替换,和
- e) 位置 11 处的 S 被 Y 替换。

28. 权利要求 1 或 26 的抗体,其中该抗体包括:

- a) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :10,11 和 12 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :66,67 和 68 的 VL 区,
- b) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :14,15 和 16 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :70,71 和 72 的 VL 区,
- c) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :18,19 和 20 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :74,75 和 76 的 VL 区,
- d) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :22,23 和 24 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :78,79 和 80 的 VL 区,
- e) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :26,27 和 28 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :82,83 和 84 的 VL 区,或
- f) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选地是氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

29. 权利要求 26 的抗体,包含这样的 VH,其

- a) 与选自 SEQ ID NO :9,13,17,21 和 25 的 VH 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者
- b) 与选自 SEQ ID NO :9,13,17,21,21 和 25 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

30. 权利要求 26 的抗体,包含这样的 VL,其

- a) 与选自 SEQ ID NO :65,69,73,77 和 81 的 VL 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者
- b) 与选自 SEQ ID NO :65,69,73,77 和 81 的 VL 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

31. 权利要求 26 的抗体,包括:
- a) 包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区,
 - b) 包含序列 SEQ ID NO :13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :69 的 VL 区,
 - c) 包含序列 SEQ ID NO :17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :73 的 VL 区,
 - d) 包含序列 SEQ ID NO :21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :77 的 VL 区,
 - e) 包含序列 SEQ ID NO :25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :81 的 VL 区,或
 - f) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。
32. 权利要求 1-24 中任一项的抗体,其中所述抗体
- 与包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合,并且
 - 与包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。
33. 权利要求 32 的抗体,其中所述抗体包括这样的 VH CDR3 区,其具有
- a) 如下所示的序列
- SEQ ID No :8,
 - SEQ ID No :52,
- 或者
- b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,优选替换例如保守替换的变体。
34. 权利要求 1 或 32 的抗体,其中该抗体包括:
- a) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :6,7 和 8 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :62,63 和 64 的 VL 区,
 - b) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :50,51 和 52 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :106,107 和 108 的 VL 区,或
 - c) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。
35. 权利要求 32 的抗体,包括这样的 VH,其
- a) 与选自 SEQ ID NO :5 和 49 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者
 - b) 与选自 SEQ ID NO :5 和 49 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。
36. 权利要求 32 的抗体,其包括这样的 VL,所述 VL
- a) 与选自 SEQ ID NO :61 和 105 的 VL 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者
 - b) 与选自 SEQ ID NO :61 和 105 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。
37. 权利要求 32 的抗体,其包括:
- a) 包含序列 SEQ ID NO :5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :61 的 VL 区,

b) 包含序列 SEQ ID NO:49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:105 的 VL 区, 或
c) 所述任一抗体的变体, 其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

38. 权利要求 1-24 中任一项的抗体, 其中所述抗体

- 不与包括包含序列 SEQ ID NO:9 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO:65 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合, 并且

- 与包括包含序列 SEQ ID NO:37 的 VH 区及包含序列 SEQ ID NO:93 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。

39. 权利要求 38 的抗体, 其中所述抗体包括这样的 VH CDR3 区, 其具有

a) 如下所示的序列

-SEQ ID No:32,

-SEQ ID No:36,

-SEQ ID No:40,

-SEQ ID No:56,

或者

b) 所述任一序列的变体, 例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 优选替换, 例如保守替换的变体。

40. 权利要求 1 或 38 的抗体, 其中该抗体包括:

a) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:30, 31 和 32 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:86, 87 和 88 的 VL 区,

b) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:34, 35 和 36 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:90, 91 和 92 的 VL 区,

c) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:38, 39 和 40 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:94, 95 和 96 的 VL 区,

d) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:54, 55 和 56 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO:110, 111 和 112 的 VL 区, 或

e) 所述任一抗体的变体, 其中所述变体优选地在所述序列中具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

41. 权利要求 38 的抗体, 其包含这样的 VH, 所述 VH

a) 与选自 SEQ ID NO:29, 33, 37 和 53 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性, 例如至少 90%, 至少 95%, 或者至少 98% 或 100% 同一性, 或者

b) 与选自 SEQ ID NO:29, 33, 37 和 53 的 VH 区序列相比具有最多 20 个, 例如 15 个, 或者 10 个, 或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

42. 权利要求 38 的抗体, 其包含这样的 VL, 所述 VL

a) 与选自 SEQ ID NO:85, 89, 93 和 109 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性, 例如至少 90%, 至少 95%, 或者至少 98% 或 100% 同一性, 或者

b) 与选自 SEQ ID NO:85, 89, 93 和 109 的 VH 区序列相比具有最多 20 个, 例如 15 个, 或者 10 个, 或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

43. 权利要求 38 的抗体, 其包括:

a) 包含序列 SEQ ID NO :29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :85 的 VL 区,
b) 包含序列 SEQ ID NO :33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :89 的 VL 区,
c) 包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区,
d) 包含序列 SEQ ID NO :53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :109 的 VL 区, 或
e) 所述任一抗体的变体, 其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

44. 前述权利要求 1-24 中任一项的抗体, 其中所述抗体与包括包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区的抗体竞争组织因子结合。

45. 权利要求 44 的抗体, 其中所述抗体包括这样的 VH CDR3 区, 其具有

a) 如下所示的序列

-SEQ ID No :4,

-SEQ ID No :44,

-SEQ ID No :48,

或者

b) 所述任一序列的变体, 例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 优选替换例如保守替换的变体。

46. 权利要求 1 或 44 的抗体, 其中该抗体包括:

a) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :2, 3 和 4 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :58, 59 和 60 的 VL 区,

b) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :42, 43 和 44 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :98, 99 和 100 的 VL 区,

c) 包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :46, 47 和 48 的 VH 区, 和包含 CDR1, 2 和 3 序列 SEQ ID NO :102, 103 和 104 的 VL 区, 或者

d) 所述任一抗体的变体, 其中所述变体优选地在所述序列中具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

47. 权利要求 44 的抗体, 其包括这样的 VH, 所述 VH

a) 与选自 SEQ ID NO :1, 41 和 45 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性, 例如至少 90%, 至少 95%, 或者至少 98% 或 100% 同一性, 或者

b) 与选自 SEQ ID NO :1, 41 和 45 的 VH 区序列相比具有最多 20 个, 例如 15 个, 或者 10 个, 或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

48. 权利要求 44 的抗体, 其包括这样的 VL, 所述 VL

a) 与选自 SEQ ID NO :57, 97 和 101 的 VL 区序列具有至少 80% 同一性, 例如至少 90%, 至少 95%, 或者至少 98% 或 100% 同一性, 或者

b) 与选自 SEQ ID NO :57, 97 和 101 的 VH 区序列相比具有最多 20 个, 例如 15 个, 或者 10 个, 或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 更优选氨基酸替换, 例如保守氨基酸替换。

49. 权利要求 44 的抗体, 包括:

a) 包含序列 SEQ ID NO :1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :57 的 VL 区,

b) 包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区,

c) 包含序列 SEQ ID NO :45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :101 的 VL 区, 或者

d) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

50. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其中当用本文实施例 22 中所述的方法进行测定时,该抗体对组织因子的亲和力小于 5nM,例如小于 3.5nM,例如小于 2nM。

51. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其中当用本文实施例 22 中所述的方法进行测定时,该抗体的 k_d 大于 10^{-3}sec^{-1} ,和 / 或当用本文实施例 22 中所述的方法进行测定时,该抗体的 k_a 大于 $5 \times 10^4 \text{mol}^{-1}\text{sec}^{-1}$ 。

52. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其中当用本文实施例 22 中所述的亲和力方法进行测定时,该抗体的 k_d 大于 10^{-3}sec^{-1} ,并且当用本文实施例 22 中所述的亲合力方法进行测定时,该抗体的亲合力小于 5nM,例如小于 1nM,例如小于 0.2nM。

53. 权利要求 1-5 或 51 或 52 中任一项的抗体,其中该抗体与健康组织不显示结合,特别是与人肾小球不显示结合,例如用实施例 23 中所述的测定方法测得;但是与胰腺肿瘤显示结合,例如用本文实施例 23 中所述的测定方法测得。

54. 权利要求 1-5 或 51-53 中任一项的抗体,其中当用本文实施例 26 中所述的方法进行测定时,该抗体可有效抑制已建立的 BX-PC3 肿瘤的生长。

55. 前述权利要求中任一项的抗体,其中该抗体进一步具有一种或多种如下性质:抑制增殖、抑制肿瘤血管发生、诱导肿瘤细胞凋亡、与可变剪接的组织因子结合。

56. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其与包含下列的抗体竞争组织因子结合:

- a) 包含序列 SEQ ID NO:9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:65 的 VL 区,
- b) 包含序列 SEQ ID NO:1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:57 的 VL 区,
- c) 包含序列 SEQ ID NO:5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:61 的 VL 区,
- d) 包含序列 SEQ ID NO:13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:69 的 VL 区,
- e) 包含序列 SEQ ID NO:17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:73 的 VL 区,
- f) 包含序列 SEQ ID NO:21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:77 的 VL 区,
- g) 包含序列 SEQ ID NO:25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:81 的 VL 区,
- h) 包含序列 SEQ ID NO:29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:85 的 VL 区,
- i) 包含序列 SEQ ID NO:33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:89 的 VL 区,
- j) 包含序列 SEQ ID NO:37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:93 的 VL 区,
- k) 包含序列 SEQ ID NO:41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:97 的 VL 区,
- l) 包含序列 SEQ ID NO:45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:101 的 VL 区,
- m) 包含序列 SEQ ID NO:49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:105 的 VL 区,或者
- n) 包含序列 SEQ ID NO:53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:109 的 VL 区。

57. 权利要求 1-5 中任一项的抗体,其与具有下述的抗体结合组织因子上的相同表位:

- a) 包含序列 SEQ ID NO:9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:65 的 VL 区,
- b) 包含序列 SEQ ID NO:1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:57 的 VL 区,
- c) 包含序列 SEQ ID NO:5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:61 的 VL 区,
- d) 包含序列 SEQ ID NO:13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:69 的 VL 区,
- e) 包含序列 SEQ ID NO:17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:73 的 VL 区,
- f) 包含序列 SEQ ID NO:21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:77 的 VL 区,

- g) 包含序列 SEQ ID NO :25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :81 的 VL 区,
- h) 包含序列 SEQ ID NO :29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :85 的 VL 区,
- i) 包含序列 SEQ ID NO :33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :89 的 VL 区,
- j) 包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区,
- k) 包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区,
- l) 包含序列 SEQ ID NO :45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :101 的 VL 区,
- m) 包含序列 SEQ ID NO :49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :105 的 VL 区, 或者
- n) 包含序列 SEQ ID NO :53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :109 的 VL 区。

58. 前述权利要求中任一项的抗体, 其中该抗体包括:

- 源自选自下组的人种系 V_H 序列的重链可变区: IGHV1-18*01, IGHV3-23*01, IGHV3-30*01, IGHV3-33*01, IGHV3-33*03, IGHV1-69*02, IGHV1-69*04 和 IGHV5-51*01, 和 / 或

- 源自选自下组的人种系 V_K 序列的轻链可变区: IGKV3-20*01, IGKV1-13*02, IGKV3-11*01 和 IGKVID-16*01。

59. 前述权利要求中任一项的抗体, 其中该抗体是全长抗体, 优选 IgG1 抗体, 特别是 IgG1, κ 抗体。

60. 前述权利要求中任一项的抗体, 其中该抗体偶联于另一部分, 例如细胞毒部分、放射性同位素或药物。

61. 权利要求 1-3 或 15-49 中任一项的抗体, 其中该抗体是效应物功能缺陷抗体。

62. 权利要求 61 的抗体, 其中该效应物功能缺陷抗组织因子抗体是稳定化的人 IgG4 抗体, 例如其中人 IgG4 重链恒定区 409 位精氨酸被替换为赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸, 优选赖氨酸, 和 / 或其中铰链区包括 Cys-Pro-Pro-Cys 序列的抗体。

63. 权利要求 1-3 或 15-49 中任一项的抗体, 其中该抗体是单价抗体。

64. 权利要求 63 的抗体, 其中所述单价抗体用如下方法构建, 其包括:

i) 提供编码所述单价抗体轻链的核酸构建体, 所述构建体包含编码选定的抗原特异性抗体之 VL 区的核苷酸序列和编码 Ig 之恒定 CL 区的核苷酸序列, 其中所述编码选定的抗原特异性抗体之 VL 区的核苷酸序列和所述编码 Ig 之 CL 区的核苷酸序列可操作地连接在一起, 并且其中, 在 IgG1 亚型的情况下, 编码所述 CL 区的核苷酸序列经过修饰, 使得所述 CL 区不含有任何如下所述的氨基酸: 在存在多克隆人 IgG 的条件下或者当施用于动物或人类时, 所述氨基酸能够与其它包含与该 CL 区相同的氨基酸序列的肽形成二硫键或共价键;

ii) 提供编码所述单价抗体重链的核酸构建体, 所述构建体包含编码选定的抗原特异性抗体之 VH 区的核苷酸序列和编码人 Ig 之恒定 CH 区的核苷酸序列, 其中编码 CH 区的核苷酸序列经过修饰, 使得相应于铰链区的区域, 以及如 Ig 亚型所要求的 CH 区的其它区域, 如 CH3 区, 不含有任何如下所述的氨基酸残基: 在存在多克隆人 IgG 的条件下或者当施用于动物或人类时, 所述氨基酸残基参与同其它包含与人 Ig 之 CH 区相同的氨基酸序列的肽形成二硫键或者共价或稳定非共价的重链间键, 其中该编码选定的抗原特异性抗体之 VH 区的核苷酸序列和该编码所述 Ig 之 CH 区的核苷酸序列可操作地连接在一起;

iii) 提供用于产生所述单价抗体的细胞表达系统;

iv) 通过在 (iii) 的细胞表达系统的细胞中共表达 (i) 和 (ii) 的核酸构建体产生所述

单价抗体。

65. 权利要求 63 的抗体,其中该单价抗体包括

(i) 权利要求 1-26 的抗体的可变区或所述区的抗原结合部分,和

(ii) 免疫球蛋白 C_H 区或其包括 C_H2 和 C_H3 区的片段,其中该 C_H 区或其片段已被修饰,从而使相当于铰链区的区域,以及,如果免疫球蛋白不是 IgG4 亚型, C_H 区的其它区域,例如 C_H3 区,不含有任何在多克隆人 IgG 存在下能够与相同的 C_H 区形成二硫键或者与相同的 C_H 区形成其它共价或稳定非共价重链间键的氨基酸残基。

66. 权利要求 63-65 中任一项的抗体,其中该重链已被修饰,使得整个铰链已被删除。

67. 一种双特异性分子,包括权利要求 1-62 中任一项的抗体以及第二结合特异性,例如对人效应物细胞、人 Fc 受体或 T 细胞受体的结合特异性。

68. 一种表达载体,包括编码选自 SEQ ID NO:1-SEQ ID NO:112 的一个或多个氨基酸序列的核苷酸序列。

69. 根据权利要求 68 的表达载体,进一步包括编码人抗体的轻链恒定区、重链恒定区、或轻链和重链二者的恒定区的核苷酸序列。

70. 一种重组真核或原核宿主细胞,其产生如权利要求 1-59 或 61-66 中任一项所限定的抗体。

71. 一种药物组合物,其包含如权利要求 1-54 中任一项限定的抗体,或者如权利要求 67 所限定的双特异性分子,以及药学可接受的载体。

72. 如权利要求 1-66 中任一项限定的抗体或如权利要求 67 中所限定的双特异性分子,其用于作为药物的用途。

73. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗癌症。

74. 权利要求 73 的抗体或双特异性分子,其中该癌症选自下组:中枢神经系统肿瘤、头颈癌、肺癌、乳腺癌、食道癌、胃癌、肝和胆癌、胰腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、恶性黑素瘤、肉瘤、原始起源不明的肿瘤、骨髓癌、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤、皮肤癌、神经胶质瘤、脑的癌症、子宫的癌症和直肠的癌症。

75. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗胰腺癌。

76. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗结肠直肠癌。

77. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗卵巢癌。

78. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗乳腺癌。

79. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗前列腺癌。

80. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该用途是用于治疗膀胱癌。

81. 权利要求 72 的抗体或双特异性分子,其中该药物用于与一种或多种其它治疗剂如化疗剂组合治疗癌症。

82. 权利要求 1-66 中任一项的抗体或权利要求 697 的双特异性分子在制造用于治疗癌症的药物中的用途。

83. 权利要求 82 的用途,其包含权利要求中 74-81 任一项的附加特征。

84. 一种用于抑制表达组织因子的肿瘤细胞的生长和 / 或增殖的方法,包括向有需要的个体施用权利要求 1-66 中任一项的抗体或如权利要求 67 所限定的双特异性分子。

85. 一种用于产生权利要求 1-59 或 61-66 中任一项的抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

- a) 培养权利要求 70 的宿主细胞,和
- b) 从培养基中纯化抗体。

86. 一种诊断用组合物,包含如权利要求 1-67 中任一项限定的抗体。

87. 一种用于检测样品中组织因子之存在的方法,包括:

- 使样品与权利要求 1-66 任一项的抗体或权利要求 67 的双特异性分子在允许所述抗体或双特异性分子同组织因子之间形成复合体的条件下接触;和

- 分析是否形成了复合体。

88. 一种用于检测样品中组织因子之存在的试剂盒,包括

- 权利要求 1-66 中任一项的抗体或权利要求 67 的双特异性分子;和

- 使用该试剂盒的说明。

针对组织因子的人抗体

发明领域

[0001] 本发明涉及针对组织因子,特别是人组织因子的抗体,和这类抗体的用途,特别是它们在治疗癌症、炎症和血管疾病中的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 组织因子 (TF), 也称作促凝血酶原激酶 (thromboplastin)、因子 III 或 CD142, 是一种存在于内皮下组织、血小板和白细胞中的蛋白质, 是引发从酶原凝血酶原 (prothrombin) 形成凝血酶所必需的。凝血酶形成最终导致血液凝固。组织因子使细胞能够触发凝血级联, 并且发挥凝血因子 VII 高亲和力受体的功能。所得到的复合体提供一种催化事件, 该事件负责通过特异的限制性蛋白水解 (limited proteolysis) 引发凝血蛋白酶级联。与这些蛋白酶级联中其它作为无功能前体形式进行循环的辅助因子不同, 这种因子是一种强力的引发剂 (initiator), 其表达在细胞表面上时即具有完全的功能。

[0004] 组织因子是丝氨酸蛋白酶因子 VIIa (FVIIa) 的细胞表面受体。FVIIa 与组织因子的结合已经被发现可以在细胞内开始信号传递过程, 所述信号传递功能在血管发生中发挥作用。尽管血管发生在生长和发育以及伤口愈合中是一种正常的过程, 但是它也是肿瘤从休眠状态转变成恶性状态过程中的一个基本步骤: 当癌细胞获得可以产生参与血管发生的蛋白质, 即所谓的血管发生生长因子, 的能力时, 这些蛋白质被肿瘤释放到附近组织内, 并刺激现有的健康血管朝着肿瘤萌生出 (sprout) 新血管并进入肿瘤内部。一旦新血管进入肿瘤内, 它就能够快速增大其尺寸, 并侵袭局部的组织和器官。通过这些新血管, 癌细胞可以进一步逃逸进入循环中, 并栖息于其它器官内形成新的肿瘤 (转移)。

[0005] 此外, TF 在炎症中发挥作用。TF 的作用被认为是通过血液凝固介导的 (A. J. Chu: "Tissue factor mediates inflammation" in Archives of biochemistry and biophysics, 2005, vol. 440, No. 2, pp. 123-132)。因此, 通过例如单克隆抗-TF 抗体抑制 TF, 在干扰凝固-炎症循环中具有重要意义, 不仅有助于抗炎而且有助于抗血管疾病。

[0006] TF 表达在许多类型的癌症中均被观察到, 并且与侵袭性较高的疾病有关。而且, 人 TF 还以一种可变剪接形式存在, 即 asHTF。最近发现, asHTF 促进肿瘤生长 (Hobbs et al. 2007 Thrombosis Res. 120(2)S13-S21)。

[0007] 在先前技术中已经公开了与 TF 结合的抗体:

[0008] W098/40408 公开了能够结合天然 (native) 人 TF 的抗体, 单独存在或者存在于 TF:VIIa 复合体中, 可有效阻止因子 X 结合到 TF 或该复合体, 借此降低凝血。该文献公开了该抗体可用于减轻侵入性医疗程序 (invasive medical procedure), 例如动脉或心脏手术, 后的血栓形成, 或者消除由于使用医疗措施 (medical implementation) 引发的凝血。其他抗体被公开用于体内诊断方法, 包括天然人 TF 的体内诊断成像。

[0009] W004/094475 提供了能够与人组织因子结合的抗体, 其与正常血浆对照相比, 不抑制因子介导的凝血。没有描述人抗体。据称, 该抗体可用于治疗癌症。

[0010] W003/093422 涉及与 TF:VIIa 复合体的结合亲和力大于与 TF 本身的结合亲和力的抗体。并提出了这些抗体作为抗凝剂在某些疾病治疗中的用途, 例如败血症、弥散性血管内

凝血、缺血性脑卒中、血栓形成、急性冠状动脉综合症和晚期癌症中的凝血病。

[0011] W001/27079 公开了组合物和方法,用于抑制异常细胞增殖,特别是内皮细胞增殖,例如癌症,胚胎异常发育,免疫应答机能失常,以及与新生血管化和肿瘤生长有关的血管发生。提供了许多活性物质,包括抗体,但没有公开具体的抗体。

[0012] W003/037361 涉及 TF 激动剂或拮抗剂用于细胞凋亡相关的治疗的用途。

[0013] W003/029295 涉及分离的人抗体,其与人 TF 免疫反应,抑制凝血因子 VIIa 的结合。然而,该申请没有公开具有这些性质的抗体的任何实例。

[0014] 已经有若干单克隆抗体疗法被批准用于治疗不同类型的肿瘤,包括例如贝伐单抗 (bevacizumab) (Avastin®),西妥昔单抗 (cetuximab) (Erbix®),帕尼单抗 (panitumumab) (Vectibix™) 和曲妥单抗 (trastuzumab) (Herceptin®)。

发明概要

[0015] 尽管已经取得了许多进展,但是仍然需要有基于治疗性抗体的改进方法用于治疗严重的疾病,例如改进的癌症治疗。

[0016] 本发明的一个目的是提供用于医疗用途的新的特异性、有效的人抗-TF 抗体。本发明抗体显示与本领域中已有描述的抗体不同的 TF 结合特性。在优选实施方案中,本发明的抗体对人组织因子具有高亲和力,介导抗体依赖的细胞毒性 (ADCC),抑制 FVIIa 结合 TF,抑制 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化和 IL-8 释放,不抑制或者较弱地抑制凝血。

[0017] 附图简述

[0018] 图 1:本发明抗体的序列比对。

[0019] 根据 IMGT 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 被高亮显示:斜体的序列代表 CDR1 区,加下划线的序列代表 CDR2 区,粗体的序列代表 CDR3 区。

[0020] 图 2: IgG4 序列 (SEQ ID NO: 113-114)

[0021] SEQ ID NO: 113:野生型人 IgG4CH 区的氨基酸序列。斜体的序列代表 CH1 区,高亮的序列代表铰链区,规则序列代表 CH2 区,加下划线的序列代表 CH3 区。

[0022] SEQ ID NO: 114:人 IgG4 的无铰链 CH 区的氨基酸序列。

[0023] 图 3:抗-TF 人单抗与 TF 胞外域的结合。

[0024] 图 4:抗-TF 人单抗与膜结合的 TF 的结合。

[0025] 图 5:抑制 FVIIa 与 TF 结合。

[0026] 图 6:抑制 FVIIa 诱发的 ERK 磷酸化。

[0027] 图 6a:抑制 FVIIa 诱发的 ERK 磷酸化 (phosphorylation)。

[0028] 图 7:抑制 FVIIa 诱发的 IL-8 释放。

[0029] 图 8:抑制 FXa 产生。

[0030] 图 9:抑制血液凝固。

[0031] 图 10:TF- 人单抗通过 ADCC 诱导 Bx-PC3 细胞溶解。

[0032] 图 11:补体组分 C3c 和 C4c 沉积在靶细胞上。

[0033] 图 12:TF 人单抗与肾小球结合的免疫组化分析。

[0034] 图 13:TF- 人单抗与胰腺肿瘤结合的免疫组化分析。

[0035] 图 14:TF- 人单抗在已建立的 MDA-MB-231 肿瘤异种移植物中的体内效力。

[0036] 图 15 :食蟹猴 (cynomolgus monkeys) 中通过静脉内注射 TF 特异性人单抗 011 在后确定的出血时间。抗体在第 1 (0mg/kg), 8 (1mg/kg), 15 (10mg/kg) 和 22 (100mg/kg) 天施用。

[0037] 图 16 :TF- 人单抗在预防性的已建立的 BX-PC3 肿瘤异种移植植物中的体内效力。

[0038] 图 17 :改组改组构建体和 TF 域。

[0039] 图 18 :抗 -TF 抗体与 TF 改组改组构建体的结合。

[0040] 图 19 :人单抗 -TF Fab 片段与 TF 胞外域的结合, ELISA。

[0041] 图 20 :人单抗 -TF Fab 片段与 TF 胞外域的结合, FACS。

[0042] 图 21 :依赖于所表达的 TF 分子的数目的抗 -TF 人单抗的结合谱。

[0043] 发明详细说明

[0044] 定义

[0045] 术语“组织因子”、“TF”、“CD142”、“组织因子抗原”、“TF 抗原”和“CD142 抗原”在这里可互换使用, 并且除非明确指出, 包括由细胞天然表达的或在用组织因子基因转染的细胞上表达的人组织因子的任何变体、同种型和物种同源物。

[0046] 术语“免疫球蛋白”是指一类结构上相关的糖蛋白, 由两对多肽链构成, 一对轻 (L) 低分子量链和一对重 (H) 链, 所有四条链可以通过二硫键内部连接。免疫球蛋白的结构已经得到充分表征。见例如 *Fundamental Immunology* 第 7 章 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N. Y. (1989))。简而言之, 每条重链典型地由重链可变区 (这里缩写为 V_H 或 VH) 和重链恒定区构成。重链恒定区典型地由三个结构域构成: C_H1 , C_H2 和 C_H3 。每条轻链典型地由轻链可变区 (这里缩写为 V_L 或 VL) 和轻链恒定区构成。轻链恒定区典型地由一个结构域构成: C_L 。 V_H 和 V_L 区可以进一步再分成超可变区 (或超变区, 其在结构限定环的序列和 / 或形式方面可有极高的可变性), 也称作补体决定区 (CDRs), 它们之间间散布着更保守的、称作框架区 (FR) 的区域。每个 V_H 和 V_L 典型地由三个 CDR 和 4 个 FR 构成, 从氨基端向羧基端按照如下的次序排列: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (另见 Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987))。典型地, 该区域中氨基酸残基的编号是根据 IMGT., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第五版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (“与如 Kabat 中相同或者根据 Kabat 的编号的可变区残基”等短语, 在本文中对于重链可变区或轻链可变区而言, 是参考这种编号系统的)。使用这种编号系统, 肽的实际线性氨基酸序列可能含有更少或更多的氨基酸, 相应于可变区 FR 或 CDR 的缩短或插入。例如, 重链可变区可能在 V_H CDR2 残基 52 后面包含一个单氨基酸插入 (根据 Kabat, 残基 52a), 和在重链 FR 残基 82 后面包含多个插入残基 (例如根据 Kabat, 残基 82a, 82b 和 82c 等)。给定抗体的残基的 Kabat 编号可以通过在该抗体序列的同源区与“标准”Kabat 编号序列进行比对加以确定。

[0047] 在本发明的上下文中, 术语“抗体” (Ab) 是指免疫球蛋白分子, 免疫球蛋白分子的片段, 或其衍生物, 其在典型的生理条件下具有与抗原特异性结合的能力, 具有相当时间的半寿期, 例如至少大约 30 分钟, 至少大约 45 分钟, 至少大约 1 小时, 至少大约 2 小时, 至少大约 4 小时, 至少大约 8 小时, 至少大约 12 小时, 大约 24 小时或者更长, 大约 48 小时或者更长, 大约 3、4、5、6、7 或更多天等, 或者任何其它相关的功能上限定的期间 (例如足够诱发、促进、提高和 / 或调节与抗体与抗原的结合关联的生理应答的时间, 和 / 或足以供抗

体募集效应物活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原互作的结合域。抗体 (Abs) 的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的各种细胞 (例如效应物细胞) 和补体系统的组分,例如 C1q, 补体活化经典途径中的第一组分。抗-TF 抗体还可以是双特异性抗体、双抗体 (diabody) 或类似分子 (双抗体的描述见例如 PNAS USA 90(14), 6444-8(1993))。确实,本发明提供的双特异性抗体、双抗体等除了结合组织因子的一部分或组织因子 FVIIa 复合体之外,还可以结合任何合适的靶标。如前所述,除非在上下文中另外指出或明显有矛盾,在这里,术语“抗体”包括抗体保持与抗原特异性结合能力的片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。涵盖在术语“抗体”中的结合片段的实例包括 (i) Fab' 或 Fab 片段,一种由 V_L , V_H , C_L 和 C_H1 域构成的单价片段,或者如 W02007059782 (Genmab) 中描述的单价抗体;(ii) $F(ab')_2$ 片段、包含两个通过在铰链区中的二硫桥连接的 Fab 片段的双价片段;(iii) 基本上由 V_H 和 C_H1 域组成的 Fd 片段;(iv) 基本上由 V_L 和 V_H 域组成的 Fv 片段;(v) dAb 片段 (Ward et al., Nature 341, 544-546(1989)), 其基本上由 V_H 域构成,也称作结构域抗体 (Holt et al.; Trends Biotechnol. 2003 Nov; 21(11): 484-90);(vi) 骆驼抗体 (camelid) 或纳米抗体 (nanobodies) (Revets et al.; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan; 5(1): 111-24), 和 (vii) 分离的补体决定区 (CDR)。而且,尽管 Fv 片段的两个域, V_L 和 V_H , 是由不同的基因编码的,但是它们可以通过合成的接头用重组方法连接起来,该合成的接头能够使它们作为单个蛋白链制造出来,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子 (称作单链抗体或单链 Fv (scFv), 见例如 Bird et al., Science 242, 423-426(1988) 和 Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883(1988))。除非另外指出或上下文中明确指明,这些单链抗体包含在术语“抗体”的范围内。尽管这些片段一般包含在抗体的意思之内,它们总体上并且各自独立地构成本发明的独特特征,显示不同的生物学性质和效用。在本发明的上下文中,进一步讨论了这些和其它有用的抗体片段。还应当理解,除非另外指出,否则术语“抗体”还包括用任何已知的技术提供多克隆抗体、单克隆抗体 (单抗)、抗体样多肽,例如嵌合抗体和人源化抗体,以及抗体的保留与抗原特异性结合能力的片段 (抗原结合片段),所述已知技术例如酶法切割 (enzymatic cleavage)、肽合成和重组技术。所产生的抗体可以具有任何同种型。

[0048] “抗-TF 抗体”是如上所述的抗体,其与抗原组织因子特异结合。

[0049] 如这里所使用的,术语“人抗体”意图包括具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基 (例如通过体外随机或定点诱变,或在基因改组期间或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而,如这里所使用的,术语“人抗体”不意图包括如下的抗体,其中来自另一种哺乳动物物种 (例如小鼠) 种系的 CDR 序列被嫁接到人框架序列上。

[0050] 在一个优选实施方案中,本发明的抗体是分离的。如这里所使用的,“分离的抗体”意图指示如下的抗体,其基本上不含其它具有不同抗原特异性的抗体 (例如,特异结合组织因子的分离抗体基本上不含特异结合除组织因子之外的抗原的抗体)。然而,特异结合人组织因子的表位、同种型或变体的分离抗体可以同其它相关抗原,例如来自其它物种的抗原 (例如组织因子种间同源物) 具有交叉反应性。而且,分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和 / 或化学剂。在本发明的一个实施方案中,两种或多种具有不同抗原结合特异性的“分离”单克隆抗体被组合在良好限定的组合物中。

[0051] 当在本文上下文中使用两种或多种抗体时,术语“与... 竞争”或“与... 交叉竞争”是指,两个或多个抗体竞争结合 TF,例如在本文实施例 6 中所述的测定中竞争结合 TF。对于一些抗体对,实施例 6 中测定方法中的竞争只有在将一种抗体包被在平板上,而用另一种进行竞争时才能观察到,但反之则不行。当在本文中使用时,术语“与... 竞争”还意图涵盖这些组合抗体。

[0052] 如这里所使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指具有单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物显示对特定表位的单一的结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示单一结合特异性的抗体,其具有来自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。人单克隆抗体可以通过杂交瘤产生,杂交瘤包含与永生生化细胞融合的、从转基因或转染色体非人类动物(例如转基因小鼠)获得的 B 细胞,该动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0053] 如这里所使用的,在抗体与预定抗原的结合的语境中,术语“结合”典型地是其以相当于 K_D 大约 $10^{-7}M$ 或者更小,例如大约 $10^{-8}M$ 或者更小,例如大约 $10^{-9}M$ 或者更小,大约 $10^{-10}M$ 或者更小,或者大约 $10^{-11}M$ 或者更小的亲和力结合(例如当在 BIAcore 3000 设备中用抗原作为配体、以抗体作为分析物通过表面等离子体共振 (SPR) 技术进行测定时),并且与预定抗原的结合亲和力与除预定抗体或密切相关的抗原之外的非特异性抗原(例如 BSA 或酪蛋白)的结合亲和力相比,与预定抗原的 K_D 比与非特异抗原的 K_D 低至少 10 倍,例如至少低 100 倍,例如至少低 1,000 倍,例如至少低 10,000 倍,例如至少低 100,000 倍。亲和力低出的量取决于抗体的 K_D ,因此当抗体的 K_D 非常低时(即抗体高度特异),对抗原的亲和力低于对非特异性抗原的亲合力量可以是至少 10,000 倍。

[0054] 如这里所使用的,术语“ k_d ”(sec⁻¹)是指特定抗体-抗原互作的解离速率常数。所述值也称作 k_{off} 值。

[0055] 如这里所使用的,术语“ k_a ”(M⁻¹x sec⁻¹)是指特定抗体-抗原互作的结合速率常数。

[0056] 如这里所使用的,术语“ K_D ”(M)是指特定抗体-抗原互作的解离平衡常数。

[0057] 如这里所使用的,术语“ K_A ”(M⁻¹)是指特定抗体-抗原互作的结合平衡常数,并且通过 k_a 除以 k_d 获得。

[0058] 本发明还提供了包括实施例抗体的 V_L 区、 V_H 区、或一个或多个 CDR 的功能变体的抗体。在抗-TF 抗体的语境中使用的 V_L 、 V_H 或 CDR 的功能变体仍然允许该抗体保留本发明抗体的亲和力/亲合力和/或特异性/选择性的至少相当部分(至少大约 50%,60%,70%,80%,90%,95%或更多),并且在一些情况下,这种抗-TF 抗体可以有比亲本抗体更大的亲和力、选择性和/或特异性。

[0059] 这些功能变体典型地保留与亲本抗体的显著序列同一性。两条序列之间的百分比同一性是序列所分享的相同位置的数目的函数(即, %同源性=相同位置数/总位置数x100),同时考虑缺口的数目和每个缺口的长度,缺口的引入是为了在两条序列间进行最佳比对的需要。两条序列之间的序列比对和百分比同一性的确定可以用数学算法实现,如下面非限制性实例中所述。

[0060] 两条核苷酸序列之间的百分比同一性可以用 GCG 软件包(可在 <http://www.gcg.com> 获得)中的 GAP 程序加以确定,使用 NWSgapdna.CMP 矩阵,缺口权重为 40、50、60、70 或

80,和长度权重 1、2、3、4、5 或 6。两条核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性还可以用 E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* **4**, 11-17 (1988)) 的算法加以确定,其已经被引入到 ALIGN 程序 (2.0 版) 中,使用 PAM120 加权残基表,缺口长度罚分为 12,缺口罚分为 4。此外,两条氨基酸序列之间的百分比同一性可以用 Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* **48**, 444-453 (1970)) 算法加以确定,其被引入到 GCG 软件包 (可以从 <http://www.gcg.com> 获得) 的 GAP 程序中,使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵,缺口权重为 16、14、12、10、8、6、或 4,长度权重为 1、2、3、4、5、或 6。

[0061] CDR 变体的序列可以通过主要是保守的替换而与亲本抗体序列的 CDR 序列不同,例如变体的替换中有至少大约 35%、大约 50%或更多、大约 60%或更多、大约 70%或更多、大约 75%或更多、大约 80%或更多、大约 85%或更多、大约 90%或更多、大约 95%或更多 (例如大约 65-99%,例如大约 96%,97%或 98%) 是保守的氨基酸残基替换。

[0062] CDR 变体的序列可以通过主要是保守的替换而与亲本抗体序列的 CDR 序列不同,例如变体中的至少 10 个替换,例如至少 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个替换是保守的氨基酸残基替换。

[0063] 在本发明的上下文中,保守替换可以用下列三个表格中的一个或多个中反映的氨基酸分类中的替换加以定义。

[0064] 用于保守替换的氨基酸残基分类

[0065]

酸性残基	Asp (D) 和 Glu (E)
碱性残基	Lys (K), Arg (R), 和 His (H)
亲水性不带电残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), 和 Gln (Q)
脂肪族不带电残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), 和 Ile (I)
非极性不带电残基	Cys (C), Met (M), 和 Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), 和 Trp (W)

[0066] 其他保守氨基酸残基替换分类

[0067]

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M

6	F	Y	W
---	---	---	---

[0068] 氨基酸残基的其他物理和功能分类

[0069]

含醇基残基	S 和 T
脂肪族残基	I, L, V, 和 M
环烯烃相关残基	F, H, W, 和 Y
疏水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, 和 Y
带负电残基	D 和 E
极性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, 和 T
带正电残基	H, K, 和 R
小残基	A, C, D, G, N, P, S, T, 和 V
极小残基	A, G, 和 S
参与转角形成的残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, 和 T
柔性残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, 和 R

[0070] 更多的保守替换分组包括：缬氨酸 - 亮氨酸 - 异亮氨酸、苯丙氨酸 - 酪氨酸、赖氨酸 - 精氨酸、丙氨酸 - 缬氨酸、和天冬氨酸 - 谷氨酸。

[0071] 也可以用例如下列文献中介绍的原则制定其他氨基酸分组：Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* (2d Ed. 1993), W. H. Freeman and Company。

[0072] 在本发明的一个实施方案中，与实施例的抗体的 CDR 相比，变体 CDR 中也基本上保持在亲水 (hydropathic)/ 亲水 (hydrophilic) 性质和残基重量 / 大小方面的保守性 (例如，序列的重量分类 (weight class)、亲水得分或两者被保留至少大约 50%、至少大约 60%、至少大约 70%、至少大约 75%、至少大约 80%、至少大约 85%、至少大约 90%、至少大约 95%、或者更多 (例如大约 65-99%))。例如，保守的残基替换还可以是，或者作为备选可以是，基于强或弱或者基于重量的保守基团 (strong or weak based weight based conservation groups) 的替换，这是现有技术已知的。

[0073] 保留相似的残基还可以或者作为备选可以通过使用 BLAST 程序确定的相似得分进行测量 (例如可以通过 NCBI 访问的 BLAST 2.2.8, 使用标准设定 BLOSUM62, 开放缺口 = 11 和延长缺口 = 1)。合适的变体与亲本肽相比，显示至少大约 45%，例如至少大约 55%，至少大约 65%，至少大约 75%，至少大约 85%，至少大约 90%，至少大约 95%，或更多 (例如大约 70-99%) 的相似性。

[0074] 如这里所使用的,“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白家族(例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 或 IgM)。

[0075] 术语“表位”是指能够特异结合抗体的蛋白决定簇。表位通常由分子的表面基团构成,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征,以及特定的带电特征。构象表位和非构象表位的区别在于,在变性剂存在下,与前者的结合消失,而与后者的结合不消失。表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基(也称作表位的免疫优势组分(immunodominant component)),和其它不直接参与结合的氨基酸残基,例如可以被特异抗原结合肽有效阻断的氨基酸残基(换言之,这些氨基酸残基位于特异抗原结合肽的足迹(footprint)内)。

[0076] 如这里所使用的,如果抗体是从使用人免疫球蛋白序列的系统获得的(例如通过免疫携带有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠或者通过筛选人免疫球蛋白基因库),并且其中所选人抗体 V 域序列在氨基酸 V 域序列上与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列具有至少 90%,例如至少 95%,例如至少 96%,例如至少 97%,例如至少 98%,或者例如至少 99%的相似性,则称该人抗体“源自”特定的种系序列。典型地,除了重链 CDR3,来自特定人种系序列的人抗体与由该种系免疫球蛋白基因编码的氨基酸序列相比,显示不超过 20 个氨基酸的差异,例如不超过 10 个氨基酸的差异,例如不超过 9、8、7、6 或 5 个,例如不超过 4、3、2 或 1 个氨基酸的差异。

[0077] 如这里所使用的,术语“抑制生长”(例如针对细胞,如肿瘤细胞)意图包括在与抗-TF 抗体接触时,和与抗-TF 抗体接触的相同的细胞的生长相比,细胞生长的任何可测量的降低,例如,抑制细胞培养物生长至少大约 10%,20%,30%,40%,50%,60%,70%,80%,90%,99%,或 100%。这种细胞生长降低可以通过多种机制发生,例如效应物细胞吞噬、ADCC、CDC 和 / 或细胞凋亡。

[0078] 术语“双特异性分子”意图包括任何具有两种不同结合特异性的试剂,例如蛋白质、肽、或蛋白或肽复合体。例如,分子可以结合 (a) 细胞表面抗原和 (b) 效应物表面上的 Fc 受体或与 (a) 细胞表面抗原和 (b) 效应物表面上的 Fc 受体互作。术语“双特异性抗体”意图包括任何抗-TF 抗体,其是双特异性分子。术语“双特异性抗体”还包括双抗体。双抗体是二价、双特异性的抗体,其中 V_H 和 V_L 域表达在单个多肽链上,但是用一个短到不能令相同链上的两个结构域配对的接头连接,借此迫使这些域与另一条链上的互补域配对,并产生两个抗原结合位点(见例如 Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448(1993), Poljak, R. J. et al., Structure 2, 1121-1123(1994))。

[0079] “效应物功能有缺陷的抗体”或“效应物功能缺陷抗体”是指如下的抗体,其激活一种或多种效应物机制(例如补体活化或 Fc 受体结合)的能力显著降低或者缺无。因此,效应物功能缺陷抗体的介导抗体依赖的细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和 / 或补体依赖的细胞毒作用(CDC)的能力显著降低或缺无。这种抗体的一个实例是 IgG4。

[0080] 术语“单价抗体”在本发明的上下文中意思是抗体分子能够结合单个抗原分子,因此无抗原交联能力。

[0081] 术语“稳定化的 IgG4 抗体”是指被修饰减少了半分子交换的 IgG4 抗体(见 van der Neut Kolfshoten M et al. (2007) Science 14;317(5844) 和其中的参考文献,另见 Labrijn et al. (2009) Nature Biotechnology, 27, 767-771)。

[0082] 如这里所使用的,术语“效应物细胞”是指参与免疫应答的效应阶段(与免疫应答的识别阶段和活化阶段相对)的免疫细胞。免疫细胞实例包括骨髓或淋巴来源的细胞,例如淋巴细胞(例如B细胞和T细胞,包括溶细胞性T细胞(cytolytic T cell)(CTL)、杀伤细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、多形核细胞,例如中性粒细胞、粒细胞、肥大细胞和嗜碱性细胞。一些效应物细胞表达特定的Fc受体,并执行特定的免疫功能。在一些实施方案中,效应物细胞能够诱导抗体依赖的细胞细胞毒性(ADCC),例如天然杀伤细胞,能够诱导ADCC。例如,表达FcR的单核细胞和巨噬细胞参与特异性杀伤靶细胞并向免疫系统的其它组分呈递抗原,或者与呈递抗原的细胞结合。在一个实施方案中,效应物细胞可以吞噬靶抗原或者靶细胞。特定的FcR在效应物细胞上的表达可以被体液因子,例如细胞因子,所调节。例如,已经发现,Fc γ RI的表达被干扰素 γ (IFN- γ)和/或G-CSF上调。这种被提高的表达可增加携带Fc γ RI的细胞对靶标的细胞毒性。效应物细胞能够吞噬或裂解靶抗原或靶细胞。

[0083] 如这里所使用的,术语“载体”意图指示能够转运另一个与之连接的核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环形双链DNA环,其中可以连接额外的DNA节段。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA节段可以被连接到病毒基因组内。某些载体能够在引入它们的宿主细胞内自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和附加体型哺乳动物载体)。其它的载体(例如非附加体型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中后可以整合到宿主细胞的基因组内,借此与宿主基因组一起复制。而且,某些载体能够指导与之可操作连接的基因的表达。这些载体在本文中称作“重组表达载体”(或者简称为“表达载体”)。一般地,重组DNA技术中有用的表达载体经常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最经常使用的载体形式。然而,本发明意图包括这些其它形式的表达载体,例如病毒载体(复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒),它们发挥等价的功能。

[0084] 如这里所使用的,术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)意图指示其中引入了表达载体的细胞。应当理解,这些术语意图不仅指示特定的对象细胞,还指示这些细胞的后代。因为可能由于突变或环境影响在后继世代中发生某些修饰,所以这些后代可能实际上不会与亲本细胞完全相同,但仍然包含在这里所用的术语“宿主细胞”的范围内。重组宿主细胞包括例如转染瘤(transfectomas),例如CHO细胞、HEK293细胞、NS/0细胞和淋巴细胞。

[0085] 如这里所使用的,术语“转染瘤”包括表达抗体的重组真核宿主细胞,例如CHO细胞、NS/0细胞、HEK293细胞、植物细胞或真菌,包括酵母细胞。

[0086] 术语“转基因非人类动物”是指如下的非人类动物,其基因组包括一个或多个重链和/或轻链转基因或转染色体(整合或者不整合到动物的天然基因组DNA中),并且能够表达完全的人抗体。例如,转基因小鼠可具有人轻链转基因,以及人重链转基因或人重链转染色体,从而当用TF抗原和/或表达TF的细胞进行免疫时,小鼠可以产生人抗-TF抗体。人重链转基因可以整合到小鼠的染色体DNA中,如同在转基因小鼠(如人单抗小鼠例如HCo7或HCo12小鼠)中那样,或者人重链转基因可以保持在染色体外部,如在W002/43478中记载的转染色体KM小鼠中那样。这些转基因和转染色体小鼠(这里统称作“转基因小鼠”)能够通过V-D-J重组和同种型转换针对给定抗原产生多种同种型(例如IgG,IgA,IgM,IgD

和 / 或 IgE) 的人单克隆抗体。还可以通过导入编码这样的特异抗体的基因利用转基因非人动物于产生针对特定抗原的抗体, 例如通过将基因与在动物乳汁中表达的基因可操作连接。

[0087] “治疗”是指施加有效量的本发明治疗活性化合物, 用于缓解、减轻、遏制或根除 (治愈) 病症或疾病状态。

[0088] “有效量”是指在必要的剂量和时程下, 可有效获得期望治疗结果的量。治疗有效量的抗-TF 抗体可以随着多种因素而改变, 例如个体的疾病状态、年龄、性别和体重, 以及抗-TF 抗体在个体内引发期望的应答的能力。治疗有效量还是这样的量, 其中抗体或抗体部分的在治疗上益处超过其任何毒性或有害作用。

[0089] “抗-独特型 (anti-idiotypic)”(Id) 抗体是指如下的抗体, 其识别一般与抗体的抗原结合位点相关联的独特决定簇。

[0090] 发明进一步的方面和实施方案

[0091] 如上所述, 在第一个方面中, 本发明涉及一种人抗体, 其与人组织因子结合。

[0092] 在一个实施方案中, 当用实施例 13 中所述的测定方法进行测定时, 抗体与组织因子胞外域结合的表观亲和力 (EC_{50}) 为 3nM 或更低, 例如 0.50nM 或更低, 例如 0.35nM 或更低, 例如 0.20nM 或更低, 例如 0.1nM 或更低。

[0093] 在另一个实施方案中, 抗体与表达组织因子的哺乳动物细胞 (例如被编码组织因子的构建体转染的 A431 细胞) 结合, 优选地, 当用实施例 14 中所述的测定方法进行测定时, 其表观亲和力 (EC_{50}) 优选地为 10nM 或更低, 例如 8nM 或更低, 例如 5nM 或更低, 例如 2nM 或更低, 例如 1nM 或更低, 例如 0.5nM 或更低, 例如 0.3nM 或更低。

[0094] 在另一个实施方案中, 所述抗体能够在 A431 细胞内诱发抗体依赖的细胞毒性, 优选地, 当用实施例 20 中所述的测定方法进行测定时, EC_{50} 值为 2nM 或更低, 例如 1nM 或更低, 例如 0.7nM 或更低, 或者 0.3nM 或更低, 例如 0.20nM 或更低, 或者 0.1nM 或更低, 或者 0.05nM 或更低。

[0095] 在另一个实施方案中, 当用实施例 24 中所述的方法进行测定时, 该抗体可有效抑制已建立的 MDA-MB-231 肿瘤的生长, 和 / 或当用实施例 26 中所述的方法进行测定时, 可抑制已建立的 BxPC3 肿瘤的生长。

[0096] 在另一个实施方案中, 所述抗体可抑制组织因子诱导的凝血, 优选地, 当用实施例 19 中所述的测定方法进行测定时, 中值抑制浓度小于 10nM, 例如小于 5nM, 例如小于 2nM, 例如小于 1nM。

[0097] 在另一个实施方案中, 抗体不抑制凝血。在一个实施方案中, 与天然水平相比, 凝血被抑制最多 30%, 例如 25%、例如 20%、例如 15%、例如 10% 或例如 5%。

[0098] 在进一步的实施方案中, 抗体可抑制 FVIIa 与组织因子结合, 优选地, 当用实施例 15 中所述的测定方法进行测定时, 其最大抑制值为大于 80%, 例如大于 90% 的抑制。

[0099] 在进一步的实施方案中, 抗体可抑制 FVIIa 诱导的 MDA-MB-231 细胞 IL-8 释放, 优选地, 当用实施例 17 中所述的测定方法进行测定时, 最大抑制值为大于 40%, 例如大于 50%, 例如大于 60% 的抑制。

[0100] 在进一步的实施方案中, 抗体可抑制 TF/FVIIa 复合体将 FX 转变成 Fxa, 优选地, 当用实施例 18 中所述的测定方法进行测定时, 抑制小于 50%, 例如小于 40%, 例如在 1-30%

的范围内。

[0101] 在进一步的实施方案中,抗体与如下的抗体竞争结合组织因子,该抗体包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区。

[0102] 在进一步的实施方案中,本发明抗体与组织因子的结合不涉及如下的三个残基的全部:组织因子 45 位的 W,46 位的 K 或 94 位的 Y。在更进一步的实施方案中,该结合不涉及下列任一残基:45 位的 W,46 位的 K 或 94 位的 Y(这些编码参考成熟 TF,在 Genbank 条目 NP_001984 中等价的位置是 77,78 和 126)。

[0103] 在本发明抗体的另一个实施方案中,抗体与如下的抗体竞争结合组织因子,该抗体包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区。

[0104] 在进一步的实施方案中,抗体可抑制 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化,优选地,当用实施例 16 中所述的测定方法进行测定时,其中值抑制浓度小于 10nM,例如小于 5nM,例如小于 2nM。

[0105] 在进一步的实施方案中,抗体可抑制 ERK 磷酸化,优选地,当用实施例 16 中所述的测定方法进行测定时,其中值抑制浓度小于 10nM,例如小于 5nM,例如小于 2nM,并且当用实施例 17 中所述的测定方法进行测定时,对 FVII 诱导的 IL-8 释放的抑制最大不超过 10%。

[0106] 在进一步的实施方案中,抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积,优选地,其中按照实施例 21 中所述地进行测定,该抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积。

[0107] 在进一步的实施方案中,当用 ELISA 进行测量时,抗体 Fab 片段与如实施例 28 中所述的组织因子胞外域结合的 EC50 值低于 0.1 μ g/mL,例如低于 0.05 μ g/mL,例如低于 0.04 μ g/mL。

[0108] 在进一步的实施方案中,当用 ELISA 进行测量时,抗体 Fab 片段与如实施例 28 中所述的组织因子胞外域结合的 EC50 值高于 1.0 μ g/mL。

[0109] 在进一步的实施方案中,抗体 Fab 片段与如实施例 28 中所述的组织因子胞外域结合的 EC50 值低于 10 μ g/mL,例如低于 1 μ g/mL,例如低于 0.5 μ g/mL,或者低于 0.2 μ g/mL。

[0110] 在进一步的实施方案中,抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,与改组构建体 42-84mm 的结合降低,该改组构建体包含除氨基酸 42-84 之外的人 TF 序列,而氨基酸 42-84 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

[0111] 在进一步的实施方案中,抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,与改组构建体 85-122mm 的结合降低,该改组构建体包含除氨基酸 85-122 之外的人 TF 序列,而氨基酸 85-122 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

[0112] 在进一步的实施方案中,抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,与改组构建体 123-137mm 的结合降低,该改组构建体包含除氨基酸 123-137 之外的人 TF 序列,而氨基酸 123-137 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

[0113] 在进一步的实施方案中,抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,与改组构建体 185-225mm 的结合降低,该改组构建体包含除氨基酸 185-225 之外的人 TF 序列,而氨基酸 185-225 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

[0114] 在进一步的实施方案中,抗体与人组织因子结合但不与鼠组织因子结合,并且相比于与人 TF 的结合,与改组构建体 226-250mm 的结合降低,该改组构建体包含除氨基酸 226-250 之外的人 TF 序列,而氨基酸 226-250 被小鼠序列代替,如实施例 27 所述。

[0115] 在进一步的实施方案中,相比于与人 TF 的结合,抗体显示与超过 1 种改组构建体的结合降低。在一个实施方案中,抗体显示与构建体 42-84mm 和 85-122mm 的结合降低。在一个实施方案中,抗体显示与构建体 123-137mm 和 185-225mm 的结合降低。在一个实施方案中,抗体显示与构建体 123-137mm 和 185-225mm 以及构建体 226-250mm 的结合降低。

[0116] 在进一步的实施方案中,抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积,优选地,当按照实施例 21 中所述地进行测定时,该抗体能够诱导 C3c 和 C4c 沉积。

[0117] 在本发明抗体的一个实施方案中,所述抗体

[0118] - 与包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子,并且

[0119] - 不与包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子。

[0120] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH CDR3 区,其具有

[0121] a) 如下所示的序列

[0122] -SEQ ID No :12,

[0123] -SEQ ID No :16,

[0124] -SEQ ID No :20,

[0125] -SEQ ID No :24,

[0126] -SEQ ID No :28,

[0127] 或者

[0128] b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2、3、4、或 5 个氨基酸修饰,优选替换,例如保守替换,的变体。

[0129] 在进一步的实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID NO :12 所示的序列或其变体的 VH CDR3 区,其中该变体包括在位置 2、3、6、9 和 11 中一个或多个位置处的修饰,优选地,其中该修饰是替换,更优选地,其中该替换从下列组中选出:

[0130] a) 位置 2 处的 R 被 K 替换,

[0131] b) 位置 3 处的 S 被 A 或 T 替换,

[0132] c) 位置 6 处的 G 被 T 替换,

[0133] d) 位置 9 处的 L 被 F 替换,和

[0134] e) 位置 11 处的 S 被 Y 替换。

[0135] 在另一个实施方案中,抗体包括:

[0136] a) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :10、11 和 12 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :66、67 和 68 的 VL 区,

[0137] b) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :14、15 和 16 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :70、71 和 72 的 VL 区,

[0138] c) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :18、19 和 20 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :74、75 和 76 的 VL 区,

[0139] d) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :22、23 和 24 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :78、79 和 80 的 VL 区,

[0140] e) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :26、27 和 28 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序

列 SEQ ID NO :82,83 和 84 的 VL 区,或

[0141] f) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0142] 在进一步的实施方案中,抗体包含 VH,其

[0143] a) 与选自 SEQ ID NO :9,13,17,21 和 25 的 VH 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者

[0144] b) 与选自 SEQ ID NO :9,13,17,21,21 和 25 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0145] 在进一步的实施方案中,抗体包含 VL,其

[0146] a) 与选自 SEQ ID NO :65,69,73,77 和 81 的 VL 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者

[0147] b) 与选自 SEQ ID NO :65,69,73,77 和 81 的 VL 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0148] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0149] a) 包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区,

[0150] b) 包含序列 SEQ ID NO :13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :69 的 VL 区,

[0151] c) 包含序列 SEQ ID NO :17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :73 的 VL 区,

[0152] d) 包含序列 SEQ ID NO :21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :77 的 VL 区,

[0153] e) 包含序列 SEQ ID NO :25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :81 的 VL 区,或

[0154] f) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0155] 在进一步的实施方案中,抗体

[0156] - 与包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子,并且

[0157] - 与包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子。

[0158] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH CDR3 区,其具有

[0159] a) 如下所示的序列

[0160] -SEQ ID No :8,

[0161] -SEQ ID No :52,

[0162] 或者

[0163] b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,优选替换,例如保守替换,的变体。

[0164] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0165] a) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :6、7 和 8 的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :62、63 和 64 的 VL 区,

[0166] b) 包含 CDR1、2 和 3 序列 SEQ ID NO :50、51 和 52 的的 VH 区,和包含 CDR1、2 和 3

序列 SEQ ID NO :106、107 和 108 的 VL 区,或

[0167] c) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0168] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH,其

[0169] a) 与选自 SEQ ID NO :5 和 49 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者

[0170] b) 与选自 SEQ ID NO :5 和 49 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0171] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VL,其

[0172] a) 与选自 SEQ ID NO :61 和 105 的 VL 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者

[0173] b) 与选自 SEQ ID NO :61 和 105 的 VL 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0174] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0175] a) 包含序列 SEQ ID NO :5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :61 的 VL 区,

[0176] b) 包含序列 SEQ ID NO :49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :105 的 VL 区,或

[0177] c) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0178] 在进一步的实施方案中,抗体

[0179] - 不与包括包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子,并且

[0180] - 与包括包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子。

[0181] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH CDR3 区,其具有

[0182] a) 如下所示的序列

[0183] -SEQ ID No :32,

[0184] -SEQ ID No :36,

[0185] -SEQ ID No :40,

[0186] -SEQ ID No :56,

[0187] 或者

[0188] b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,优选替换,例如保守替换,的变体。

[0189] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0190] a) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :30,31 和 32 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :86,87 和 88 的 VL 区,

[0191] b) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :34,35 和 36 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :90,91 和 92 的 VL 区,

[0192] c) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :38,39 和 40 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :94,95 和 96 的 VL 区,

[0193] d) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :54,55 和 56 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :110,111 和 112 的 VL 区,或

[0194] e) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选地,氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0195] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH,其

[0196] a) 与选自 SEQ ID NO :29,33,37 和 53 的 VH 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者

[0197] b) 与选自 SEQ ID NO :29,33,37 和 53 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0198] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VL,其

[0199] a) 与选自 SEQ ID NO :85,89,93 和 109 的 VL 区序列具有至少 80%同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98%或 100%同一性,或者

[0200] b) 与选自 SEQ ID NO :85,89,93 和 109 的 VL 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0201] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0202] a) 包含序列 SEQ ID NO :29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :85 的 VL 区,

[0203] b) 包含序列 SEQ ID NO :33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :89 的 VL 区,

[0204] c) 包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区,

[0205] d) 包含序列 SEQ ID NO :53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :109 的 VL 区,

[0206] 或

[0207] e) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0208] 在进一步的实施方案中,抗体与包括包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区的抗体竞争结合组织因子。

[0209] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH CDR3 区,其具有

[0210] a) 如下所示的序列

[0211] -SEQ ID No :4,

[0212] -SEQ ID No :44,

[0213] -SEQ ID No :48,

[0214] 或者

[0215] b) 所述任一序列的变体,例如具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,优选替换,例如保守替换,的变体。

[0216] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0217] a) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :2,3 和 4 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :58,59 和 60 的 VL 区,

[0218] b) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :42,43 和 44 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :98,99 和 100 的 VL 区,

[0219] c) 包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :46,47 和 48 的 VH 区,和包含 CDR1,2 和 3 序列 SEQ ID NO :102,103 和 104 的 VL 区,或者

[0220] d) 所述任一抗体的变体,其中所述变体优选地在所述序列中具有 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选地,氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0221] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VH,其

[0222] a) 与选自 SEQ ID NO:1,41 和 45 的 VH 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者

[0223] b) 与选自 SEQ ID NO:1,41 和 45 的 VH 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0224] 在进一步的实施方案中,抗体包括 VL,其

[0225] a) 与选自 SEQ ID NO:57,97 和 101 的 VL 区序列具有至少 80% 同一性,例如至少 90%,至少 95%,或者至少 98% 或 100% 同一性,或者

[0226] b) 与选自 SEQ ID NO:57,97 和 101 的 VL 区序列相比具有最多 20 个,例如 15 个,或者 10 个,或者 5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0227] 在进一步的实施方案中,抗体包括:

[0228] a) 包含序列 SEQ ID NO:1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:57 的 VL 区,

[0229] b) 包含序列 SEQ ID NO:41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:97 的 VL 区,

[0230] c) 包含序列 SEQ ID NO:45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO:101 的 VL 区,或者

[0231] d) 所述任一抗体的变体,其中所述变体在所述序列中优选地具有最多 1、2 或 3 个氨基酸修饰,更优选氨基酸替换,例如保守氨基酸替换。

[0232] 在更进一步的实施方案中,当用本文实施例 22 中所述的方法进行测定时,本发明抗体与组织因子的亲和力小于 5nM,例如小于 3.5nM,例如小于 2nM。

[0233] 一组特别有趣的本发明抗体的与组织因子结合的特征是正常或高亲合力和高解离速率(kd)。如本文中证明的,这类抗体可显示肿瘤特异性结合,体现在它们结合癌组织,但不结合或者较少结合健康组织。不受限于任何具体的理论,我们假设这组抗体仅能够与表达高水平 TF 的细胞良好结合,因为只有当它是双价时结合才有效率。这些抗体的实例包括如本文所述的抗体 044、098 和 111。

[0234] 因此,在一个实施方案中,当用本文实施例 22 中所述的亲和力方法进行测定时,本发明抗体的 kd 大于 10^{-3} sec^{-1} ,并且当用本文实施例 22 中所述的亲合力方法进行测定时,亲合力小于 5nM,例如小于 1nM,例如小于 0.2nM。

[0235] 在另一个实施方案中,当用本文实施例 22 中所述的亲和力方法进行测定时,本发明抗体的 kd 大于 10^{-3} sec^{-1} ,和 / 或当用本文实施例 22 中所述的亲和力方法进行测定时,ka 大于 $5 \times 10^4 \text{ mol}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 。

[0236] 在进一步的实施方案中,当用实施例 23 中所述的测定方法进行测定时,该抗体与健康组织不显示结合,特别是与人肾小球没有结合,但是当用本文实施例 23 中所述的测定方法进行测定时,与胰腺肿瘤显示结合。

[0237] 在更进一步的实施方案中,当用本文实施例 26 中所述的方法进行测定时,该抗体可有效抑制已建立的 BX-PC3 肿瘤的生长。

[0238] 在另一个实施方案中,本发明抗体进具有一种或多种如下性质:抑制增殖、抑制肿瘤血管发生、诱导肿瘤细胞凋亡、与可变剪接的组织因子结合。

[0239] 在进一步的实施方案中,本发明的抗体与包括下列的抗体竞争结合组织因子:

[0240] a) 包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区,
[0241] b) 包含序列 SEQ ID NO :1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :57 的 VL 区,
[0242] c) 包含序列 SEQ ID NO :5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :61 的 VL 区,
[0243] d) 包含序列 SEQ ID NO :13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :69 的 VL 区,
[0244] e) 包含序列 SEQ ID NO :17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :73 的 VL 区,
[0245] f) 包含序列 SEQ ID NO :21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :77 的 VL 区,
[0246] g) 包含序列 SEQ ID NO :25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :81 的 VL 区,
[0247] h) 包含序列 SEQ ID NO :29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :85 的 VL 区,
[0248] i) 包含序列 SEQ ID NO :33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :89 的 VL 区,
[0249] j) 包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区,
[0250] k) 包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区,
[0251] l) 包含序列 SEQ ID NO :45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :101 的 VL 区,
[0252] m) 包含序列 SEQ ID NO :49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :105 的 VL 区,或者
[0253] n) 包含序列 SEQ ID NO :53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :109 的 VL 区。
[0254] 在进一步的实施方案中,本发明的抗体与具有下述的抗体结合组织因子上的相同表位:

[0255] a) 包含序列 SEQ ID NO :9 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :65 的 VL 区,
[0256] b) 包含序列 SEQ ID NO :1 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :57 的 VL 区,
[0257] c) 包含序列 SEQ ID NO :5 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :61 的 VL 区,
[0258] d) 包含序列 SEQ ID NO :13 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :69 的 VL 区,
[0259] e) 包含序列 SEQ ID NO :17 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :73 的 VL 区,
[0260] f) 包含序列 SEQ ID NO :21 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :77 的 VL 区,
[0261] g) 包含序列 SEQ ID NO :25 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :81 的 VL 区,
[0262] h) 包含序列 SEQ ID NO :29 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :85 的 VL 区,
[0263] i) 包含序列 SEQ ID NO :33 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :89 的 VL 区,
[0264] j) 包含序列 SEQ ID NO :37 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :93 的 VL 区,
[0265] k) 包含序列 SEQ ID NO :41 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :97 的 VL 区,
[0266] l) 包含序列 SEQ ID NO :45 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :101 的 VL 区,
[0267] m) 包含序列 SEQ ID NO :49 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :105 的 VL 区,或者
[0268] n) 包含序列 SEQ ID NO :53 的 VH 区和包含序列 SEQ ID NO :109 的 VL 区。

[0269] 在进一步的实施方案中,本发明的抗体包括:

[0270] - 源自选自下组的人种系 VH 序列的重链可变区:IGHV1-18*01, IGHV3-23*01, IGHV3-30*01, IGHV3-33*01, IGHV3-33*03, IGHV1-69*02, IGHV1-69*04 和 IGHV5-51*01, 和 / 或

[0271] - 源自选自下组的人种系 V_K 序列的轻链可变区:IGKV3-20*01, IGKV1-13*02, IGKV3-11*01 和 IGKV1D-16*01。

[0272] 在进一步的方面中,本发明涉及一种单克隆抗-TF 抗体,其包含具有如 SEQ ID NO : 9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 或 53 所示的序列或所述任一序列的变体的 VH 区, 所述变体具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修

饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换。

[0273] 如 SEQ ID NO :9,1,5,13,17,21,25,29,33,37,41,45,49 或 53 所示的序列的变体与前述任一序列可以具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0274] 在本发明的一个方面中,分离的单克隆抗 -TF 抗体包括具有如 SEQ ID NO :65,57,61,69,73,77,81,85,89,93,97,101 或 105 所示的序列或所述任一序列的变体的 VL 序列,所述变体具有例如最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换。

[0275] 如 SEQ ID NO :65,57,61,69,73,77,81,85,89,93,97,101 或 105 所示的序列的变体与前述任一序列可以具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0276] 在另一个实施方案中,抗体包括:

[0277] a),具有从下组中选出的序列的 VL 区:SEQ ID No :65,57,61,69,73,77,81,85,89,93,97,101 或 105,和具有从下组中选出的序列的 VH 区:SEQ ID No :9,1,5,13,17,21,25,29,33,37,41,45,49 或 53,

[0278] b) 上述任意一个的变体,其中所述变体优选地仅具有所述序列中的保守替换。

[0279] 在一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :65 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :9 所示的序列的 VH 区,或者这两条序列中任一个的变体,该变体

[0280] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0281] b) 与 SEQ ID NO :9 或 SEQ ID NO :65 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0282] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :57 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :1 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体

[0283] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0284] b) 与 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :57 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0285] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :61 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :5 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体

[0286] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0287] b) 与 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :61 分别具有至少 80% 同一性, 例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性, 例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0288] 在另一个优选实施方案中, 抗体包括具有如 SEQ ID No :69 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :13 所示的序列的 VH 区, 或者两条序列中任一个的变体, 该变体:

[0289] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰, 例如 20 个, 例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰, 例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 例如删除或插入, 优选替换, 例如保守替换, 或者

[0290] b) 与 SEQ ID NO :13 或 SEQ ID NO :69 分别具有至少 80% 同一性, 例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性, 例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0291] 在另一个优选实施方案中, 抗体包括具有如 SEQ ID No :73 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :17 所示的序列的 VH 区, 或者两条序列中任一个的变体, 该变体:

[0292] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰, 例如 20 个, 例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰, 例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 例如删除或插入, 优选替换, 例如保守替换, 或者

[0293] b) 与 SEQ ID NO :17 或 SEQ ID NO :73 分别具有至少 80% 同一性, 例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性, 例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0294] 在另一个优选实施方案中, 抗体包括具有如 SEQ ID No :77 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :21 所示的序列的 VH 区, 或者两条序列中任一个的变体, 该变体:

[0295] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰, 例如 20 个, 例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰, 例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 例如删除或插入, 优选替换, 例如保守替换, 或者

[0296] b) 与 SEQ ID NO :21 或 SEQ ID NO :77 分别具有至少 80% 同一性, 例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性, 例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0297] 在另一个优选实施方案中, 抗体包括一个具有在 SEQ ID No :81 所示的序列的 VL 区和一个具有在 SEQ ID No :25 所示的序列的 VH 区, 或者两条序列中任一个的变体, 该变体:

[0298] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰, 例如 20 个, 例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰, 例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰, 例如删除或插入, 优选替换, 例如保守替换, 或者

[0299] b) 与 SEQ ID NO :25 或 SEQ ID NO :81 分别具有至少 80% 同一性, 例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性, 例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0300] 在另一个优选实施方案中, 抗体包括具有如 SEQ ID No :85 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :29 所示的序列的 VH 区, 或者两条序列中任一个的变体, 该变体:

[0301] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰, 例如 20 个, 例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸

修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0302] b) 与 SEQ ID NO :29 或 SEQ ID NO :85 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0303] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :89 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :33 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0304] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0305] b) 与 SEQ ID NO :33 或 SEQ ID NO :89 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0306] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :93 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :37 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0307] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0308] b) 与 SEQ ID NO :37 或 SEQ ID NO :93 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0309] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :97 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :41 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0310] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0311] b) 与 SEQ ID NO :41 或 SEQ ID NO :97 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0312] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :101 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :45 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0313] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0314] b) 与 SEQ ID NO :45 或 SEQ ID NO :101 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0315] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :105 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :49 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0316] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0317] b) 与 SEQ ID NO :49 或 SEQ ID NO :105 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0318] 在另一个优选实施方案中,抗体包括具有如 SEQ ID No :109 所示的序列的 VL 区和具有如 SEQ ID No :53 所示的序列的 VH 区,或者两条序列中任一个的变体,该变体:

[0319] a) 具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者

[0320] b) 与 SEQ ID NO :53 或 SEQ ID NO :109 分别具有至少 80% 同一性,例如至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0321] 本发明的单克隆抗体可以例如通过杂交瘤方法产生,其首先在 Kohler et al., Nature 256,495(1975) 中;或者可以通过重组 DNA 方法加以产生。单克隆抗体还可以用例如下列文献中记载的技术从噬菌体抗体库分离:Clackson et al., Nature 352,624-628(1991) 和 Marks et al., J. Mol. Biol. 222,581-597(1991)。单克隆抗体可以从任何合适的来源获得。因此,例如,单克隆抗体可以从杂交瘤获得,其中杂交瘤可以从用目的抗原免疫的小鼠获得的鼠脾 B 细胞制备。目的抗原的形式可以是例如在表面上表达抗原的细胞,或者是编码目的抗原的核酸。单克隆抗体还可以从源自被免疫的人或非人哺乳动物(例如大鼠、家兔、狗、灵长动物等)的抗体表达细胞的杂交瘤获得。

[0322] 在一个实施方案中,本发明的抗体是人抗体。针对组织因子的人单克隆抗体可以用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠产生。这种转基因或转染色体小鼠包括如下的小鼠,在这里分别被称作人单抗小鼠(HuMAb)和 KM 小鼠,并在本文统称为“转基因小鼠”。

[0323] 人单抗小鼠含有编码未经重排的人重链可变和恒定链(μ 和 γ)和轻链可变和恒定链(κ)免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因迷你座位(miniloci),并且还具有靶定的突变,使内源 μ 和 κ 链座位失活(Lonberg, N. et al., Nature 368,856-859(1994))。因此,小鼠在对免疫进行应答时显示降低的小鼠 IgM 或 κ 表达,并且,被引入的人重链和轻链转基因经过类型转换(class switching)和体细胞突变(somatic mutation)从而产生高亲和力的人 IgG, κ 单克隆抗体(Lonberg, N. et al. (1994), 上文;综述见 Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113,49-101(1994), Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93(1995) 和 Harding, F. and Lonberg, N. Ann. N. Y. Acad. Sci 764 536-546(1995))。人单抗小鼠的制备在下列文献中有详细记载:Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20,6287-6295(1992), Chen, J. et al., International Immunology 5,647-656(1993), Tuailon et al., J. Immunol. 152,2912-2920(1994), Taylor, L. et al., International Immunology 6,579-591(1994), Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14,845-851(1996)。另见 US 5,545,806, US

5, 569, 825, US 5, 625, 126, US 5, 633, 425, US 5, 789, 650, US 5, 877, 397, US 5, 661, 016, US 5, 814, 318, US 5, 874, 299, US 5, 770, 429, US 5, 545, 807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 和 WO 01/09187。

[0324] HCo7 小鼠在其内源轻链 (kappa) 基因中具有一个 JKD 中断 (JKD disruption) (如 Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993) 所述), 在其内源重链基因中具有一个 CMD 中断 (如 WO 01/14424 的实施例 1 所述), 并具有一个 KCo5 人 kappa 轻链转基因 (如 Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) 所述) 和一个 HCo7 人重链转基因 (如 US 5, 770, 429 所述)。

[0325] HCo12 小鼠在其内源轻链 (kappa) 基因中具有一个 JKD 中断 (如 Chen et al., EMBO J. 12, 821-830 (1993) 所述), 在其内源重链基因中具有一个 CMD 中断 (如 WO 01/14424 的实施例 1 所述), 并具有一个 KCo5 人 kappa 轻链转基因 (如 Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) 所述) 和一个 HCo12 人重链转基因 (如 WO 01/14424 的实施例 2 所述)。

[0326] 在 KM 小鼠株系中, 内源小鼠 kappa 轻链基因被如 Chen et al., EMBO J. 12, 811-820 (1993) 所述地那样纯合地中断, 并且内源小鼠重链基因被如 WO 01/09187 的实施例 1 所述的那样纯合地中断。该小鼠株系携带一个人 kappa 轻链转基因 KCo5, 如 Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851 (1996) 所述。该小鼠种系还携带一个由染色体 14 节段 hCF (SC20) 构成的人重链转染色体, 如 WO 02/43478 所述。

[0327] 这些转基因小鼠的脾细胞可以用于根据众所周知的技术产生分泌人单克隆抗体的杂交瘤。本发明的人单克隆或多克隆抗体, 或者来源于其它物种的本发明抗体还可以通过转基因方式, 通过产生用目标免疫球蛋白重链和轻链序列转基因的另一种非人类动物或植物, 并以可回收的形式产生抗体来产生。关于哺乳动物体内的转基因生产, 抗体可以在山羊、牛和其它哺乳动物的乳汁中产生并自其回收。见例如 US 5, 827, 690, US 5, 756, 687, US 5, 750, 172 和 US 5, 741, 957。

[0328] 进一步, 本发明的人抗体或来自其它物种的本发明抗体可以使用本领域众所周知的技术通过展示型技术 (包括但不限于, 噬菌体展示、逆转录病毒展示、核糖体展示和其它技术) 加以产生, 并且可以进一步对所得分子进行额外的成熟过程, 例如亲和成熟, 这些技术是本领域众所周知的 (见例如 Hoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381 (1991) (噬菌体展示), Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309 (1996) (噬菌体展示), Hanes and Plucchau, PNAS USA 94, 4937-4942 (1997) (核糖体展示), Parmley and Smith, Gene 73, 305-318 (1988) (噬菌体展示), Scott TIBS 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68 (1992), Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84 (1992), 和 US 5, 733, 743)。如果使用展示技术产生非人源的抗体, 则这些抗体可以被来源化。

[0329] 本发明抗体可以是任何同种型。同种型的选择典型地遵从期望的效应物功能, 例如 ADCC 诱导。同种型的实例有 IgG1, IgG2, IgG3, 和 IgG4。可以使用人轻链恒定区, κ 或 λ , 的任一个。如果期望, 本发明抗 -TF 抗体的类型可以通过已知方法加以转换。例如, 原本为 IgM 的本发明抗体可以被类型转换成本发明的 IgG 抗体。进一步, 类型转换技术可以

用于将一个 IgG 亚类转变成另一个 IgG 亚类,例如从 IgG1 转变成 IgG2。因此,本发明抗体的效应物功能可以通过同种型转换而改变成例如 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, 或 IgM 抗体,以用于不同的治疗用途。在一个实施方案中,本发明抗体是 IgG1 抗体,例如 IgG1, κ 。

[0330] 在一个实施方案中,本发明的抗体是全长抗体,优选地 IgG1 抗体,特别是 IgG1, κ 抗体。在另一个实施方案中,本发明抗体是抗体片段或者单链抗体。

[0331] 抗体片段可以例如用常规技术通过片段化 (fragmentation) 获得,并且以本文就完整抗体所述的相同的方式基于用途筛选得到的片段。例如, $F(ab')_2$ 片段可以通过用胃蛋白酶 (pepsin) 处理抗体产生。所得的 $F(ab')_2$ 片段可以加以处理以还原二硫桥,产生 Fab' 片段。Fab 片段可以通过用木瓜蛋白酶处理 IgG 抗体来获得; Fab' 片段可以用胃蛋白酶消化 IgG 抗体来获得。 $F(ab')$ 片段还可以通过硫醚键或二硫键结合下述的 Fab' 来产生。 Fab' 片段是通过切断 $F(ab')_2$ 铰链区中的一个二硫键而获得的抗体片段。 Fab' 片段可以通过用还原剂,例如二硫苏糖醇,处理 $F(ab')_2$ 片段来获得。抗体片段还可以通过在重组细胞中表达编码这些片段的核酸来产生 (见例如 Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995))。例如,编码 $F(ab')_2$ 片段一部分的嵌合基因可以包括:编码 H 链 C_H1 域和铰链区的 DNA 序列,随后是翻译终止密码子以产生这种截短的抗体片段分子。

[0332] 在一个实施方案中,抗 -TF 抗体是单价抗体,优选是如 W02007059782 (Genmab) (本文通过提述并入) 所述的单价抗体,其在铰链区具有删除。因此,在一个实施方案中,抗体是单价抗体,其中这样的抗 -TF 抗体通过包括如下的方法构建:

[0333] i) 提供编码所述单价抗体轻链的核酸构建体,所述构建体包含编码选定的抗原特异性抗 TF 抗体之 VL 区的核苷酸序列和编码 Ig 之恒定 CL 区的核苷酸序列,其中所述编码选定的抗原特异性抗体之 VL 区的核苷酸序列和所述编码 Ig 之 CL 区的核苷酸序列可操作地连接在一起,并且其中,在 IgG1 亚型的情况下,编码 CL 区的核苷酸序列经过修饰,使得 CL 区不含有任何如下所述的氨基酸:在存在多克隆人 IgG 的条件下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸能够与其它包含与该 CL 区相同的氨基酸序列的肽形成二硫键或共价键;

[0334] ii) 提供编码所述单价抗体重链的核酸构建体,所述构建体包含编码选定的抗原特异性抗体之 VH 区的核苷酸序列和编码人 Ig 之恒定 CH 区的核苷酸序列,其中编码 CH 区的核苷酸序列经过修饰,使得相应于铰链区的区域,以及如 Ig 亚型所要求的,CH 区的其它区域,如 CH3 区,不含有任何如下所述的氨基酸残基:在存在多克隆人 IgG 的条件下或者当施用于动物或人类时,所述氨基酸残基参与同其它包含与人 Ig CH 区相同的氨基酸序列的肽形成二硫键或者共价或稳定非共价的重链间键,其中该编码选定的抗原特异性抗体之 VH 区的核苷酸序列和该编码所述 Ig 之 CH 区的核苷酸序列可操作地连接在一起;

[0335] iii) 提供用于产生所述单价抗体的细胞表达系统;

[0336] iv) 通过在 (iii) 的细胞表达系统的细胞中共表达 (i) 和 (ii) 的核酸构建体产生所述单价抗体。

[0337] 类似地,在一个实施方案中,抗 -TF 抗体是单价抗体,其包括:

[0338] (i) 如本文所述的本发明抗体的可变区或所述区的抗原结合部分,和

[0339] (ii) 免疫球蛋白 C_H 区或其包括 C_H2 和 C_H3 区的片段,其中该 C_H 区或其片段被修饰,从而使相当于铰链区的区域,以及,如果免疫球蛋白不是 IgG4 亚型, C_H 区的其它区域,例如

C_H3 区,不含有任何在多克隆人 IgG 存在下能够与相同的 C_H 区形成二硫键或者其它共价或稳定非共价重链间键的氨基酸。

[0340] 在进一步的实施方案中,单价抗 -TF 抗体的重链被修饰,使得整个铰链被删除。

[0341] 在进一步的实施方案中,所述抗体是 IgG4 亚型(见 SEQ ID NO:114, SEQ ID NO:113 的无铰链变体),但是 C_H3 区被修饰,从而制造了一个或多个如下的氨基酸替换:234 位的 Thr(T) 被 Ala(A) 替换;236 位的 Leu(L) 被 Ala(A) 替换;236 位的 Leu(L) 被 Val(V) 替换;273 位的 Phe(F) 被 Ala(A) 替换;273 位的 Phe(F) 被 Leu(L) 替换;275 位的 Tyr(Y) 被 Ala(A) 替换。

[0342] 在另一个进一步的实施方案中,所述单价抗体的序列被修饰,从而其不包含任何 N-连接糖基化的接受位点。

[0343] 本发明抗 -TF 抗体还包括单链抗体。单链抗体是如下的肽,其中重链和轻链 Fv 被连接起来。在一个实施方案中,本发明提供了一个单链 Fv(scFv),其中在单肽链中,本发明抗 -TF 抗体 Fv 中的重链和轻链用柔性的肽接头(典型地约 10、12、15 或更多个氨基酸残基)在单一肽链中连接起来。产生这类抗体的方法见例如下列文献所述:US 4,946,778, Pluckthun in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol.113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315(1994), Bird et al., *Science* 242, 423-426(1988), Huston et al., *PNAS USA* 85, 5879-5883(1988) and McCafferty et al., *Nature* 348, 552-554(1990)。单链抗体可以是单价的,如果仅使用单个 V_H 和 V_L 的话,可以是双价的,如果使用两个 V_H 和 V_L 的话,或者是多价的,如果使用超过两个 V_H 和 V_L 的话。

[0344] 在一个实施方案中,本发明抗 -TF 抗体是效应物功能缺陷抗体。当抗体用于通过阻断 TF 的抑制作用而刺激免疫系统时,这类抗体是特别有用的。对于这类应用,抗体没有效应物功能(例如 ADCC)可能是有利的,因为此类功能可能会导致不期望的细胞毒性。

[0345] 在一个实施方案中,效应物功能缺陷抗 TF 抗体是一种稳定化的 IgG4 抗体。合适的稳定化 IgG4 抗体的实例是如下的抗体,其中人 IgG4 重链恒定区 409 位(用 EU 索引指示,见 Kabat et al)的精氨酸被赖氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸或亮氨酸替换,优选地被赖氨酸替换(如 W02006033386(Kirin)中所述)和/或其中铰链区包含 Cys-Pro-Pro-Cys 序列。

[0346] 在进一步的实施方案中,稳定化的 IgG4 抗 TF 抗体是包括重链和轻链的 IgG4 抗体,其中所述重链包括人 IgG4 恒定区,其在相应于 409 的位置处具有选自 Lys, Ala, Thr, Met 和 Leu 的残基,和/或在相应于 405 的位置处具有选自 Ala, Val, Gly, Ile 和 Leu 的残基,并且其中所述抗体任选地包括一个或多个其他替换、删除和/或插入,但在铰链区不包含 Cys-Pro-Pro-Cys 序列。优选地,所述抗体在相应于 409 的位置处包含 Lys 或 Ala 残基,或者所述抗体的 CH3 区被人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG3 的 CH3 区替换。

[0347] 在更进一步的实施方案中,稳定化的 IgG4 抗 TF 抗体是包括重链和轻链的 IgG4 抗体,其中所述重链包括人 IgG4 恒定区,其在相应于 409 的位置处具有选自 Lys, Ala, Thr, Met 和 Leu 的残基,和/或在相应于 405 的位置处具有选自 Ala, Val, Gly, Ile 和 Leu 的残基,并且其中所述抗体任选地包括一个或多个其他替换、删除和/或插入,并且其中所述抗体在铰链区包括 Cys-Pro-Pro-Cys 序列。优选地,所述抗体在相应于 409 的位置处包含 Lys 或 Ala 残基,或者抗体的 CH3 区被人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG3 的 CH3 区替换。

[0348] 在进一步的实施方案中,效应物功能缺陷抗 -TF 抗体是非 IgG4 型的抗体,例如

IgG1, IgG2 或 IgG3, 其经过突变, 从而介导效应物功能 (例如 ADCC) 的能力被降低或者甚至消除。这些突变已经在例如 Dall'Acqua WF et al., *J Immunol.* 177(2):1129-1138(2006) 和 Hezareh M, *J Virol.* ;75(24):12161-12168(2001) 中有记载。

[0349] 在进一步的实施方案中, 本发明的抗体与另一个部分偶联, 例如细胞毒性部分、放射性同位素或药物。这种抗体可以通过通过将另一个部分与抗-TF 抗体或其片段 (例如抗-TF 抗体 H 链、L 链或其抗-TF 特异/选择性片段) 的 N 端或 C 端化学偶联加以产生 (见例如 Osamu Kanemitsu 编辑的 *Antibody Engineering Handbook*, 由 Chijin Shokan 出版 (1994))。这种偶联抗体衍生物还可以通过合适的内部残基或糖基处偶联加以产生)。

[0350] 一般地, 这里所述的抗-TF 抗体可以通过包含任何合适数目的这类修饰氨基酸和/或与这类偶联取代物相关联加以修饰。在这种语境下的适合性, 一般而言取决于至少大体上保留未衍生化的亲本抗-TF 抗体的相关 TF 选择性和/或特异性的能力。例如, 在下述方面, 包含一个或多个修饰氨基酸可能是有利的: 增加多肽血清半衰期, 降低多肽抗原性, 或者增加多肽储存稳定性。例如, 在重组产生过程中对氨基酸进行共翻译修饰或者翻译后修饰 (例如在哺乳动物细胞中表达期间在 N-X-S/T 基序处的 N 连接糖基化), 或者通过合成方法修饰。经修饰氨基酸的非限制性实例包括糖基化氨基酸、硫酸化氨基酸、异戊二烯化 (例如法尼基化、牻牛儿基化 (geranylgeranylated)) 氨基酸、乙酰化氨基酸、酰基化氨基酸、PEG 化氨基酸、生物素化氨基酸、羧基化氨基酸、磷酸化氨基酸等。足以指导氨基酸修饰领域技术人员的参考文献在整个文献域中大量存在。规程实例可以在 Walker (1998) *Protein Protocols On Cd-Rom*, Humana Press, Towata, NJ 中找到。经修饰的氨基酸可以例如从下列氨基酸中选出: 糖基化氨基酸、PEG 化氨基酸、法尼基化氨基酸、乙酰化氨基酸、生物素化氨基酸、与脂质基团偶联的氨基酸或与有机衍生化剂偶联的氨基酸。

[0351] 抗-TF 抗体还可以通过与聚合物共价偶联进行化学修饰, 以便例如增加其循环半衰期。聚合物和将它们附着于肽上的方法的实例在例如下列文献中有例证: US 4, 766, 106, US 4, 179, 337, US 4, 495, 285 和 US 4, 609, 546。其他的聚合物实例包括聚氧乙烯化多元醇和聚乙二醇 (PEG) (例如分子量为大约 1, 000- 大约 40, 000 的 PEG, 例如大约 2, 000- 大约 20, 000, 例如大约 3, 000-12, 000g/mol)。

[0352] 在一个实施方案中, 本发明提供了抗-TF 抗体, 其与从下面选出的第二分子偶联: 放射性核素、酶、酶底物、辅因子、荧光标志物、化学发光标志物、肽标签或磁性颗粒。在一个实施方案中, 抗-TF 抗体可以和一个或多个抗体片段、核酸 (寡核苷酸)、核酸酶、激素、免疫调节剂、螯合剂、硼化合物、光活性剂 (photoactive agent)、染料等偶联。这些和其它的试剂可以直接或间接与本发明抗-TF 抗体偶联。直接偶合第二试剂的一个实例是通过间隔物部分来加以偶联。这些间隔物可以是不溶或可溶的 (见例如 Diener et al., *Science* 231, 148(1986)), 而且可以选择间隔物使药物能够在靶位点和/或在特定条件下从抗-TF 抗体释放。可以和抗-TF 抗体偶联的其它试剂实例包括凝集素和荧光肽。

[0353] 在一个实施方案中, 提供了包括一个或多个放射性标记氨基酸的抗 TF 抗体。放射性标记的抗 TF 抗体可以用于诊断和治疗目的 (与放射性标记的分子偶联是另一可能特征)。用于多肽的非限制性标记物的实例包括, 但不限于, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, 和 ¹²⁵I, ¹³¹I, 和 ¹⁸⁶Re。用于制备放射性标记氨基酸和相关肽衍生物的方法是本领域已知的 (见例如 Junghans et al., in *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686(2d

edition, Chafner and Longo, eds., Lippincott Raven(1996)) 和 US 4,681,581, US 4,735,210, US 5,101,827, US 5,102,990 (US RE35,500), US 5,648,471 和 US 5,697,902。例如,放射性同位素可以通过氯胺 T 法加以偶联。

[0354] 在一个实施方案中,本发明的抗 -TF 抗体包括偶联的核酸或核酸相关分子。在本发明的这一方面中,偶联的核酸是细胞毒性核糖核酸酶。在一个实施方案中,偶联的核酸是反义核酸(例如 S100A10 靶定反义分子,其也可以是本发明的联合组合物或联合用药方法中的一种独立组分,见例如 Zhang et al., J Biol Chem. 279(3),2053-62(2004))。在一个实施方案中,偶联的核酸是抑制性 RNA 分子(例如 siRNA 分子)。在一个实施方案中,偶联的核酸是免疫刺激性核酸(例如含有免疫刺激性 CpG 基序的 DNA 分子)。在一个实施方案中,偶联的核酸是编码表达肿瘤抑制基因、抗癌疫苗、抗癌细胞因子或细胞凋亡剂的表达盒。这些衍生物还可以包括偶联编码表达一种或多种细胞毒蛋白(例如植物或细菌毒素)的核酸。

[0355] 在一个实施方案中,抗 TF 抗体与功能核酸分子偶联。功能核酸分子包括反义分子、干扰核酸分子(例如 siRNA 分子)、适体 (aptamer)、核酶、三链体形成分子 (triplex forming molecule) 和外部引导序列 (external guide sequence)。功能核酸分子可以发挥具有靶分子的特异活性的效应物、抑制剂、调节剂和刺激物的功能,或者功能核酸分子可以具有独立于任何其它分子的新活性。

[0356] 在另一个实施方案中,本发明的抗 TF 抗体与适体偶联。

[0357] 在另一个实施方案中,本发明提供了一种抗 TF 抗体,其与核酶偶联。

[0358] 任何本领域已知的用于将抗 -TF 抗体与偶联分子相偶联的方法,例如如上文所述的,均可以使用,包括在下列文献中记载的方法:Hunter et al., Nature 144, 945(1962), David et al., Biochemistry 13,1014(1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40,219(1981) 和 Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30,407(1982)。许多类型的细胞毒性化合物可以通过使用细胞毒性化合物上的反应活性基团或者通过使用交联剂与蛋白质连接。可以和氨基在体内形成稳定共价键的一种通用反应活性基团是异硫氰酸盐 (Means et al., Chemical modifications of proteins(Holden-Day, San Francisco 1971)pp. 105-110)。该基团优先与赖氨酸的 ϵ -氨基反应。马来酰亚胺是一种通用的反应基团,用于与半胱氨酸上的巯基形成稳定的体内共价键 (Ji., Methods Enzymol 91, 580-609(1983))。单克隆抗体通常不能与放射性金属离子形成共价键,但是它们可以通过利用共价连接于抗体的螯合剂而间接地附着在抗体上。螯合剂可以通过氨基酸残基的胺基 (Meares et al., Anal. Biochem. 142,68-78(1984)) 和巯基 (Koyama, Chem. Abstr. 120,217262t(1994)) 连接,还可以通过糖基团 (Rodwell et al., PNAS USA 83, 2632-2636(1986), Quadri et al., Nucl. Med. Biol. 20,559-570(1993)) 连接。由于这些螯合剂含有两种类型的功能基团,一种结合金属离子,另一种将螯合剂与抗体连接,所以它们通常被称为双功能螯合剂 (Sundberg et al., Nature 250,587-588(1974))。

[0359] 在一个实施方案中,本发明提供了一种抗 -TF 抗体,例如人抗 -TF 抗体,其与治疗部分,例如细胞毒素、化疗药物、免疫抑制剂或放射性同位素,偶联。这种偶联物在这里称作“免疫偶联物”。包括一个或多个细胞毒素的免疫偶联物称作“免疫毒素”(immunotoxins)。

[0360] 细胞毒素或细胞毒剂包括任何对细胞有害(例如杀伤细胞)的试剂。对于这

些本领域众所周知的类型的药物及其作用机制的记载见 Goodman et al., Goodman and Gilman' s The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 第8版, Macmillan Publishing Co., 1990。在例如 Vitetta, Immunol. Today 14, 252 (1993) 和 US 5, 194, 594 中提供了与抗体免疫毒素制备相关的额外技术。

[0361] 用于形成本发明免疫偶联剂的合适治疗剂包括紫杉醇 (taxol)、松胞菌素 B (cytochalasin B)、短杆菌肽 D (gramicidin D)、溴化乙锭 (ethidium bromide)、依米丁 (emetine)、丝裂霉素 (mitomycin)、依托泊苷 (etoposide)、鬼臼噻吩苷 (tenoposide)、长春新碱 (vincristine)、长春碱 (vinblastine)、秋水仙碱 (colchicin)、多柔比星 (doxorubicin)、柔红霉素 (daunorubicin)、二羟蒽蒽菌素二酮 (dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌 (mitoxantrone)、普卡霉素 (mithramycin)、放线菌素 D (actinomycin D)、1-去氢睾酮 (1 dehydrotestosterone)、糖皮质激素 (glucocorticoids)、普鲁卡因 (procaine)、丁卡因 (tetracaine)、利多卡因 (lidocaine)、普萘洛尔 (propranolol) 和嘌呤霉素 (puromycin), 抗代谢物 (例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺 (decarbazine)、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨), 烷化剂 (例如盐酸氮芥、thioepa、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氮芥 (BSNU)、洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪 (DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素 C、顺铂和其它铂衍生物, 例如卡铂), 抗生素 (例如放线菌素 D (先前称作放线菌素)、博来霉素、柔红霉素 (先前称作道诺霉素)、阿霉素、伊达比星、米拉霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素、安曲霉素 (AMC)、白喉毒素和相关分子 (例如白喉 A 链及其活性片段和杂交分子)、蓖麻毒蛋白毒素 (例如蓖麻毒蛋白毒素 A 或脱糖基化蓖麻毒蛋白 A 链毒素)、霍乱毒素、志贺样毒素 (SLT-I, SLT-II, SLT-IIIV)、LT 毒素、C3 毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、alorin、皂苷、蒴莲根毒素、明胶、相思豆毒蛋白 A 链、蒴莲根毒素 A 链、 α -帚曲霉素、油桐 (Aleurites fordii) 蛋白、石竹素 (dianthin)、美洲商陆 (Phytolacca Americana) 蛋白 (PAPI, PAPII 和 PAP-S)、苦瓜抑制物、麻风树毒蛋白、巴豆毒蛋白、肥皂草 (sapaonaria officinalis) 抑制物、白树毒素 (gelonin)、mitogellin、局限曲霉素 (restrictocin)、酚霉素和依诺霉素毒素。其它合适的偶联分子包括核糖核酸酶 (RNase)、脱氧核糖核酸酶 (DNase) I、葡萄球菌内毒素 -A、美洲商陆抗病毒蛋白、白喉毒素和假单胞菌内毒素。见例如 Pastan et al., Cell 47, 641 (1986) 和 Goldenberg, Calif. A Cancer Journal for Clinicians 44, 43 (1994)。治疗剂, 其可以与如本文其它部分所述的本发明的抗 -TF 抗体组合施用, 还可以是可用于与本发明抗 -TF 抗体偶联的治疗部分的候选物。

[0362] 在一个实施方案中, 本发明的抗 -TF 抗体与螯合剂接头 (例如 tiuxetan) 偶联, 后者允许将抗体偶联于放射性同位素。

[0363] 在进一步的方面中, 本发明涉及一种双特异性分子, 其包括如本文上文所述的本发明抗 -TF 抗体和第二结合特异性, 例如对人效应物细胞、人 Fc 受体或 T 细胞受体的结合特异性, 或者对 TF 的另一表位的结合特异性。

[0364] 除了抗 -TF 结合特异性和对人效应物细胞、人 Fc 受体或 T 细胞受体的结合特异性之外, 本发明的双特异性分子可以进一步包括第三结合特异性。

[0365] 本发明的示例性双特异性抗体分子包括 (i) 两个抗体, 一个具有对 TF 的特异

性,另一个具有对第二靶标的特异性,两者偶联在一起,(ii)单独一个抗体,其具有一条特异针对 TF 的链和一条特异针对第二分子的第二链,和(iii)具有针对 TF 和第二分子的特异性的单链抗体。典型地,第二靶标/第二分子是除 TF 之外的分子。在一个实施方案中,第二分子是癌症抗原/肿瘤相关抗原,例如癌胚抗原(CEA)、前列腺特异抗原(PSA)、RAGE(肾抗原)、甲胎蛋白、CAMEL(黑色素瘤上的 CTL-识别抗原)、CT 抗原(例如 MAGE-B5, -B6, -C2, -C3, 和 D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE, 和 SAGE)、粘蛋白抗原(例如 MUC1, 粘蛋白-CA125 等)、神经节苷脂抗原、酪氨酸酶、gp75、C-myc、Mart1、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7 和 Ep-CAM。在一个实施方案中,第二分子是癌症相关整联蛋白,例如 $\alpha 5 \beta 3$ 整联蛋白。在一个实施方案中,第二分子是血管发生因子或其他癌症相关生长因子,例如血管内皮生长因子(VEGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、表皮生长因子(EGF)、表皮生长因子受体(EGFR)、血管生成素及其受体,特别地,与癌症进展相关的受体(例如 HER1-HER4 受体之一、c-met 或 RON)。本文中讨论的其它癌症进展相关蛋白也可以是合适的第二分子。

[0366] 在一个实施方案中,本发明的双特异性抗体是双抗体。双特异性抗体还包括交联的或“异源偶联物”抗体。例如,异源偶联物中的一个抗体可以和亲和素偶联,另一个与生物素偶联。这类抗体已经被提议,例如,将免疫系统细胞靶定于不想要的细胞(见例如 US 4, 676, 980)。异源偶联物抗体可以用任何方便的交联方法制备。

[0367] 在进一步的方面中,本发明涉及编码本发明抗体的表达载体。

[0368] 在一个实施方案中,本发明的表达载体包括编码选自下组的一个或多个氨基酸序列的核苷酸序列:SEQ ID NO:1-112。

[0369] 在另一个具体的实施方案中,本发明的表达载体包括编码一个或多个选自下组的 VH 氨基酸序列的核苷酸序列:SEQ ID NO:9, 1, 5, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49 和 53。

[0370] 在一个具体的实施方案中,本发明的表达载体包括编码选自下组的一个或多个选自的 VH CDR3 氨基酸序列的核苷酸序列:SEQ ID NO 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 和 56。

[0371] 在另一个具体的实施方案中,本发明的表达载体包括编码选自下组一个或多个 VL 氨基酸序列的核苷酸序列:SEQ ID NO:65, 57, 61, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101 和 105。

[0372] 在另一个具体的实施方案中,本发明的表达载体包括编码选自下组的一个或多个 VL CDR3 氨基酸序列的核苷酸序列:SEQ ID NO:60, 64, 68, 72, 76, 80, 84, 88, 92, 96, 100, 104 和 108。

[0373] 在一个具体的实施方案中,本发明的表达载体包括编码一个或多个上述氨基酸序列的变体的核苷酸分子,所述变体具有最多 25 个氨基酸修饰,例如 20 个,例如最多 15、14、13、12 或 11 个氨基酸修饰,例如 10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个氨基酸修饰,例如删除或插入,优选替换,例如保守替换,或者与所述任一序列具有至少 80% 同一性,例如与前述任一氨基酸序列具有至少 85% 同一性或 90% 同一性或 95% 同一性,例如 96% 同一性或 97% 同一性或 98% 同一性或 99% 同一性。

[0374] 在一个进一步的实施方案中,表达载体进一步包括编码抗体,例如人抗体的轻链恒定区、重链恒定区、或轻链和重链恒定区二者的核苷酸序列。

[0375] 这类表达载体可用于重组产生本发明的抗体。

[0376] 本发明上下文中的表达载体可以是任何合适的载体,包括染色体、非染色体、合成核酸载体(包含一组合适的表达控制元件的核酸序列)。这类载体的实例包括如下载体的衍生物:SV40、细菌质粒、噬菌体 DNA、杆状病毒、酵母质粒、源自质粒和噬菌体 DNA 组合的载体、和病毒核酸(RNA 或 DNA)载体。在一个实施方案中,编码抗 -TF 抗体的核酸被包含在裸 DNA 或 RNA 载体内,包括例如线性表达元件(例如在 Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59(1997) 中记载的),紧凑的核酸载体(例如在 US 6,077,835 和 / 或 WO 00/70087 中记载的),质粒载体例如 pBR322, pUC 19/18 或 pUC 118/119,“侏儒(midge)”尺寸最小化核酸载体(例如在 Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800(2001) 中记载的),或者作为被沉淀的(precipitated)核酸载体构建体,例如 CaP04- 沉淀构建体(例如在 WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55(1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725(1978), 和 Coraro and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603(1981) 中记载的)。这类核酸载体及其使用是本领域众所周知的(见例如 US 5,589,466 和 US 5,973,972)。

[0377] 在一个实施方案中,载体适合于在细菌细胞中表达抗 -TF 抗体。这类载体的实例包括表达载体,例如 BlueScript(Stratagene), pIN 载体(Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509(1989), pET 载体(Novagen, Madison WI)等)。

[0378] 表达载体还可以是,或者可选择地是适合于在酵母系统中表达的载体。任何适合于在酵母系统中表达的载体均可使用。合适的载体包括,例如,含有组成性或可诱导性启动子,例如 alpha 因子、乙醇氧化酶和 PGH(综述见:F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987), 和 Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544(1987)) 的载体。

[0379] 核酸和 / 或载体还可以包括编码分泌 / 定位序列的核酸序列,分泌 / 定位序列能够将多肽,例如未成熟的多肽链,靶定到周质空间(periplasmic space)或者细胞培养基内。这些序列是本领域已知的,并且包括分泌前导序列或信号肽,细胞器靶定序列(例如核定位序列、ER 保留信号、线粒体转运序列(transit sequence)、叶绿体转运序列),膜定位 / 锚定序列(例如终止转移序列、GPI 锚定序列)等。

[0380] 在本发明的表达载体中,编码抗 -TF 抗体的核酸可以包括合适的启动子、增强子和其它便于表达的元件或者与合适的启动子、增强子和其它便于表达的元件相关联。这些元件的实例包括强表达启动子(例如人 CMV IE 启动子 / 增强子以及 RSV, SV40, SL3-3, MMTV, 和 HIV LTR 启动子),有效的聚(A)终止序列,大肠杆菌质粒产物的复制起点,作为选择标签的抗生素耐受基因,和 / 或便利的克隆位点(例如多接头)。核酸还可以包括可诱导的启动子(与组成型启动子相对),例如 CMV IE(技术人员会认识到,这些术语实际上是描述基因在某些条件下的表达水平的)。

[0381] 在一个实施方案中,编码抗 -TF 抗体的表达载体可以被置于或者通过病毒载体输送到宿主细胞或宿主动物中。

[0382] 在一个更进一步的方面中,本发明涉及重组真核或原核宿主细胞,例如转染瘤,其产生如这里所定义的本发明抗体或如这里所定义的本发明双特异性分子。宿主细胞的实例包括酵母、细菌和哺乳动物细胞,例如 CHO 或 HEK 细胞。例如,在一个实施方案中,本发明提供了一种包含这样的核酸的细胞,该核酸稳定整合到所述细胞基因组内,并且包含用于表达本发明抗 -TF 抗体的编码序列。在另一个实施方案中,本发明提供了这样的细胞,其包含

非整合的核酸,例如质粒、粘粒、噬菌粒或线性表达元件,所述非整合的核酸包含用于表达本发明抗-TF 抗体的编码序列。

[0383] 在进一步的方面中,本发明涉及可产生如这里所定义的本发明抗体的杂交瘤。在更进一步的方面中,本发明涉及转基因非人类动物,其包括编码人重链和人轻链的核酸,其中该动物或植物可产生本发明的抗体。这种杂交瘤和转基因动物的产生在上文已有记载。

[0384] 在进一步的方面中,本发明涉及一种用于产生本发明抗-TF 抗体的方法,所述方法包括如下步骤:

[0385] a) 培养如本文上文所述的本发明杂交瘤或宿主细胞,和

[0386] b) 从培养基纯化本发明抗体。

[0387] 在进一步的主要方面中,本发明涉及用作药物的如本文所定义的抗-TF 抗体或如本文所定义的双特异性分子。

[0388] 在更进一步的方面中,本发明涉及一种药物组合物,其包括:

[0389] - 如本文所定义的抗-TF 抗体或如本文所定义的双特异性分子,和

[0390] - 药学可接受的载体。

[0391] 药物组合物可以用药学可接受的载体或稀释剂以及任何其它已知的佐剂和赋形剂根据常规技术加以配制,例如在 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995 中公开的技术。

[0392] 药学可接受的载体或稀释剂以及任何其它已知的佐剂和赋形剂应当适合于本发明所选择的化合物以及所选择的给药模式。用于药物组合物的载体和其它组分的适用性以如下的因素为基础来确定,即对所选的本发明化合物或药物组合物的期望的生物学性质没有显著的不利影响(例如对抗原结合没有实质性影响(例如10%或更低的相对抑制,5%或更低的相对抑制等))。

[0393] 本发明的药物组合物还可以包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去污剂(例如非离子去污剂,例如吐温 20 或吐温 80)、稳定化剂(例如糖或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂、和/或其它适合于包含在药物组合物中的材料。

[0394] 已有报道,在癌细胞中,例如人结肠直肠癌细胞中,TF 的表达受到 2 个驱动疾病进程的主要转化事件(K-ras 癌基因活化和 p53 肿瘤抑制子失活)的控制,其方式依赖于 MEK/有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇 3'-激酶(PI3K)(Yu et al. (2005)Blood 105:1734)。

[0395] 过表达 TF 的癌细胞可能是本发明抗-TF 抗体的特别好的靶标,因为每个细胞可以结合更多的抗体。因此,在一个实施方案中,待用本发明抗-TF 抗体治疗的癌症患者是如下的患者,例如胰腺癌、肺癌或结肠直肠癌患者,其已经被诊断在其肿瘤细胞的 K-Ras 中具有一个或多个突变和/或 p53 中存在一个或多个突变。

[0396] 在一个备选的实施方案中,待用本发明抗-TF 抗体治疗的癌症患者是患者,例如胰腺癌、肺癌或结肠直肠癌患者,其在 K-Ras 中没有突变。不受限于任何具体的理论,一些具有 K-Ras 激活的肿瘤细胞有可能对抗-TF 抗体治疗的易感性较弱,因为在 K-Ras 被激活的细胞中抗-TF 抗体影响细胞内信号传导机制的效力可能较低。

[0397] 本发明药物组合物中活性成分的实际剂量水平可以加以变化,以获得可以为特殊患者、组合物或给药模式有效地实现期望治疗应答的活性成分的量,而对患者没有毒性。所

选的剂量水平依赖于多种药物动力学因素,包括所采用的本发明特定组合物或其酰胺的活性,给药途径,给药时间,所采用特殊化合物的排泄速度,治疗的持续时间,与所采用的特定组合物联合使用的其它药物、化合物和 / 或材料,受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康状况和先前用药历史,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0398] 药物组合物可以通过任何合适的途径和模式施用。在体内和体外施用本发明化合物的合适途径是本领域众所周知的,并可以由本领域技术人员加以选择。

[0399] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物是肠胃外施用的。

[0400] 如这里所使用的,术语“肠胃外施用”和“肠胃外地施用”是指除肠内和局部给药之外的给药模式,通常是通过注射,并且包括上皮、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、腱内、经气管、皮下、表皮下 (subcuticular)、关节内、囊下、蛛网膜下、椎管内、颅内、胸内、硬脑膜外和胸骨内注射和输注。

[0401] 在一个实施方案中,药物组合物是通过静脉内或皮下注射或输注给药的。

[0402] 药学可接受的载体包括任何和全部合适的溶剂、分散介质、包衣剂、杀菌和杀真菌剂、等渗剂、抗氧化剂和延迟吸收剂,和类似的与本发明化合物生理相容的试剂。

[0403] 本发明药物组合物可以采用的合适的水性和非水性载体实例包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、乙醇、右旋糖、多元醇 (例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油、玉米油、花生油、棉籽油、和芝麻油,羧甲基纤维素胶体溶液、黄耆胶和可注射的有机酯,例如油酸乙酯,和 / 或各种缓冲液。其它的载体是药物领域众所周知的。

[0404] 药学可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和无菌粉末,用于即时制备无菌可注射溶液或分散体。这些介质和试剂在药物活性物质上的使用是本领域已知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,本文构想了它们在本发明药物组合物中的使用。

[0405] 通过使用包衣材料,例如卵磷脂,在分散体情况下通过保持所需的颗粒大小,和通过使用表面活性剂,可以保持合适的流动性。

[0406] 本发明的药物组合物还可以包括药学可接受的抗氧化剂,例如 (1) 水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠和类似物; (2) 油性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基羟基茴香醚 (BHA)、丁羟甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚、等等;和 (3) 金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等等。

[0407] 本发明的药物组合物还可以在组合物中包括等渗剂,例如组合物中的糖、多元醇,例如甘露醇、山梨醇、甘油或氯化钠。

[0408] 本发明的药物组合物还可以含有一种或多种适合于所选给药途径的佐剂,例如防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、防腐剂或缓冲剂,其可以提高药物组合物的保存寿命或有效性。本发明的化合物可以用保护化合物免于快速释放的载体制备,这样的载体例如缓释剂型,包括植入体、经皮贴片和微胶囊化地输送系统。这样的载体可以包括明胶、单硬脂酸甘油酯、二硬脂酸甘油酯、生物可降解的、生物相容性聚合物,例如乙烯乙烯乙酸共聚物、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸,单独地或者与蜡一起,或者其它本领域众所周知的材料。用于制备这类制剂的方法是本领域技术人员一般知道的。见例如 Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson 编辑, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

[0409] 在一个实施方案中,可以被配制本发明的化合物以确保在体内适当的分布。用于胃肠外给药的药学可接受载体包括无菌含水溶液或分散体用于即时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这些介质和试剂用于药物活性物质的使用是本领域已知的。任何常规介质或试剂,只要其不与活性化合物不相容,本文考虑了它们在本发明药物组合物中的使用。组合物中还可以纳入补充活性化合物。

[0410] 用于注射的药物组合物典型地必须是无菌的,并且在制造和储存条件下稳定。组合物可以配制成溶液、微乳剂、脂质体或其它适合于高药物浓度的有序结构。载体可以是水性或非水性溶剂或分散介质,含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油,例如橄榄油,和可注射的有机酯,例如油酸乙酯。可以例如通过下述手段来保持合适的流动性:通过使用包衣,例如卵磷脂;在分散体的情况下通过保持所需的颗粒大小;以及通过使用表面活性剂。在许多情况下,优选地在组合物中含有等渗剂,例如糖、多元醇如甘油、甘露醇、山梨醇、或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包含可延迟吸收的试剂,例如单硬脂酸盐和明胶,而实现。可以这样制备无菌可注射溶液:将所需量的活性化合物纳入根据需要含有一种成分或多种成分的组合(例如上面所列举的,)的合适溶剂中,随后通过无菌微量过滤。一般地,分散体是通过将活性化合物纳入含有基础分散介质和所需的其它成分(例如来自上面列举的)的无菌媒介中而制备的。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这些过程可以从先经过了无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何额外的粉末。

[0411] 无菌可注射溶液的制备可以通过按照需要,将所需量的活性化合物加入到具有一种或多种上文所列举成分的组合的合适溶剂中,随后进行无菌微过滤。一般地,分散体的制备是通过将活性化合物加入到含有基础分散介质和必需的其它来自上面列举的成分的无菌介质内。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,制备方法的实例是真空干燥和冷冻干燥(冻干),这些过程从先前经过无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何额外的期望成分的粉末。

[0412] 本发明的药物组合物可以含有一种本发明的化合物或者多种本发明化合物的组合。

[0413] 如上文所述,在另一个方面中,本发明涉及用作药物的如本文所定义的本发明抗体或者如这里所本文的本发明双特异性分子。

[0414] 本发明的抗-TF 抗体可以用于多种目的。特别地,本发明的抗体可用于治疗多种形式的癌症。在一个方面中,本发明的抗-TF 单克隆抗体用于治疗各种实体癌症类型,例如中枢神经系统的肿瘤、头颈癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、乳腺癌、食道癌、胃癌、肝和胆癌(liver and biliary cancer)、胰腺癌、结肠直肠癌、膀胱癌、肾癌、前列腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、恶性黑色素瘤、肉瘤(软组织,例如骨和肌肉)、原发来源不明的肿瘤(也就是未知来源)、白血病、骨髓癌症(例如多发性骨髓瘤)、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤、皮肤癌、神经胶质瘤、脑、子宫和直肠的癌症。

[0415] 进一步,自身免疫性炎症,例如肌病或多发性硬化,可以作为本发明的抗-TF 单克隆抗体的靶标。

[0416] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于止血(haemostatis)的治疗。

[0417] 癌症相关的止血病症也可以作为本发明的介入的目标。

[0418] 进一步,具有炎症的疾病,例如肌病、类风湿性关节炎、骨关节炎、强直性脊柱炎、痛风、脊柱关节病(spondylarthropathris)、强直性脊柱炎、莱特尔综合症、银屑病性关节炎、肠病性关节炎(enterapathric spondylitis)、青少年关节病(juvenile arthropathy)、反应性关节炎、感染性或感染后关节炎、结核性关节炎、病毒性关节炎、真菌性关节炎、梅毒性关节炎、肾小球肾炎、末期肾病、系统性红斑狼疮、mb. Crohn、溃疡性结肠炎、炎性肠病、囊性纤维化、慢性阻塞性肺病(COPD)、哮喘、过敏性哮喘、支气管炎、急性支气管炎、慢性支气管炎、特发性肺纤维化、或者多发性硬化,可以作为本发明的抗-TF 单克隆抗体的靶标。

[0419] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于止血症(haemostatis)的治疗。

[0420] 癌症相关的止血病症也可以作为本发明的介入的靶标。

[0421] 另外,血管疾病,例如血管再狭窄、心肌血管疾病、脑血管疾病、视网膜病(retinopathia)和黄斑变性,包括但不限于,湿性 AMD,可以用抗-TF 单克隆抗体治疗。

[0422] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗具有心血管危险的患者,例如动脉粥样硬化、高血压、糖尿病、血脂障碍、和急性冠状动脉综合症,包括但不限于,急性心肌梗死、中风。

[0423] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于抑制血栓形成,例如 DVT、肾栓塞、肺栓塞、动脉血栓形成,或者用于治疗在动脉手术、外周血管旁路移植或冠状动脉旁路移植、动静脉分流、移除设置物例如支架或导管后的血栓形成。

[0424] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于抑制肾缺血再灌注损伤。

[0425] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗高脂蛋白血症(hyperlipoproteineimia)、甲状旁腺功能亢进(hyperparathyroidism)。

[0426] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗血管炎、ANCA 阳性血管炎、Behcet 病。

[0427] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于阻断外伤诱导的呼吸衰竭,例如急性呼吸窘迫综合症、急性肺损伤。

[0428] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于阻断感染诱导的器官功能障碍,例如肾衰竭、急性呼吸窘迫综合症、急性肺损伤。

[0429] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗各种血栓栓塞疾病,例如由血管成形术、心肌梗死、不稳定型心绞痛和冠状动脉狭窄引起的血栓栓塞疾病。

[0430] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于预防场合,用于治疗系统性感染的 TF 介导的并发症,例如败血症或肺炎。

[0431] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于对具有动脉粥样硬化的血管而有血栓形成危险的患者的预防性处理。

[0432] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗移植物抗宿主疾病。

[0433] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于在胰岛移植中增加 β 细胞移植物植入,预防心脏同种异体移植物血管病(CAV),预防急性移植物排斥。

[0434] 本发明的抗-TF 单克隆抗体还可以用于治疗存在暴露于循环组织因子的微粒(circulating tissue-factor exposing microparticles)的疾病,例如但不限于血管血栓形成、II 型糖尿病、AMI、肺动脉高血压。

[0435] 类似地,本发明涉及用于抑制表达 TF 的肿瘤细胞的生长和 / 或增殖的方法,包括向需要的个体施用本发明的抗体或双特异性分子。在一个实施方案中,所述肿瘤细胞涉及癌症,例如前列腺癌、肺癌(例如非小细胞肺癌)、乳腺癌、结肠直肠癌(例如转移性结肠直肠癌)、胰腺癌、子宫内膜癌、卵巢癌、皮肤黑色素瘤(cutaneous melanoma)、白血病骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和非霍奇金淋巴瘤、皮肤癌、前列腺癌、神经胶质瘤、脑、肾、子宫、膀胱和直肠的癌症。

[0436] 另外,本发明涉及使用可结合人 TF 的单克隆抗体在制备用于治疗癌症(例如上文所述具体癌症适应证中之一)的药物中的用途。

[0437] 在一个实施方案中,要用抗 -TF 抗体治疗的患者的选择是基于其尿液和 / 或血液中组织因子(TF)的水平。在一个具体的实施方案中,要治疗的患者在尿液和 / 或血液中具有相对高水平的 TF。例如,要治疗的患者尿液中的 TF 水平可超过 20ng/ml,例如超过 40ng/ml,例如超过 100ng/ml,例如超过 200ng/ml。作为另一选择,或者除此之外,患者血清中的 TF 水平可以超过 100pg/ml,例如超过 200pg/ml。这可以用例如 ELISA 加以确定。

[0438] 在本发明的治疗方法的一个进一步的实施方案中,在治疗期间对治疗的效力进行监视,例如在预定的时间点。在一个实施方案中,可以通过测量尿液或血液中的 TF 水平,例如通过 ELISA,来监视效力。在另一个实施方案中,可以通过对疾病区域进行可视化来确定效力,可视化例如通过进行一次或多次 PET-CT 扫描,例如使用标记的抗 -TF 抗体,如本发明的标记抗 -TF 抗体进行扫描。而且,标记的抗 -TF 抗体,如本发明的标记抗 -TF 抗体,可以用于检测产生 TF 的肿瘤,例如使用 PET-CT 扫描来检测。

[0439] 对上述治疗方法和应用中的剂量方案进行调节,以提供最佳的理想应答(例如治疗性应答)。例如,可以给予单次推注(bolus),经过一段时间内给予数个分割的剂量,或者可以根据治疗情形的迫切需要而按比例减少或增加剂量。胃肠外组合物可以被配制成单位剂量形式,以便于给药和保持剂量均匀。如这里所用的单位剂量形式,是指适合于作为用于治疗的受试者的单位剂量(unitary dosage)的、物理上离散的单位;每个单位含有预定量活性化合物和必需的药物载体,所述活性化合物的预定量经过计算可产生期望的治疗效果。本发明的单位剂量形式的规格由如下因素支配和直接决定:(a) 活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗效果,和 (b) 现有技术中内在的对配伍这种用于治疗个体敏感性的活性化合物的限制。

[0440] 抗 -TF 抗体的有效剂量和剂量域取决于待治疗的疾病或病症,并可以由本领域技术人员确定。本发明化合物的治疗有效量的一个示例的非限制性范围是大约 0.1-100mg/kg,例如大约 0.1-50mg/kg,例如大约 0.1-20mg/kg,例如 0.1-10mg/kg,例如大约 0.5,例如大约 0.3,例如大约 1,或大约 3mg/kg。

[0441] 本领域具有普通技术的医师或兽医师可以容易地确定和处方所需的药物组合物的有效量。例如,对于药物组合物中所含的抗 -TF 抗体,医师或兽医师可以从低于实现期望治疗效果所需量的剂量水平开始,并逐渐增加剂量,直到实现期望的效果。一般地,本发明组合物的合适的每日剂量是这样的化合物量,它是可以有效产生治疗效果的最低剂量。这种有效剂量一般地取决于上述因素。给药可以是例如静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下,例如施加在靶位点附近。如果期望,可以将药物组合物的有效每日剂量作为 2、3、4、5、6 或更多个亚剂量在每天内以合适的间隔分开给药,任选地采取单位剂量形式。尽管本发明的化合

物有可能单独施用,但是优选地以所述的药物组合物的形式施用化合物。

[0442] 在一个实施方案中,抗-TF 抗体可以以每周 10-500mg/m²,例如 200-400mg/m² 的剂量输注给药。这种给药可以重复进行,例如 1-8 次,例如 3-5 次。给药可以通过历时 2-24 小时,例如 2-12 小时的连续输注来进行。

[0443] 在一个实施方案中,抗-TF 抗体可以通过在一个较长时间内,例如超过 24 小时,缓慢连续输注来进行,以降低毒副作用。

[0444] 在一个实施方案中,抗-TF 抗体可以用每周 250mg-2000mg,例如 300mg,500mg,700mg,1000mg,1500mg 或 2000mg 的剂量给药,最多给 8 次,例如 4-6 次。给药可以通过在 2-24 小时的时间内,例如 2-12 小时的时间内连续输注来进行。这种给药方案可以按照需要重复 1 次或多次,例如在 6 个月或 12 个月后重复 1 次或多次。剂量可以通过测量给药后血液中本发明化合物的量来确定或调整,例如以下述方式:取出生物样品并使用靶定本发明抗-TF 抗体抗原结合区的抗独特型 (anti-idiotypic) 抗体。

[0445] 在一个实施方案中,抗-TF 抗体可以通过维持疗法进行给药,例如在 6 个月或更长的时期内每周 1 次。

[0446] 在一个实施方案中,抗-TF 抗体可以通过如下的方案给药,包括一次输注本发明的抗-TF 抗体,随后输注与放射性同位素偶联的本发明抗-TF 抗体。该方案可以在例如 7-9 天后重复进行。

[0447] 作为非限制性实例,根据本发明的治疗可以作为本发明化合物的每日剂量提供,其量为大约每天 0.1-100mg/kg,例如每天 0.5,0.9,1.0,1.1,1.5,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,40,45,50,60,70,80,90 或 100mg/kg,在治疗开始后第 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,或 40 天中至少之一,或者第 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19 或 20 周中的至少之一进行,或者其任何组合,使用单次剂量或者每 24、12、8、6、4 或 2 小时分次的剂量,或其任意组合。

[0448] 用于肿瘤治疗的“有效量”还可以以其稳定疾病进程的能力来衡量。化合物抑制癌症的能力可以在可预测在人肿瘤中的效力的动物模型体系中进行评估。或者,组合物的这种性质可以通过技术人员已知的体外测定方法检查化合物抑制细胞生长或者诱导细胞凋亡的能力进行评估。治疗有效量的治疗化合物可以减少肿瘤大小,或者以其他方式减轻受试者的症状。本领域的普通技术人员能够根据如下的因素确定这些量,即受试者的体格、受试者症状的严重程度、和所选的具体组合物或给药途径。

[0449] 抗-TF 抗体还可以预防性地给药,以降低发生癌症的危险、延迟癌症进程中事件发生的开始、和 / 或在癌症减轻过程中降低复发的危险。对于通过其它生物学因素已知其体内存在肿瘤但难以定位肿瘤的患者是特别有用的。

[0450] 抗-TF 抗体还可以在组合疗法中施用,即与其它与待治疗疾病或病症相关的治疗剂组合。因此,在一个实施方案中,含有抗体的药物用于和一种或多种其他的治疗剂组合,例如细胞毒剂、化疗剂或抗血管发生剂。

[0451] 这种组合施用可以同时、分别或顺次进行。对于同时施用,试剂可以合适地作为一个组合物或者作为各别的组合物施用。本发明因此还提供了用于治疗涉及如上所述的表达

TF 细胞的疾病的方法,该方法包括施用与一种或多种如下所述的其他治疗剂组合的本发明抗-TF 抗体。

[0452] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗受试者体内涉及表达 TF 的细胞的疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的本发明抗-TF 抗体和至少一种化疗剂。

[0453] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括向需要的对象施加治疗有效量的本发明抗-TF 抗体和至少一种化疗剂。

[0454] 在一个实施方案中,本发明提供了本发明的抗-TF 抗体在制备用于同至少一种癌症的化疗剂一起施用来治疗癌症的药物组合物中的用途。

[0455] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自抗代谢物,例如氨甲蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5-氟尿嘧啶、氨烯咪胺、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨、克拉屈滨和类似的试剂。

[0456] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自烷基化试剂,例如氮芥、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥、美法仑、卡氯芥(BSNU)、环己亚硝脲(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链唑霉素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴肼、丝裂霉素 C、顺铂和其它铂衍生物,例如卡铂,和类似药物。

[0457] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自抗有丝分裂剂,例如紫杉烷类(taxanes),如多西紫杉醇(docetaxel)和紫杉醇,和长春花生物碱,例如长春地辛、长春新碱、长春碱和长春瑞滨。

[0458] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自拓扑异构酶抑制剂,例如托泊替康或依立替康。

[0459] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自抑制细胞生长药物,例如依托泊苷和替尼泊苷。

[0460] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自生长因子抑制剂,例如 ErbB1 (EGFR) 抑制剂(例如易瑞沙、爱必妥(西妥昔单抗)、特罗凯和类似药物),ErbB2 (Her2/neu) 抑制剂(例如赫赛汀和类似药物)和类似药物。

[0461] 在一个实施方案中,这种化疗剂可以选自酪氨酸激酶抑制剂,例如伊马替尼(Glivec, Gleevec STI571)、拉帕替尼、PTK787/ZK222584 和类似药物。

[0462] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗涉及受试者体内表达 TF 的细胞的疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的本发明抗-TF 抗体和至少一种血管新生、新血管化和/或其它血管化抑制剂。

[0463] 这种血管发生抑制剂的实例是尿激酶抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂(例如马立马司他、新伐司他、BAY 12-9566、AG 3340、BMS-275291 和类似药物)、内皮细胞迁移和增殖抑制剂(例如 TNP-470、角鲨胺、2-甲氧雌二醇、考布他汀类(combretastatins)、内皮他丁、血管他丁、青霉胺、SCH66336 (Schering-Plough Corp, Madison, NJ)、R115777 (Janssen Pharmaceutica, Inc, Titusville, NJ) 和类似药物)、血管新生生长因子拮抗剂(例如 ZD6474、SU6668、针对血管发生剂和/或其受体(例如 VEGF, bFGF, 和血管形成素-1)的抗体、沙利度胺、沙利度胺类似物(例如 CC-5013)、Sugen 5416、SU5402、抗血管发生核酶(例如 angiostatin)、干扰素 α (例如干扰素 α 2a)、苏拉明和类似药物)、VEGF-R 激酶抑制剂和

其它抗血管发生酪氨酸激酶抑制剂(例如SU011248)、内皮特异性整联蛋白/生存信号传导抑制剂(例如 vitaxin 和类似药物)、铜拮抗剂/螯合剂(例如四硫钼酸盐、卡托普利和类似药物)、羧胺三唑(carboxyamido-triazole, CAI)、ABT-627、CM101、白介素-12(IL-12)、IM862、PNU145156E 以及抑制血管发生的核苷酸分子(例如反义-VEGF-cDNA、编码血管他丁的 cDNA、编码 p53 的 cDNA 和编码缺陷型 VEGF 受体-2 的 cDNA)和类似药物。

[0464] 这些血管发生、新血管化和/或其它血管化抑制剂的其它实例是抗血管发生肝素衍生物和相关分子(例如肝素酶 III(heparinase III)、替莫唑胺、NK4、巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)、环氧合酶-2 抑制剂、缺氧诱导因子 1、抗血管发生大豆异黄酮、奥替普拉、烟曲霉素及其类似物、生长抑素类似物、戊聚糖多硫酸酯、替可加兰钠、达肝素、肿瘤抑素(tumstatin)、血小板反应蛋白(thrombospondin)、NM-3、combrestatin、canstatin、阿伐他汀(avastatin)、针对其它相关靶标的抗体(例如抗- α -v/beta-3 整联蛋白和抗-kininostatin 单抗)和类似药物。

[0465] 在一个实施方案中,用于和用于治疗如上所述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是抗癌免疫原,例如癌抗原/肿瘤相关抗原(例如上皮细胞粘附分子(EpCAM/TACSTD1)、粘蛋白 1(MUC1)、癌胚抗原(CEA)、肿瘤相关糖蛋白 72(TAG-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7、癌症相关病毒疫苗(例如人乳头瘤病毒疫苗)、肿瘤来源的热激蛋白和类似药物。在本文他处记载的许多其它合适的癌抗原/肿瘤相关抗原和本领域已知的类似分子也可以进一步或者作为另一选择用在这种实施方案中。抗癌免疫原性肽还包括抗独特型“疫苗”,例如 BEC2 抗独特型抗体、米妥莫单抗、CeaVac 和相关抗独特型抗体、针对 MG7 抗体的抗独特型抗体,和其它抗癌抗独特型抗体(见例如 Birebent et al., *Vaccine*. 21(15),1601-12(2003), Li et al., *Chin Med J(Engl)*. 114(9),962-6(2001), Schmitt et al., *Hybridoma*. 13(5),389-96(1994), Maloney et al., *Hybridoma*. 4(3), 191-209(1985), Raychardhuri et al., *J Immunol*. 137(5),1743-9(1986), Pohl et al., *Int J Cancer*. 50(6),958-67(1992), Bohlen et al., *Cytokines Mol Ther*. 2(4), 231-8(1996) 和 Maruyama, *J Immunol Methods*. 264(1-2),121-33(2002))。这种抗独特型抗体还以任选地与载体偶联,该载体可以是合成的(通常是惰性的)分子载体、蛋白质(例如匙孔血蓝蛋白(KLH)(见例如 Ochi et al., *Eur J Immunol*. 17(11),1645-8(1987))或细胞(例如红细胞-见例如 Wi et al., *J Immunol Methods*. 122(2),227-34(1989))。

[0466] 在一个实施方案中,供与用于治疗如上所述病症的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是抗癌细胞因子、趋化因子或其组合。合适的细胞因子和生长因子的实例包括 IFN γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α (例如 INF α 2b)、IFN β 、GM-CSF、CD40L、Flt3 配体、干细胞因子、安西司亭和 TNF α 。合适的趋化因子包括 Glu-Leu-Arg(ELR)-阴性趋化因子,例如来自人 CXC 和 C-C 趋化因子家族的 IP-10, MCP-3, MIG, 和 SDF-1 α 。合适的细胞因子包括细胞因子衍生物、细胞因子变体、细胞因子片段和细胞因子融合蛋白。并且/或者,这些和本文中其它涉及天然发生的编码肽的核酸的方法或用途可以通过“基因激活”和同源重组基因上调技术来进行,如下列文献所述:US 5,968,502, US 6,063,630 和 US 6,187,305 和 EP 0505500。

[0467] 在一个实施方案中,用于与治疗如上所述病症的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是细胞周期控制/细胞凋亡调节子(或“调节剂”)。细胞周期控制/细胞凋亡调节子可

包括靶向并调节细胞周期控制 / 凋亡调节子的分子, 例如 (i) cdc-25 (例如 NSC 663284), (ii) 过度刺激细胞周期的细胞周期蛋白依赖的激酶 (例如夫拉平度 (flavopiridol) (L868275, HMR1275), 7-羟基星孢素 (7-hydroxy-staurosporine) (UCN-01, KW-2401), 和 roscovitine (R-roscovitine, CYC202)), 和 (iii) 端粒酶调节剂 (例如 BIBR1532, SOT-095, GRN163 和在例如 US 6, 440, 735 和 US 6, 713, 055 中记载的组合物)。可干扰细胞凋亡途径的分子的非限制性实例包括 TNF 相关的细胞凋亡诱导配体 (TRAIL) / 凋亡-2 配体 (Apo-2L), 激活 TRAIL 受体的抗体、IFN 和反义 Bcl-2。

[0468] 在一个实施方案中, 用于与治疗上述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是激素调节剂, 例如用于抗雄激素和抗雌激素疗法的药物。这些激素调节剂的实例有他莫昔芬、碘昔芬、氟维司群、屈洛昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、己烯雌酚、乙炔雌二醇 / 炔雌醇、抗雄激素 (antiandrogene) (例如氟他米特 (flutamide) / 氟他胺 (eulexin))、孕酮 (例如己酸羟孕酮、甲羟孕酮 / 普维拉、甲地孕酮醋酸酯 / 梅格施)、肾上腺皮质类固醇 (例如氢化可的松、泼尼松)、黄体化激素释放激素 (和其类似物或其它 LHRH 激动剂, 例如布舍瑞林和戈舍瑞林)、芳香酶抑制剂 (例如阿那曲唑 / 瑞宁得、氨鲁米特 / cytradene、依西美坦)、激素抑制剂 (例如奥曲肽 / 善得定) 和类似药物。

[0469] 在一个实施方案中, 用于同治疗上述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是抗变应性缺乏 (anti-anergic) 药物 (例如小分子化合物、蛋白质、糖蛋白、或阻断对肿瘤和癌抗原耐受性的抗体)。这些化合物的实例是可阻断 CTLA-4 活性的分子, 例如 MDX-010 (易普利姆玛 (ipilimumab)) (Phan et al., PNAS USA 100, 8372 (2003))。

[0470] 在一个实施方案中, 用于同治疗上述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是含肿瘤抑制基因的核酸或载体, 例如编码人重组野生型 p53/SCH58500 的复制缺陷型腺病毒等; 靶定癌基因、突变或不受调节基因的反义核酸; 或靶定突变或不受调节基因的 siRNA。肿瘤抑制靶标的实例包括例如 BRCA1, RB1, BRCA2, DPC4 (Smad4), MSH2, MLH1, 和 DCC。

[0471] 在一个实施方案中, 用于同治疗上述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是抗癌核酸, 例如 genasense (augmerosen/G3139)、LY900003 (ISIS 3521)、ISIS 2503、OGX-011 (ISIS 112989)、LE-AON/LEraf-AON (脂质体包裹的 c-raf 反义寡核苷酸 / ISIS-5132)、MG98、和其它靶定 PKC α 、丛生蛋白 (clusterin)、IGFBP、蛋白激酶 A、细胞周期蛋白 D1、或 Bcl-2h 的反义核酸。

[0472] 在一个实施方案中, 用于同治疗上述疾病的抗-TF 抗体联合使用的治疗剂可以是抗癌抑制性 RNA 分子 (见例如 Lin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7 (2001), Erratum in: Curr Cancer Drug Targets. 3(3), 237 (2003), Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16 (2004), Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105 (2004), Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144 (2003), Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701 (2003) 和 Zhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78 (2003))。

[0473] 本发明的组合物和联合给药方法还包括施用核酸疫苗, 例如编码这些癌抗原 / 肿瘤相关抗原的裸露 DNA 疫苗 (见例如 US 5, 589, 466, US 5, 593, 972, US 5, 703, 057, US 5, 879, 687, US 6, 235, 523, 和 US 6, 387, 888)。在一个实施方案中, 联合给药方法和 / 或联合组合物包括自体疫苗组合物。在一个实施方案中, 联合组合物和 / 或联合给药方法包括

全细胞疫苗或细胞因子表达细胞（例如表达重组 IL-2 的成纤维细胞、表达重组细胞因子的树突细胞等）（见例如 Kowalczyk et al., *Acta Biochim Pol.* 50(3), 613-24(2003), Reilly et al., *Methods Mol Med.* 69, 233-57(2002) 和 Tirapu et al., *Curr Gene Ther.* 2(1), 79-89(2002)）。这种可用于本发明的组合方法的自体细胞方法的另一个实例是 My Vax® 个体化免疫治疗方法（先前称作 GTOP-99）（Genitope 公司 -Redwood 市, CA, USA）。

[0474] 在一个实施方案中, 本发明提供了联合组合物和联合施用方法, 其中抗 -TF 抗体与病毒、病毒蛋白等组合或者共同施用。例如, 复制缺陷病毒, 其一般能够在体内进行 1 轮或者少数几轮复制, 并且靶定肿瘤细胞, 可以用作这种组合物和方法的组分。这类病毒试剂可以包含编码免疫刺激物（例如 GM-CSF 和 / 或 IL-2）的核酸, 或者与其相伴随。天然的溶瘤病毒和这些重组溶瘤病毒（例如 HSV-1 病毒、呼肠孤病毒、复制缺陷和复制敏感型腺病毒等）可以用作这些方法和组合物的组分。因此, 在一个实施方案中, 本发明提供了联合组合物和联合给药方法, 其中抗 -TF 抗体与溶瘤病毒组合或共同施用。这些病毒的实例包括溶瘤腺病毒和疱疹病毒, 其可以是或者不是修饰病毒（见例如 Shah et al., *J Neurooncol.* 65(3), 203-26(2003), Stiles et al., *Surgery.* 134(2), 357-64(2003), Sunarmura et al., *Pancreas.* 28(3), 326-9(2004), Teshigahara et al., *J Surg Oncol.* 85(1), 42-7(2004), Varghese et al., *Cancer Gene Ther.* 9(12), 967-78(2002), Wildner et al., *Cancer Res.* 59(2), 410-3(1999), Yamanaka, *Int J Oncol.* 24(4), 919-23(2004) 和 Zwiebel et al., *Semin Oncol.* 28(4), 336-43(2001)）。

[0475] 本发明的联合组合物和联合给药方法还可以涉及“全细胞”和“过继性”免疫治疗方法。例如这些方法可以包括输注或再输注免疫系统细胞（例如肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL), 如 CD4⁺ 和 / 或 CD8⁺T 细胞（例如用肿瘤特异抗原和 / 或遗传增强子扩增的 T 细胞）, 表达抗体的 B 细胞或其它抗体产生 / 呈递细胞, 树突细胞（例如表达抗细胞因子的重组树突细胞、用 DC 扩增剂如 GM-CSF 和 / 或 Flt3-L 培养的树突细胞, 和 / 或负载肿瘤相关抗原的树突细胞）, 抗肿瘤 NK 细胞, 所谓的杂交细胞, 或其组合。细胞裂解物也可用于这些方法和组合物。可用于这些方面的正在临床试验中的细胞“疫苗”包括 Canvaxin™, APC-8015 (Dendreon), HSPPC-96 (Antigenics), 和 Melacine® 细胞裂解物。从癌细胞脱落 (shed from) 的抗原和其混合物（见例如 Bystryn et al., *Clinical Cancer Research* Vol. 7, 1882-1887, July 2001), 任选地与佐剂例如明矾混合, 也可以作为这些方法和联合组合物中的组分。

[0476] 在一个实施方案中, 抗 -TF 抗体可以和体内接种法 (internal vaccination method) 组合输送给患者。体内接种是指患者体内的诱导的肿瘤或癌细胞死亡, 例如药物诱导或放射诱导的肿瘤细胞的细胞死亡, 其典型地导致针对 (i) 肿瘤细胞整体或 (ii) 肿瘤细胞的部分, 包括 (a) 分泌蛋白、糖蛋白或其它产物, (b) 膜相关蛋白或糖蛋白或其它与膜关联或插入在膜内的组分, 和 / 或 (c) 细胞内蛋白或其它细胞内组分的免疫应答的引发。体内接种诱导的免疫应答可以是体液型（即抗体 - 补体介导的）或细胞介导型（例如可识别体内被杀死的肿瘤细胞或其部分的内源细胞毒性 T 淋巴细胞的发生和 / 或增加）。除了放射疗法之外, 可用于诱导所述肿瘤细胞死亡和体内接种的药物和试剂的非限制实例是常规的化疗剂、细胞周期抑制剂、抗血管发生药物、单克隆抗体、细胞凋亡诱导剂和信号传导抑制剂。

[0477] 其它可能作为治疗剂与抗 -TF 抗体联用来治疗上述疾病的抗癌剂的实例是分化

诱导剂、视黄酸类似物（例如全反式视黄酸、13-顺视黄酸和类似药物）、维生素 D 类似物（例如西奥骨化醇和类似药物）、如下物质的抑制剂：ErbB3、ErbB4、IGF-1R、胰岛素受体、PDGFR α 、PDGFR β 、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、c-met、Ron、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7，和类似药物。

[0478] 其它可能作为治疗剂与抗-TF 抗体联用来治疗上述疾病的抗癌剂的实例是组织蛋白酶 B、组织蛋白酶 D 脱氢酶活性的调节剂、谷胱甘肽-S-转移酶（例如谷氨酰半胱氨酸合成酶 (glutacylcysteine synthetase) 和乳酸脱氢酶），和类似药物。

[0479] 其它可能作为治疗剂与抗-TF 抗体联用来治疗上述疾病的抗癌剂实例是雌莫司汀和表柔比星。

[0480] 其它可能作为治疗剂与抗-TF 抗体联用来治疗上述疾病的抗癌剂实例是 HSP90 抑制剂，例如 17-烯丙基氨基格尔德霉素，针对肿瘤抗原如 PSA, CA125, KSA 等的抗体，整联蛋白如整联蛋白 β 1, VCAM 抑制剂和类似药物。

[0481] 其它可能作为治疗剂与抗-TF 抗体联用来治疗上述疾病的抗癌剂实例是钙调磷酸酶 (calcineurin) 抑制剂（例如伐司朴达、PSC 833 和其它 MDR-1 或 p-糖蛋白抑制剂）、TOR 抑制剂（例如西罗莫司、依维莫司和雷帕霉素），和“淋巴细胞归巢”机制抑制剂（例如 FTY720），和对细胞信号传导具有影响的试剂，例如粘附分子抑制剂（例如抗-LFA 等）。

[0482] 在一个实施方案中，本发明的抗-TF 抗体用于和一种或多种其它的治疗抗体联合使用，例如贝伐单抗（阿伐斯汀®），zalutumumab，西妥昔单抗(Erbitux®)，帕尼单抗 (Vectibix™)，ofatumumab，zanolimumab，daratumumab，兰尼单抗(Lucentis®)，赛尼哌，Simulect，Remicade，Humira，Tysabri，Xolair，raptiva，nimotuzumab，美罗华和 / 或曲妥单抗（赫赛汀®）。其它可用于和本发明抗体联合使用的治疗抗体在下列文献中有公开：W098/40408（能够结合天然人 TF 的抗体），W004/094475（能够结合人组织因子的抗体，与正常血浆对照相比，其不抑制因子介导的凝血），W003/093422（与 TF:VIIa 复合体的结合亲和力大于与单独的 TF 的亲和力），或 W003/037361（用于细胞凋亡相关治疗的 TF 激动剂或拮抗剂）。

[0483] 在另一个实施方案中，两种或多种如这里所述的本发明不同抗体联合使用来治疗疾病。特别感兴趣的组合包括两种或多种非竞争的抗体。因此，在一个实施方案中，用这里所定义的交叉阻断 (cross-block) 组 I 中的抗体和如这里定义的组 II 或 III 中的抗体组合治疗患者。在另一个实施方案中，用如下面定义的组 II 中的抗体与组 III 中的抗体组合治疗患者。这些组合疗法可以导致每个细胞结合更多数目的抗体分子，从而可提供更高的效力，例如通过激活补体介导的溶解。

[0484] 在一个实施方案中，抗-TF 抗体的施用可以与一种或多种如下所述的作用剂的递送相结合，所述作用剂可促进抗-TF 抗体或联合组合物到达肿瘤内部。这种方法可以例如与松弛素的递送相结合，其中松弛素能够松弛肿瘤（见例如 US 6,719,977）。在一个实施方案中，本发明的抗-TF 抗体可以和细胞渗透肽 (CPP) 键合。细胞渗透肽和相关肽（例如工程化的细胞渗透性抗体）在例如下列文献中有记载：Zhao et al., J Immunol Method s. 254(1-2), 137-45(2001), Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6(2000). Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76(2004), Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75(2003), Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77(1998) 和 Tseng

et al., *Mol Pharmacol.* 62(4), 864-72 (2002)。

[0485] 在一个实施方案中,本发明涉及一种用于治疗受试者体内涉及表达 TF 的细胞的疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的抗 -TF 抗体和至少一种抗炎剂。

[0486] 在一个实施方案中,这种抗炎剂可以从下选出:阿司匹林和其它水杨酸盐、Cox-2 抑制剂(例如罗非昔布和塞来昔布)、NSAID(例如布洛芬、非诺洛芬、萘普生、舒林酸、双氯芬酸、吡罗昔康、酮洛芬、双氟尼酸、萘丁美酮、依托度酸、奥沙普秦和吲哚美辛)、抗 -IL6R 抗体、抗 -IL8 抗体(例如 W02004058797 中记载的抗体,例如 10F8)、抗 -IL15 抗体(例如 W003017935 和 W02004076620 中记载的抗体)、抗 -IL15R 抗体、抗 -CD4 抗体(例如 zanolimumab)、抗 -CD 11a 抗体(例如 efalizumab)、抗 - α -4/ β -1 整联蛋白(VLA4)抗体(例如那他珠单抗)、用于治疗炎症疾病的 CTLA4-Ig、泼尼松龙、泼尼松、缓解疾病的抗风湿药物(DMARDs)如氨甲蝶呤、羟基氯喹、柳氮磺吡啶、嘧啶合成抑制剂(例如来氟米特)、IL-1 受体阻断剂(例如阿那白滞素)、TNF- α 阻断剂(例如依那西普、英夫利昔单抗和阿达木单抗)和类似药物。

[0487] 在一个实施方案中,这样的免疫抑制和/或免疫调节剂可以从下选出:环孢菌素、硫唑嘌呤、霉酚酸、霉酚酸酯、皮质激素类如泼尼松、氨甲蝶呤、金盐、柳氮磺吡啶、抗疟药、布喹那、来氟米特、咪唑立宾、15-脱氧精脒菌素(15-deoxyspergualine)、6-巯基嘌呤、环磷酰胺、雷帕霉素、他克莫司(FK-506)、OKT3、抗-胸腺细胞球蛋白、胸腺喷丁、胸腺素- α 和类似药物。

[0488] 在一个实施方案中,这种免疫抑制和/或免疫调节剂可以从免疫抑制抗体中选出,例如与 IL-2 受体的 p75 结合的抗体,针对 CD25 的抗体(例如在 W02004045512 中所述,如 AB1, AB7, AB11 和 AB12),或与例如 MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD28, B7, CD40, CD45, IFN γ , TNF- α , IL-4, IL-5, IL-6R, IL-7, IL-8, IL-10, CD11a 或 CD58 结合的抗体,或与它们的配体结合的抗体。

[0489] 在一个实施方案中,这种免疫抑制和/或免疫调节剂可以从下选出:可溶的 IL-15R, IL-10, B7 分子(B7-1, B7-2, 其变体和其片段), ICOS 和 OX40, 阴性 T 细胞调节子抑制剂(例如针对 CTLA4 的抗体)和类似药物。

[0490] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗受试者体内涉及表达 TF 的细胞的疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的抗 -TF 抗体和抗 -C3b(i) 抗体。

[0491] 在一个实施方案中,用于同治疗如上所述疾病的抗 -TF 抗体联合使用的治疗剂可以从下选出:组蛋白脱乙酰酶抑制剂(例如苯基丁酸盐)和/或 DNA 修复剂(例如 DNA 修复酶和相关组合物,例如 dimericine)。

[0492] 对于本发明的包括施用治疗有效量的抗 -TF 抗体用于治疗如上所述疾病的方法,还可以包括抗癌指向的光动力学疗法(例如抗癌激光疗法-其任选地可以使用光敏剂来实施,见例如 Zhang et al., *J Control Release.* 93(2), 141-50 (2003)), 抗癌声波和震动波疗法(见例如 Kambe et al., *Hum Cell.* 10(1), 87-94 (1997)), 和/或抗癌营养药疗法(见例如 Roudebush et al., *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 34(1), 249-69, viii (2004) 和 Rafi, *Nutrition.* 20(1), 78-82 (2004))。类似地,抗 -TF 抗体可用于制备与抗癌指向的

光动力学疗法（例如抗癌激光疗法 - 其任选地可以使用光敏剂）、抗癌声波和震动波疗法、和 / 或抗癌营养疗法一起施用以治疗如上所述疾病的药物组合物。

[0493] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗受试者体内涉及 TF 表达细胞的疾病的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的抗-TF 抗体,例如本发明的抗-TF 抗体,和放射疗法。

[0494] 在一个实施方案中,本发明提供了一种用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括向需要的受试者施用治疗有效量的抗-TF 抗体,例如本发明的抗-TF 抗体,和放射疗法。

[0495] 在一个实施方案中,本发明提供了抗-TF 抗体,例如本发明的抗-TF 抗体在制备用于和放射疗法组合施用的治疗癌症的药物组合物。

[0496] 放射疗法可以包括放射或者相关的向患者施用放疗药物。放射源可以在待治疗患者的体外或者体内（放射治疗可以例如处于外部射束放射疗法 (EBRT) 或近程放射治疗 (BT) 的形式)。可用于实施这些方法的放射活性元素包括例如镭、铯-137、铯-192、镭-241、金-198、钴-57、铜-67、钨-99、碘-123、碘-131 和铟-111。

[0497] 在进一步的实施方案中,本发明提供了一种用于治疗或预防癌症的方法,该方法包括与外科手术组合向需要的受试者施用治疗有效量的抗-TF 抗体,例如本发明的抗-TF 抗体。

[0498] 如上所述,本发明的药物组合物可以在组合疗法中施用,即与一种或多种与待治疗的病症相关的药剂组合,或者作为各别的药物组合物,或者将本发明化合物与一种或多种如上所述的额外治疗剂共同配制。这些组合疗法需要的本发明化合物和 / 或共施用药剂的剂量可以更低,从而避免与各种单一疗法相关的可能毒性或者并发症。

[0499] 除上以外,其它感兴趣的组合疗法包括如下:

[0500] ●对于胰腺癌治疗,抗-TF 抗体与抗代谢物（例如 5-氟尿嘧啶和 / 或吉西他滨）组合,可能与一个或多个从下组选出的化合物组合:90Y-hPAM4、ARC-100、ARQ-197、AZD-6244、bardoxolone methyl、cixutumumab、(IMC-A12)、folitixorin calcium、GVAX、易普利姆玛、KRX-0601、美巴龙、MGCD-0103、MORAb-009、PX-12、Rh-Apo2L、TLN-4601、trabedersen、volociximab (M200)、WX-671、培美曲塞,卢比替康,伊沙匹隆、OCX-0191Vion、216586-46-8、拉帕替尼、马妥珠单抗 (matuzumab)、伊马替尼、索拉菲尼 (sorafenib)、曲妥单抗、exabepilone、埃罗替尼 (erlotinib)、阿伐斯汀和西妥昔单抗。

[0501] ●对于结肠直肠癌治疗,抗-TF 抗体与一个或多个从下选出的化合物组合:吉西他滨、贝伐单抗、FOLFOX、FOLFIRI、XELOX、IFL、奥沙利铂、伊立替康、5-FU/LV、卡培他滨、UFT、EGFR 靶定剂、例如西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗 (zalutumumab)、尼妥珠单抗 (nimotuzumab); VEGF 抑制剂、或酪氨酸激酶抑制剂如舒尼替尼。

[0502] ●对于乳腺癌治疗,抗-TF 抗体与一个或多个从下选出的化合物组合:抗代谢物、蒽环类抗生素、紫杉烷类、烷基化剂、埃博霉素抗激素（来曲唑 (femar)、他莫昔芬等）、ErbB2 (Her2/neu) 抑制剂（例如赫赛汀和类似药物）、CAF/FAC (环磷酰胺 (cyclophosphamide)、多柔比星、5FU) AC (cyclo, doxo)、CMF (cyclo、氨甲蝶呤、5FU)、多西紫杉醇 + 卡培他滨、GT (紫杉醇、吉西他滨) FEC (cyclo, epi, 5FU) 与赫赛汀组合、紫杉醇 +/- 卡铂、长春瑞滨、多西紫杉醇、CT 与拉帕替尼组合; 卡培他滨。

[0503] ●对于膀胱癌治疗,抗-TF 抗体与一个或多个从下选出的化合物组合:抗代谢物

(吉西他滨、力比泰 (alimta)、氨甲蝶呤)、铂类似物 (顺铂、卡铂)、EGFr 抑制剂 (例如西妥昔单抗或扎鲁木单抗)、VEGF 抑制剂 (例如阿伐斯汀)、多柔比星、酪氨酸激酶抑制剂例如吉非替尼、曲妥单抗、抗有丝分裂剂如紫杉烷类,例如紫杉醇,和长春碱类例如长春花碱。

[0504] ●对于前列腺癌治疗,抗-TF 抗体与一个或多个从下选出的化合物组合:激素/激素疗法;例如抗雄激素、黄体生成素释放激素 (LHRH) 激动剂,和化疗剂例如紫杉烷类、米托蒽醌、雌莫司汀、5FU、长春花碱、伊沙匹隆。

[0505] ●对于卵巢癌治疗,抗-TF 抗体与一个或多个从下选出的化合物组合:抗有丝分裂剂,例如紫杉烷类,和长春花生物碱类、楷莱 (caelyx)、托泊替康。

[0506] 诊断用途

[0507] 本发明的抗-TF 抗体还可以用于诊断目的。因此,在进一步的方面中,本发明涉及包含如本文中定义的抗-TF 抗体的诊断组合物。

[0508] 在一个实施方案中,本发明的抗-TF 抗体可以用于通过检测 TF 的水平或在其膜表面上含有 TF 的细胞的水平而在体内或体外诊断激活的 TF 表达细胞在其发病中发挥积极作用的疾病。这可以通过例如在允许抗体和 TF 之间形成复合体的条件下使待测样品,任选地与对照样品一起,与抗-TF 抗体接触而实现。然后检测复合体的形成 (例如使用 ELISA)。当与测试样品一道使用对照样品时,对两个样品均检测复合体,并且样品间复合体形成的任何统计学显著的差异指示测试样品中 TF 的存在。

[0509] 因此,在进一步的方面中,本发明涉及一种用于检测样品中 TF 抗原或表达 TF 的细胞的存在的方法,包括:

[0510] - 在允许抗体与 TF 间形成复合体的条件下,使样品与本发明的抗-TF 抗体或本发明的双特异性分子接触;和

[0511] - 分析是否形成了复合体。

[0512] 在一个实施方案中,该方法在体外实施。

[0513] 更具体地,本发明提供了用于鉴定、诊断侵袭性细胞和组织,以及其它被本发明的抗-TF 抗体靶定的细胞的方法,和用于监视治疗性处理的进展、治疗后状态、发生癌症的危险、癌症进程等的方法。

[0514] 在这种诊断测定法的一个实例中,本发明提供了诊断组织中侵袭性细胞水平的方法,包括在抗-TF 抗体和潜在的含 TF 组织之间形成免疫复合体,和检测免疫复合体的形成,其中免疫复合体的形成与组织中侵袭细胞的存在相关。接触可以使用被标记的分离抗体和标准成像技术在体内实施,或者可以在体外在组织样品上实施。

[0515] 抗-TF 抗体可用于通过任何合适的技术检测任何合适的生物样品中含 TF 的肽和肽片段。本发明提供的常规免疫测定法的实例包括,但不限于,ELISA、RIA、FACS 测定、等离子共振测定、色谱测定、组织免疫组化、western 印迹、和/或使用抗-TF 抗体的免疫沉淀。本发明的抗-TF 抗体可用于检测来自人的 TF 和 TF 片段。用于在这些技术中使用的抗-TF 抗体和/或第二抗体的合适标记物包括,但不限于,各种酶、辅基、荧光物质、发光物质和放射活性物质。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或乙酰胆碱酯酶;合适辅基复合体的实例包括链亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸盐、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素 (dichlorotriazinylamine fluorescein)/丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁

米诺；而合适的放射活性物质的实例包括 ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , 和 ^3H 。

[0516] 抗-TF 抗体还可以在生物样品中通过竞争免疫测定方法利用标记有可检测底物的 TF 肽标准和未标记的抗-TF 抗体进行测定。在这种测定中,将生物样品、经标记的 TF 肽标准和抗-TF 抗体混合,并检测与未标记的抗-TF 抗体结合的经标记的 TF 标准肽的量。生物样品中 TF 抗体的量与和抗-TF 抗体结合的经标记 TF 标准的量成反比。

[0517] 抗-TF 抗体在肿瘤的体内成像方面特别有用。与 TF 相关的肿瘤体内成像可以通过任何合适的技术实施。例如,可使用 ^{99}Tc - 标记法或者使用另一种放射 γ 射线的同位素的标记法,来标记肿瘤中的抗-TF 抗体或者来自肿瘤的第二标记(例如 FITC 标记)的抗-TF 抗体:TF 复合物,并用 γ 闪烁照相机(例如 Elscint Apex 409ECT 器件)成像,典型地使用低能量、高分辨率准直仪或低能量全能准直仪。然后,可以对被染色的组织进行放射性计数评估,作为肿瘤内 TF- 相关肽的量的指示。通过使用这些技术获得的图像可用于评估患者、哺乳动物或组织内 TF 的生物分布(例如当使用 TF 或 TF 片段作为侵袭性癌细胞的存在生物标志时)。这种技术的变化形式包括使用磁共振成像(MRI)以提供优于 γ 照相机技术的成像。类似的免疫闪烁扫描方法和原理在例如下列文献中有记载:Srivastava(编辑), *Radiolabeled Monoclonal Antibodies For Imaging And Therapy* (Plenum 出版社 1988), Chase, "Medical Applications of Radioisotopes," in Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第 18 版, Gennaro et al., (编辑), 第 624-652 页 (Mack Publishing Co., 1990), 和 Brown, "Clinical Use of Monoclonal Antibodies," in *Biotechnology And Pharmacy* 227-49, Pezzuto et al., (编辑) (Chapman & Hall 1993)。这些图像还可以用于其它的抗癌剂的靶向递送,其它抗癌剂的实例在这里已有记载(例如细胞凋亡剂、毒素或 CHOP 化疗组合物)。并且/或者这些图像还可以作为除去肿瘤的外科手术技术的基础。而且,这种体内成像技术可允许在患者被鉴定患有肿瘤(由于其它生物标志、转移等的存在),但是肿瘤无法用常规的分析技术加以鉴定的情况下鉴定和定位肿瘤。所有这些都是本发明的特征。

[0518] 本发明提供的体内成像和其它诊断方法特别有用于检测人患者(例如先前没有被诊断患有癌症的患者或者处于癌症恢复/缓解期的患者)体内的微转移。例如,占全部癌细胞高达 90% 的癌瘤(Carcinoma)癌细胞已经被证明可用抗-TF 抗体偶联组合物良好染色。用这里所述的单克隆抗-TF 抗体检出可以指示攻击性/侵袭性上皮肿瘤的存在,或者/并且提供针对这些微转移使用相关单克隆抗-TF 抗体的可行性的指示。

[0519] 在一个实施方案中,本发明提供了体内成像方法,其中将本发明的抗-TF 抗体与检测-促进不透射线试剂(detection-promoting radio-opaque agent)偶联,将偶联抗体施用给宿主(例如通过注射到血流中),并测定宿主中标记抗体的存在和定位。通过这种技术和这里提供的任何其它诊断方法,本发明提供了用于筛选人患者体内或从人患者获取的生物样品中疾病相关细胞的存在的方法。

[0520] 为了诊断成像,放射性同位素可以直接或者通过使用中间功能基团间接地与抗-TF 抗体连接。有用的中间功能基团包括螯合剂,例如乙二胺四乙酸和二乙三胺五乙酸(见例如 US 5, 057, 313)。

[0521] 除了放射性同位素和不透射线试剂之外,诊断方法可以用与染料(例如与生物素-链亲和素复合物偶联)、造影剂、荧光化合物或分子和用于磁共振成像(MRI)的增强剂

(例如顺磁离子)(见例如 US Pat. No. 6, 331, 175, 其记载了 MRI 技术和与 MRI 增强剂偶联的抗体的制备)偶联的抗-TF 抗体实施。这种诊断 / 检测试剂可以从用于磁共振成像的试剂和荧光化合物中选择。为了使抗-TF 抗体负载放射活性金属或顺磁离子,可能需要使它与具有长尾部的试剂反应,该尾部上搭接有多个用于与离子结合的螯合基团。这种尾部可以是聚合物,例如多聚赖氨酸、多糖或其它具有可以与螯合基团结合的悬吊基团的衍生化或可衍生化链,所述的螯合基团例如卟啉、多胺、冠醚、双缩氨硫脲 (bisthiosemicarbazone)、聚脲,和已知可用于此目的的类似基团。螯合剂可以用标准化学法与抗-TF 抗体偶联。

[0522] 因此,本发明提供了诊断性抗-TF 抗体偶联物,其中抗-TF 抗体与造影剂(例如用于磁共振成像、计算机断层扫描或超声对比增强剂)或放射性核素偶联,放射性核素可以是例如发射 γ 、 β 、 α , 俄歇电子、或正电子的同位素。

[0523] 在进一步的方面中,本发明涉及用于检测样品中 TF 抗原或表达 TF 的细胞的存在试剂盒,包括

[0524] - 本发明的抗-TF 抗体或本发明的双特异性分子 ;和

[0525] - 试剂盒的使用说明书。

[0526] 在一个实施方案中,本发明提供了用于诊断癌症的试剂盒,包括含有抗-TF 抗体的容器,和一种或多种用于检测抗-TF 抗体与 TF 肽结合的试剂。试剂可以包括例如荧光标签、酶标签、或其它可检测标签。试剂还可以包括用于酶反应的第二或第三抗体或试剂,其中酶反应产生能被可视化的产物。在一个实施方案中,本发明提供了一种诊断试剂盒,其包括置于合适的容器中的处于被标记或未标记的形式的一种或多种本发明的抗-TF 抗体、用于在间接测定中用于温育的试剂、和用于在这种测定中进行检测的底物或衍生化试剂,这些试剂取决于标记物的性质。还可以包括对照试剂和使用说明书。

[0527] 还可以提供诊断试剂盒来利用抗-TF 抗体,例如偶联 / 标记的抗-TF 抗体,检测组织样品或宿主内细胞活性或检测 TF 肽的存在。在这种诊断试剂盒,以及在本文它处记载的用于治疗应用的试剂盒中,抗-TF 抗体典型地以冻干形式置于容器内,单独提供或者与额外的特异针对靶细胞或肽的抗体一起提供。典型地,还包括药学可接受的载体(例如惰性稀释剂)和 / 或其组分例如 Tris、磷酸盐或碳酸盐缓冲剂、稳定剂、防腐剂、杀生物剂、杀生物剂、惰性蛋白质如血清白蛋白、等等(典型地置于另外的容器中供混合),和额外的试剂(典型地也置于另外的容器内)。在某些试剂盒中,还包括能够与抗-TF 抗体结合的第二抗体,其通常置于另外的容器内。第二抗体通常与标记物偶联,并且以类似于本发明抗-TF 抗体的方式配制。使用上述的和本文它处记载的方法,可以利用抗-TF 抗体来限定癌 / 肿瘤细胞的亚类,和表征这些细胞和相关组织 / 生长物。

[0528] 通过从患者取出组织样本,并向这种样本提供本发明的标记的抗-TF 抗体的组合,可以实现原位检测。本发明抗-TF 抗体的提供可以通过向生物样品施加 (apply) 或者覆盖 (overlay) 本发明的标记抗-TF 抗体来实现。通过使用这种程序,不仅有可能确定 TF 或 TF 片段的存在,还可能确定这些肽在所检测组织中的分布(例如在评估癌细胞的扩散时)。利用本发明,普通技术人员能够容易地意识到,可对大量组织学方法中的任何一种(例如染色程序)加以修改以实现这种原位检测。

[0529] 在进一步的方面中,本发明涉及一种抗独特型抗体,其与如本文所述的本发明抗-TF 抗体结合。

[0530] 抗-独特型 (Id) 抗体是如下的抗体,其识别一般与抗体的抗原结合位点关联的独特决定簇。Id 抗体可以通过用要制备抗 Id 的抗 TF 单抗免疫动物来制备,其中所述动物的物种和遗传类型与该抗 TF 单抗所来源的物种和遗传类型相同。被免疫的动物通常能够识别用来免疫的抗体的独特型决定簇,并通过产生针对这些独特型决定簇的抗体(抗-Id 抗体)来对其做出应答。这种抗体在例如 US 4,699,880 中有记载。这种抗体是本发明的进一步特征。

[0531] 抗-Id 抗体还可用作“免疫原”在另一个动物内诱导免疫应答,产生所谓的抗-抗-Id 抗体。抗-抗-Id 抗体可能和诱导抗-Id 抗体的最初单抗在表位上相同。因此,通过使用针对某种单抗的独特型决定子的抗体,有可能鉴定出其它表达具有相同特异性的抗体的克隆。抗-Id 抗体可以通过任何合适的技术进行改变(借此产生抗-Id 抗体变体)和/或衍生化,例如在本文它处关于本发明抗-TF 抗体所描述的技术。例如,抗-Id 单抗可以和载体如钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联,并用于免疫 BALB/c 小鼠。来自这些小鼠的血清通常含有抗-抗-Id 抗体,其具有和原始/亲本 TF 抗体相似(即使不相同)的结合性质。

[0532] 本发明进一步通过如下的实施例进行举例说明,但它们不应视为进一步的限制。

[0533] 实施例

[0534] 实施例 1

[0535] 组织因子(TF)的表达构建体

[0536] 产生了用于在 HEK、NS0 或 CHO 细胞中表达 TF 或其胞外域的完全密码子优化构建体。由这些构建体编码的蛋白质与 TF 的 Genbank 登录号 NP 001984 相同。该构建体含有合适的用于克隆的限制位点和最优的 Kozak 序列(Kozak,1987)。将该构建体克隆在哺乳动物表达载体 pEE13.4(Lonza Biologics)中(Bebbington, Renner et al.1992),获得 pEE13.4TF。使用 PCR 从该合成构建体扩增编码 TF 胞外域(ECD)(氨基酸 1-251)的部分,同时添加一个含有 6 个组氨酸残基的 C 端 His 标签(TFECDis)。将该构建体克隆到 pEE13.4 中,并进行完全测序以确认构建体的正确性。

[0537] 实施例 2

[0538] 在 HEK-293F 细胞中瞬时表达

[0539] Freestyle™ 293-F(一种适应悬浮生长和化学限定 Freestyle 培养基的 HEK-293 亚克隆,(HEK-293F))细胞从 Invitrogen 获得,并用 293fectin(Invitrogen)根据制造商的使用说明用合适的质粒 DNA 进行转染。在抗体表达的情况下,共表达如实施例 10 中所述的合适重链和轻链载体。

[0540] 实施例 3

[0541] 在 NS0 细胞中半稳定表达

[0542] 将 pEE13.4TF 稳定转染到 NS0 细胞中,并在不含谷氨酰胺和存在 7.5 μM 甲基亚砷亚胺(MSX)的条件下生长选择稳定的克隆。让克隆池(pool of clones)在悬浮培养基中生长,同时保持选择压力。池的 TF 表达通过 FACS 分析进行检验,并保全备用。

[0543] 实施例 4

[0544] 在 CHO 细胞中稳定表达

[0545] 将 pEE13.4TF 稳定转染到 CHO-K1SV(Lonza Biologics)细胞中,并在不含谷氨酰胺和存在 50 μM MSX 的条件下生长选择稳定的克隆。挑取单克隆、扩增并通过如下所述的

FACS 分析进行 TF 表达检验。选择高表达克隆并保全备用。

[0546] 实施例 5

[0547] 带 His 标签 TF 的纯化

[0548] TFECdHis 在 I HEK-293F 细胞中表达。TFECdHis 中的 his 标签使得用固定的金属亲和色谱进行纯化成为可能。在该过程中,使固定在色谱树脂上的螯合剂带上 Co^{2+} 阳离子。将含有 TFECdHis 的上清液与树脂以分批模式(即溶液)温育。带 His- 标签的蛋白质与树脂珠子强力结合,而存在于培养上清液中的其它蛋白质则不会强力结合。温育之后,从上清液中回收珠子,并填充进柱子中。清洗柱子以除去弱结合的蛋白质。然后用含有咪唑的缓冲液洗脱强结合的 TFECdHis 蛋白,其中咪唑与 His 竞争结合 Co^{2+} 。通过在脱盐柱上进行缓冲液交换从蛋白质中除去洗脱液。

[0549] 实施例 6

[0550] 转基因小鼠免疫程序

[0551] 人单抗小鼠每 14 天交替用 5×10^6 半稳定转染的 NS0-TF 细胞或用 $20 \mu\text{g}$ TFECdHis 蛋白质进行免疫。总共实施 8 次免疫,4 次腹腔内 (IP) 免疫和 4 次尾根皮下 (SC) 免疫。使用细胞的第一次免疫在完全弗氏佐剂 (CFA ;Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 中完成。对于全部其它免疫,细胞在 PBS 中 IP 注射,而 TFECdHis 用不完全弗氏佐剂 (IFA ;Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) SC 注射。当血清滴度充分时(在如实施例 7 中所述的抗原特异性筛选测定方法中在至少 2 次连续的双周筛选事件中发现 1/50 或更低稀释的血清呈阳性),用溶于 $100 \mu\text{l}$ PBS 中的 $10 \mu\text{g}$ TFECdHis 蛋白在融合前 4 和 3 天进行额外的两次静脉内 (IV) 加强免疫 (boosted)。

[0552] 使用细胞的第一次免疫在 CFA 中进行,对于所有其它各个 (7 个) 免疫,细胞在 PBS 中 IP 注射。当发现血清滴度充分时,在融合前 4 和 3 天,小鼠用溶于 $100 \mu\text{l}$ PBS 中的 1×10^6 个瞬时空稳定转染 NS0-TF 细胞 IV 额外加强免疫 2 次。

[0553] 实施例 7

[0554] 同源抗原特异性筛选测定

[0555] 经免疫小鼠的血清或人单抗(人单克隆抗体)杂交瘤或转染瘤培养物上清中抗-TF 抗体的存在通过同源抗原特异性筛选测定(四分式)使用 Fluorometric Micro volume Assay Technology (FMAT ;Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 加以确定。

[0556] 为此,组合使用 3 个基于细胞的测定系统和 1 个基于珠子的测定系统。在基于细胞的测定中,确定与 TH1015-TF (瞬时表达 TF 的 HEK-293F 细胞 ;如上所述地产生) 和 A431 (其在细胞表面上表达 TF) 以及 HEK293 野生型细胞 (不表达 TF, 阴性对照) 的结合。在基于珠子的测定中,测定对偶联于链亲和素珠子的生物素化的 TF (SB1015-TF) 的结合。

[0557] 将样品添加到细胞 / 珠子以进行 TF 结合。随后,用荧光偶联物 (山羊抗-人 IgG-Cy5 ;Jackson ImmunoResearch) 检测与人单抗的结合。小鼠抗-人 TF 抗体 (ERL ;在 Genmab 公司与 Alexa-647 偶联) 用作阳性对照,人单抗-小鼠合并血清 (pooled serum) 和小鼠-chrompure-Alexa647 抗体用作阴性对照。样品用 Applied Biosystems 8200 细胞检测系统 (8200 CDS) 进行扫描,并用“计数 x 荧光”作为读出。

[0558] 实施例 8

[0559] 人单抗杂交瘤生成

[0560] 对具有充分抗原特异性滴度发生（如上定义）的人单抗小鼠处以安乐死，收集脾脏和腹主动脉和腔静脉两侧的淋巴结。通过电融合用 CEEF 50 电融合系统 (Cyto Pulse Sciences, Glen Burnie, MD, USA) 基本上按照制造商的使用说明进行脾细胞和淋巴结细胞与小鼠骨髓瘤细胞系的融合。所得的人单抗杂交瘤的选择和培养根据标准方法进行（例如在下列文献中所述：Coligan J. E., Bierer, B. E., Margulies, D. H., Shevach, E. M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006）。

[0561] 实施例 9

[0562] 纯化的抗体的质谱

[0563] 将来自 6 孔或 Hyperflask 平台的小份含有抗体的上清液（每份 0.8ml）用含有蛋白 G 树脂的 PhyTip 柱 (PhyNexus Inc., San Jose, USA) 在 Sciclone ALH 3000 工作站 (Caliper Lifesciences, Hopkinton, USA) 上进行纯化。PhyTip 柱的使用根据制造商的使用说明书，但是缓冲液用结合缓冲液 PBS (B. Braun, Medical B. V., Oss, Netherlands) 和洗脱缓冲液 0.1M 甘氨酸-HCl pH 2.7 (Fluka Riedel-de Haën, Buchs, Germany) 代替。纯化后，样品用 2M Tris-HCl pH 9.0 (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Netherlands) 中和。或者，在一些情况下，用蛋白 A 亲和柱色谱来纯化较大体积的培养上清。

[0564] 纯化后，将样品置于 384-孔板 (Waters, 100ul 方孔板，部件号 186002631) 中。样品用 N-糖基化酶 F (Roche 批号 11365177001 在 37°C 过夜去糖基。添加 DTT (15mg/ml) (1 μ l/孔) 并在 37°C 温育 1h。样品 (5 或 6ul) 在 Acquity UPLC™ (Waters, Milford, USA) 上用 BEH300 C18, 1.7 μ m, 2.1x50mm 柱在 60°C 进行脱盐。使用 MQ 水和 LC-MS 级乙腈 (Biosolve, 批号 01204101, Valkenswaard, The Netherlands), 两者均含 0.1% 甲酸 (Fluka, 批号 56302, Buchs, Germany) 分别作为洗脱液 A 和 B。在以阳离子模式操作的 micrOTOF™ 质谱仪 (Bruker, Bremen, Germany) 上在线记录飞行时间电喷雾离子化质谱。在分析之前，用 ES 调节预混剂 (ES tuning mix) (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) 校准 900-3000m/z 刻度。质谱用 DataAnalysis™ 软件 v. 3.4 (Bruker) 进行去卷积，使用最大熵值算法 (Maximal Entropy algorithm) 寻找 5-80kDa 之间的分子量。

[0565] 去卷积之后，对所得的全部样品的重链和轻链质量进行比较，以发现重复的抗体。在重链的比较中，将 C-端赖氨酸变体的可能存在纳入考虑。结果得到了一系列独特的抗体，其中“独特”的定义是重链和轻链的独特组合。在发现重复抗体的情况下，使用来自其它测试的结果决定哪个是继续进行实验的最佳材料。

[0566] 对 118 个 TF 特异杂交瘤的重链和轻链分子量进行 MS 分析，获得了 70 个独特的抗体（独特的重链 / 轻链组合）。在若干功能测试中对它们进行了表征，鉴定了 14 个前导候选物，TF 特异抗体。

[0567] 实施例 10

[0568] 抗-TF 人单抗可变域的序列分析和到表达载体中的克隆

[0569] 从 5×10^6 个杂交瘤细胞制备抗-TF 人单抗的总 RNA，并从 100ng 总 RNA 使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech) 根据制造商的使用说明书制备 5' -RACE- 互补 DNA (cDNA)。通过 PCR 扩增 VH (重链可变区) 和 VL (轻链可变区) 编码区，并用 Zero Blunt PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen) 克隆到 pCR-Blunt II-TOPO 载体 (Invitrogen) 中。对于每个人单抗，对 16 个 VL 克隆和 8 个 VH 克隆进行测序。序列在本文的序列列表和图 1 中给出。

[0570] 表 1A 和表 1B(下面) 给出了抗体序列信息和最同源的种系序列的概况。

[0571] 表 1A 重链同源物

[0572]

抗体	V-基因和等位基因	V-区同一性, %	J-基因和等位基因	D-基因和等位基因	CDR-IMGT长度
	IGHV1-69*02或				
003	IGHV1-69*04	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD6-13*01	[8,8,11]
098	IGHV1-69*04	95.49% (275/288 nt)	IGHJ3*02	IGHD2-21*02	[8,8,11]
011	IGHV3-23*01	96.53% (278/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD1-26*01	[8,8,11]
017	IGHV3-23*01	98.26% (283/288 nt)	IGHJ2*01	IGHD2-15*01	[8,8,13]
092	IGHV3-23*01	97.92% (282/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
101	IGHV3-23*01	95.83% (276/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,11]
025	IGHV3-30-3*01	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
109	IGHV3-30-3*01	96.18% (277/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD7-27*01	[8,8,13]
111	IGHV3-30-3*01	97.57% (281/288 nt)	IGHJ4*02	IGHD3-10*01	[8,8,13]
	IGHV3-33*01, or				
114	IGHV3-33*03	94.44% (272/288 nt)	IGHJ6*02	IGHD3-10*01	[8,8,12]
013	IGHV5-51*01	99.65% (287/288 nt)	IGHJ3*02	IGHD6-13*01	[8,8,19]

[0573] 表 1B 轻链同源物

[0574]

抗体	V-基因和等位基因	V-区同一性% (nt)	J-基因和等位基因	CDR-IMGT长度
003	IGKV1-13*02	99.28% (277/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
011	IGKV1D-16*01	98.57% (275/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
013	IGKV1D-16*01	98.57% (275/279 nt)	IGKJ5*01	[6.3.9]
092	IGKV1D-16*01	99.28% (277/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
098	IGKV1D-16*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.9]
101	IGKV1D-16*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ2*01	[6.3.10]
025	IGKV3-11*01	100.00% (279/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
109	IGKV3-11*01	99.64% (278/279 nt)	IGKJ4*01	[6.3.9]
017	IGKV3-20*01	99.29% (280/282 nt)	IGKJ1*01	[7.3.9]
114	IGKV3-20*01	99.65% (281/282 nt)	IGKJ4*01	[7.3.8]

[0575] 序列表参考：

[0576]

VH-区	
SEQ ID No: 1	VH 013
SEQ ID No: 2	VH 013 , CDR1
SEQ ID No: 3	VH 013 , CDR2
SEQ ID No: 4	VH 013 , CDR3
SEQ ID No: 5	VH 114
SEQ ID No: 6	VH 114 , CDR1
SEQ ID No: 7	VH 114 , CDR2
SEQ ID No: 8	VH 114 , CDR3
SEQ ID No: 9	VH 011
SEQ ID No: 10	VH 011 , CDR1
SEQ ID No: 11	VH 011 , CDR2
SEQ ID No: 12	VH 011 , CDR3
SEQ ID No: 13	VH 017-D12
SEQ ID No: 14	VH 017-D12 , CDR1
SEQ ID No: 15	VH 017-D12 , CDR2
SEQ ID No: 16	VH 017-D12 , CDR3
SEQ ID No: 17	VH 042
SEQ ID No: 18	VH 042 , CDR1
SEQ ID No: 19	VH 042 , CDR2
SEQ ID No: 20	VH 042 , CDR3
SEQ ID No: 21	VH 092-A09
SEQ ID No: 22	VH 092-A09, CDR1
SEQ ID No: 23	VH 092-A09, CDR2

[0577]

SEQ ID No: 24	VH 092-A09, CDR3
SEQ ID No: 25	VH 101
SEQ ID No: 26	VH 101 , CDR1
SEQ ID No: 27	VH 101 , CDR2
SEQ ID No: 28	VH 101 , CDR3
SEQ ID No: 29	VH 003
SEQ ID No: 30	VH 003 , CDR1
SEQ ID No: 31	VH 003 , CDR2
SEQ ID No: 32	VH 003 , CDR3
SEQ ID No: 33	VH 025
SEQ ID No: 34	VH 025 , CDR1
SEQ ID No: 35	VH 025 , CDR2
SEQ ID No: 36	VH 025 , CDR3
SEQ ID No: 37	VH 109
SEQ ID No: 38	VH 109 , CDR1
SEQ ID No: 39	VH 109 , CDR2
SEQ ID No: 40	VH 109 , CDR3
SEQ ID No: 41	VH 044
SEQ ID No: 42	VH 044 , CDR1
SEQ ID No: 43	VH 044 , CDR2
SEQ ID No: 44	VH 044 , CDR3
SEQ ID No: 45	VH 087-Lg6
SEQ ID No: 46	VH 087-Lg6, CDR1
SEQ ID No: 47	VH 087-Lg6, CDR2

[0578]

SEQ ID No: 48	VH 087-Lg6, CDR3
SEQ ID No: 49	VH 098
SEQ ID No: 50	VH 098 , CDR1
SEQ ID No: 51	VH 098 , CDR2
SEQ ID No: 52	VH 098 , CDR3
SEQ ID No: 53	VH 111
SEQ ID No: 54	VH 111 , CDR1
SEQ ID No: 55	VH 111 , CDR2
SEQ ID No: 56	VH 111 , CDR3

[0579]

VL-区	
SEQ ID No: 57	VL 013
SEQ ID No: 58	VL 013 , CDR1
SEQ ID No: 59	VL 013 , CDR2
SEQ ID No: 60	VL 013 , CDR3
SEQ ID No: 61	VL 114
SEQ ID No: 62	VL 114 , CDR1
SEQ ID No: 63	VL 114 , CDR2
SEQ ID No: 64	VL 114 , CDR3
SEQ ID No: 65	VL 011
SEQ ID No: 66	VL 011 , CDR1
SEQ ID No: 67	VL 011 , CDR2
SEQ ID No: 68	VL 011 , CDR3
SEQ ID No: 69	VL 017-D12
SEQ ID No: 70	VL 017-D12 , CDR1

[0580]

SEQ ID No: 71	VL 017-D12 , CDR2
SEQ ID No: 72	VL 017-D12 , CDR3
SEQ ID No: 73	VL 042
SEQ ID No: 74	VL 042 , CDR1
SEQ ID No: 75	VL 042 , CDR2
SEQ ID No: 76	VL 042 , CDR3
SEQ ID No: 77	VL 092-A09
SEQ ID No: 78	VL 092-A09, CDR1
SEQ ID No: 79	VL 092-A09, CDR2
SEQ ID No: 80	VL 092-A09, CDR3
SEQ ID No: 81	VL 101
SEQ ID No: 82	VL 101 , CDR1
SEQ ID No: 83	VL 101 , CDR2
SEQ ID No: 84	VL 101 , CDR3
SEQ ID No: 85	VL 003
SEQ ID No: 86	VL 003 , CDR1
SEQ ID No: 87	VL 003 , CDR2
SEQ ID No: 88	VL 003 , CDR3
SEQ ID No: 89	VL 025
SEQ ID No: 90	VL 025 , CDR1
SEQ ID No: 91	VL 025 , CDR2
SEQ ID No: 92	VL 025 , CDR3
SEQ ID No: 93	VL 109
SEQ ID No: 94	VL 109 , CDR1

[0581]

SEQ ID No: 95	VL 109 , CDR2
SEQ ID No: 96	VL 109 , CDR3
SEQ ID No: 97	VL 044
SEQ ID No: 98	VL 044 , CDR1
SEQ ID No: 99	VL 044 , CDR2
SEQ ID No: 100	VL 044 , CDR3
SEQ ID No: 101	VL 087
SEQ ID No: 102	VL 087 , CDR1
SEQ ID No: 103	VL 087 , CDR2
SEQ ID No: 104	VL 087 , CDR3
SEQ ID No: 105	VL 098
SEQ ID No: 106	VL 098 , CDR1
SEQ ID No: 107	VL 098 , CDR2
SEQ ID No: 108	VL 098 , CDR3
SEQ ID No: 109	VL 111
SEQ ID No: 110	VL 111 , CDR1
SEQ ID No: 111	VL 111 , CDR2
SEQ ID No: 112	VL 111 , CDR3

[0582] 实施例 11

[0583] 抗体纯化

[0584] 将培养上清液通过 0.2 μm 盲端过滤器 (dead-end filter) 过滤,并装载到 5ml 蛋白 A 柱 (rProtein A FF, Amersham Bioscience) 上,用 0.1M 柠檬酸 -NaOH, pH 3 洗脱。洗脱物立即用 2M Tris-HCl, pH 9 中和,并过夜透析到 12.6mM NaH₂PO₄, 140mM NaCl, pH 7.4 (B. Braun) 中。透析后,样品通过 0.2 μm 盲端过滤器无菌过滤。通过 SDS-PAGE 确定纯度,并通过比浊法和 280nm 吸光度测量浓度。

[0585] 将纯化的抗体分成等分,并保存在 -80℃。一旦融化,将纯化的抗体等分保存于 4℃。实施质谱来鉴定由如实施例 9 所述杂交瘤表达的抗体重链和轻链的分子量。

[0586] 实施例 12

[0587] 用夹心-ELISA 进行抗体交叉竞争研究

[0588] 用稀释于 PBS 中的每种抗-TF 人单抗 (0.5 或 2 μ g/ml 100 μ L/孔) 在 +4°C 过夜包被 ELISA 平板孔。用 PBS 清洗 ELISA 孔, 用溶于 PBS 的 2% (v/v) 鸡血清 (Gibco, Paisley, Scotland) 在室温下封闭 1 小时, 并用 PBS 再次清洗。随后, 添加 50 μ L 抗-TF 人单抗 (10 μ g/mL), 然后添加 50 μ L TFECdHis (0.5 或 1 μ g/ml) (在 Genmab 产生; 实施例 5), 并在 RT 温育 1 小时 (同时震荡)。平板用 PBST (PBS+0.05% 吐温) 清洗 3 次, 并用 1 : 2000 稀释的抗-his 生物素 BAM050 在 RT 温育 1 小时 (同时震荡)。清洗平板, 并与链亲和素-聚 HRP (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) 在 RT 温育 20 分钟, 再次清洗。在黑暗中对反应物进一步显色, 15 分钟后通过添加 2% (w/v) 草酸终止反应, 并测量 405nm 吸光度。

[0589] 表 2 显示, 可以鉴别出 3 个交叉阻断组 (cross-block group) (彼此竞争结合 TFECdHis 的抗体组), 其中抗体 013, 044 和 087-Lg63 属于一个交叉阻断组 (组 I), 抗体 011, 017-D12, 42, 092-A09 和 101 属于另一个交叉阻断组 (组 II), 抗体 003, 025, 109 和 111 属于第三个交叉阻断组 (组 III)。抗体 114 被发现能与来自交叉阻断组 II 和 III 的抗体竞争结合 TFECdHis。抗体 098 与 TFECdHis 的结合能够被来自交叉阻断组 II 和 III 的抗体竞争。

[0590]

	I			II				
	0.5 ug 包被	2 ug 包被	2 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被
竞争抗体 (10 ug/ml)	13	44	087-Lg6	11	017-D12	42	092-A09	101
13	19	5	28	101	100	98	110	98
44	93	40	29	109	96	96	103	109
087-Lg6	91	54	41	103	93	95	109	93
11	96	143	929	20	34	35	21	23
017-D12	97	143	995	14	25	20	8	12
42	99	143	931	18	28	27	10	17
092-A09	95	143	995	22	37	37	32	24
101	96	100	714	10	15	15	10	12
114	101	143	995	21	34	34	19	22
98	95	143	995	90	93	97	91	86
3	84	118	770	100	95	91	96	88
25	102	143	995	117	96	108	111	100
109	96	143	995	101	100	101	99	102
111	89	143	995	110	93	102	95	108
	II/III		III					
	0.5 ug 包被	2 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被	0.5 ug 包被	2 ug 包被		
竞争抗体 (10 ug/ml)	114	98	3	25	109	111		
13	105	320	85	89	110	175		
44	105	330	80	108	94	175		
087-Lg6	107	210	88	105	103	115		
11	19	9	103	104	109	175		
017-D12	9	9	100	108	97	175		
42	24	8	98	93	111	155		
092-A09	22	10	103	108	101	175		
101	11	7	96	108	106	118		
114	13	9	100	47	26	5		
98	94	24	103	94	86	35		
3	102	10	33	22	10	6		
25	28	10	48	34	11	6		
109	44	9	62	51	17	6		
111	99	37	89	104	93	43		

[0591] 表 2- 抗 -TF 抗体竞争对 TFECDHIs 的结合。

[0592] 白框表示没有竞争对 TFECDHIs 的结合,浅灰色框表示部分竞争对 TFECDHIs 的结合,深灰色框表示竞争对 TFECDHIs 的结合。

[0593] 实施例 13

[0594] ELISA 中抗 -TF 人单抗与 TF 胞外域的结合

[0595] 用 ELISA 评估所得抗 -TF 人单抗的特异性。ELISA 板 (Microlon ;Greiner Bio-One) 用溶于 PBS, pH 7. 的 $0.5 \mu\text{g/mL}$ TFECDHIs 在 $+4^\circ\text{C}$ 过夜包被。清空已包被的 ELISA 平板,并用溶于 PBS 中的 2% (v/v) 鸡血清 (Gibco, Paisley, Scotland) 室温封闭 1 小时,并用含有 0.05% 吐温 20 的 PBS (PBST) 清洗。随后,将在 PBSTC (补充有 2% (v/v) 鸡血清和 0.05% (v/v) 吐温 -20 的 PBS) 中系列稀释的人单抗在震荡状态 (300rpm) 下 RT 温育 1 小时。用 1 : 5,000 稀释于 PBSTC 中的 HRP- 偶联的山羊 - 抗 - 人 IgG 抗体 (Jackson ImmunoResearch) 在震荡状态 (300rpm) 下 RT 温育 1 小时,以检测结合的人单抗。在黑暗中 RT 下用 ABTS (Roche Diagnostics) 对反应物进一步显色,并在 15-30 分钟后通过添加 2% (w/v) 草酸终止反应,然后测量 405nm 吸光度。用人单抗 -KLH (针对 KLH (钥孔血蓝蛋白))

的人单克隆抗体)作为阴性对照。小鼠抗-人TF(ERL)用作阳性对照(HRP标记的抗-小鼠IgG作为偶联物)。使用GraphPad Prism V4.03软件用非线性回归(可变斜率的S型剂量-应答)分析结合曲线。

[0596] 如图3所见,所有抗-TF均结合TFECDHis。对人单抗的EC50值是3次实验的平均值,为0.09-0.46nM不等(表3,见下面)。

[0597] 表3:

分组	人单抗 TF	EC50 nM
I	13	0.24
I	44	0.14
I	87-Lg6	0.09
II	11	0.16
II	017-D12	0.25
II	42	0.23
II	092-A09	0.18
II	101	0.28
II/III	98	0.13
II/III	114	0.17
III	3	0.46
III	25	0.34
III	109	0.27
III	111	0.11

[0598]

[0599] 实施例 14

[0600] 抗-TF 人单抗与膜结合 TF 的结合

[0601] 抗-TF 人单抗与膜结合 TF 的结合通过 FACS 分析进行测定,使用 TF 转染的 CHO 细胞或表达 TF 的肿瘤细胞系 MDA-MB-231, (荧光素转染)A431 和 Bx-PC3。

[0602] 将细胞悬浮在 PBS 中 (2×10^6 细胞/ml),置于 96 孔 V-底平板 ($50 \mu\text{l}$ /孔)中。向细胞添加 $50 \mu\text{l}$ 系列稀释于 FACS 缓冲液(添加 0.1% BSA 和 0.02% 叠氮化钠的 PBS)中的人单抗,并在冰上温育 30 分钟。用 FACS 缓冲液清洗 3 次后,添加 $50 \mu\text{l}$ 藻红蛋白(PE)偶联的山羊-抗人 IgGfc(Jackson ImmunoResearch)(以 1:100 稀释于 FACS 缓冲液中)。在冰上放置 30 分钟后(黑暗中),清洗细胞 3 次,并在 FACSCalibur(BD Biosciences)上通过流式细胞术检测人单抗的特异结合。人单抗-KLH 用作阴性对照。用小鼠抗-TF 和随后的 PE-偶联的抗小鼠 IgGfc 作为阳性对照。使用 GraphPad Prism V4.03 软件(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)用非线性回归(可变斜率的 S 型剂量-应答)分析结合曲线。

[0603] 图 4 显示了一个 TF- 特异人单抗与 MDA-MB-231 细胞的结合曲线的实例。

[0604] 表 4 给出了 TF- 特异人单抗与 TF 转染的 CHO 细胞 (S1015-TF), MDA-MB-231, A431 和 Bx-PC3 细胞的结合 EC50 值的概览。

组	抗体-TF	MDA-MB-231		Bx-PC3		A431		S1015-TF-012	
		EC50	最大 MFI	EC50	最大 MFI	EC50	最大 MFI	EC50	最大 MFI
I	13	1.58	2451	1.86	1305	8.04	3522	1.07	5207
I	44	0.87	1881	1.88	1136	1.45	2646	2.13	5021
I	87-Lg6	8.28	1107	7.19	1030	nt	nt	nt	nt
II	11	0.47	2143	1.01	1280	0.20	2806	1.32	5654
II	017-D12	1.33	2401	1.61	1422	1.24	3296	1.21	5792
II	42	0.25	1518	2.45	1701	nt	nt	nt	nt
II	092-A09	0.53	2290	0.84	1262	0.83	3137	1.32	5409
II	101	0.85	2071	2.25	1220	3.16	2934	1.77	5859
II/III	98	0.99	1956	1.38	1151	1.40	2755	0.96	5229
II/III	114	0.47	2438	0.80	1407	0.90	3433	1.72	6095
III	3	3.20	1798	4.98	1106	6.94	2530	2.06	4247
III	25	0.69	2254	0.88	1320	5.19	3170	0.73	5808
III	109	2.16	2052	4.04	1324	1.74	3124	0.92	5629
III	111	1.03	1774	1.83	1128	2.88	3043	0.55	5353

[0605] 表 4- 通过 FACS 分析确定的 TF- 特异性人单抗与不同细胞类型的结合的 EC50 和最大平均荧光指数 (最大 MFI) 值的概览。

[0607] EC50 值以 nM 计。对 MDA-MB-231, BxPC3 和 A431 细胞的最大 MFI 为 30 μ g/mL 抗体, 对于 S1015-TF 为 7.5 μ g/mL 抗体。

[0608] 实施例 15

[0609] 抑制 FVIIa 与 TF 结合

[0610] 通过 ELISA 测量了 TF- 人单抗对 FVIIa 与 TFECDH₁₅ 结合的抑制。用 TFECDH₁₅ (0.5 μ g/mL, 100mL/孔) 过夜包被 ELISA 平板。倒空平板, 用含有 2% (v/v) 鸡血清的 PBS 封闭 (1 小时, RT), 再次倒空。向孔添加 4- 倍系列稀释的 TF- 人单抗或人单抗 -KLH (阴性对照), 随后添加 EC50 浓度 (100nM) 的 FVIIa, 将平板在 RT 温育 1 小时 (同时震荡, 300rpm)。清洗平板, 并用如上的兔 - 抗 -FVIIa (2.5 μ g/mL; Abcam) 温育。清洗平板, 并用猪 - 抗 - 兔 IgG-HRP 抗体 (1 : 2,500; DAKO) 温育。清洗后, 用 ABTS 作为底物显现免疫复合物。通过添加 2% v/v 草酸终止反应, 随后用 ELISA 阅读器测量 405nm 的光密度。用 GraphPad prism (非线性回归分析) 计算获得 50% 抑制 (IC50) 所需的抗体浓度。

[0611] 图 5 显示, 来自交叉阻断组 II 和 III 的抗体有效率地抑制了 FVIIa 与 TF 的结合, 而来自交叉阻断 I 组的抗体不能抑制 FVIIa 结合 (或者抑制程度低很多)。

[0612] 表 5 显示了 FT 特异人单抗对 FVIIa 与 TF 结合的抑制的 IC50 和最大抑制值 (百分比)。

[0613]

组	人单抗 TF	IC ₅₀ nM	最大抑制
I	13	19.3	27
I	44	0.8	54
I	87-Lg6	na	35
II	11	1.1	91
II	017-D12	1.9	90
II	42	2.7	88
II	092-A09	1.5	90
II	101	0.6	84
II/III	98	0.8	85
II/III	114	1.3	90
III	3	1.9	89
III	25	2.1	90
III	109	1.7	90
III	111	1.7	79

[0614] 表 5-TF- 特异性人单抗对 FVIIa 与 TF 结合的抑制的 IC₅₀ 值和最大抑制值 (百分比)

[0615] 实施例 16

[0616] FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化的抑制

[0617] 在凝血因子 VIIa(FVIIa) 与 TF 结合时, 触发有丝分裂原活化激酶 (p42 和 p44MAPK 或 ERK1 和 ERK2) 的磷酸化。扁平上皮癌细胞系 A431 表达高水平的 TF, 并且根据 AlphaScreen Surefire ERK 测定系统 (Perkin Elmer) 测量, 在用 FVIIa 刺激后, 在 10 分钟内诱导了最佳 (3-5 倍) 的 ERK 磷酸化 (ERK-P)。

[0618] 将 A431 细胞 (30,000 个细胞 / 孔) 接种于 96 孔 TC 板内, 并在无血清培养基 (含有 20% HAS 和青霉素 / 链霉素的 RPMI) 中培养过夜 (37°C, 5% CO₂, 85% 湿度)。然后用 DMEM (无添加剂) 替换培养基, 并将细胞温育 1.5 小时。添加 3 倍系列稀释的 TF- 人单抗或人单抗 -KLH, 并将细胞温育 0.5 小时。然后, 用 F VIIa 以 EC80 浓度刺激细胞 (50nM; 10 分钟; 37°C, 5% CO₂, 85% 湿度)。用 PBS 清洗一次细胞, 并用 25 μL 裂解缓冲液 (Perkin Elmer, Surefire 试剂盒) 裂解。对裂解物进行离心 (3 分钟, 330xg, RT)。将 4 μL 上清转移到 384 孔 Proxiplate 中 (Perkin Elmer)。添加 7 μL 含有 AlphaScreen 珠子 (Perkin Elmer, Surefire 试剂盒) 的反应缓冲液 / 活化缓冲液预混物, 在黑暗下在 RT 温育平板 2 小时。用 EnVision technology 的 “Surefire Plus” 规程读取平板。

[0619] 图 6 显示, 用 AlphaScreen Surefire ERK 测定系统测量, 抗体 013 不抑制 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化, 044 和 111 中等抑制 ERK 磷酸化, 并且全部其它抗体可高效地阻断 ERK 磷酸化。

[0620] 表 6 显示了 TF- 特异人单抗对 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化的 IC₅₀ 值和最大抑制值 (百分比), 使用 AlphaScreen Surefire ERK 测定系统测得。

[0621]

组	人单抗 TF	IC50 nM	%最大抑制
I	13	9.11	26
I	44	> 66.6	45
I	87-Lg6	nt	nt
II	11	0.79	69
II	017-D12	2.01	65
II	42	nt	nt
II	092-A09	1.27	68
II	101	1.05	57
II/III	98	1.89	64
II/III	114	1.08	68
III	3	7.99	63
III	25	2.16	66
III	109	2.42	72
III	111	> 66.6	52

[0622] 表 6-TF- 特异性人单抗对 FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化 (用 AlphaScreen Surefire ERK 测定系统测量) 的 IC50 值和最大抑制值 (百分比)

[0623] 在 AlphaScreen Surefire ERK 测定中所得的结果通过 Western 印迹分析加以确认, 使用 HaCaT 和 BxPC3 细胞系。将 30,000 细胞 / 孔接种在含有最小浓度血清的 DMEM (饥饿培养基) 中, 并过夜培养。细胞在无血清的 DMEM 中进一步培养 2 小时, 在培养的最后 30 分钟内添加抗 -TF 抗体。细胞用 0, 10 或 50nMFVIIa 刺激 10 分钟 (37°C), 随后在细胞裂解液中裂解 (每孔 50 μ L 裂解缓冲液, 在震荡条件下裂解 30-60 分钟, RT)。向每个样品添加含有 25 μ L SDS 的样品缓冲液。将样品加载到 SDS-PAGE 凝胶上, 运行, 并用标准 western 印迹程序进行印迹。印迹用含有 5% 无关蛋白 (ELK) 的 TBST 1x 在 RT 下封闭 1 小时。用兔抗 -ERK-P 抗体温育印迹 (O/N, 4°C)。用 TBST 1x 清洗印迹, 并用抗 -兔 IgGHRP 温育 (1 小时, RT), 清洗, 用 HRP 底物显影, 用 Optigo Ultima 成像系统 (Isogen Life Sciences) 成像。

[0624] 图 6A 显示了 BxPC3 细胞中抗体的一个亚组 (sub-panel) 的结果。10nMFVIIa 诱导的 ERK 磷酸化没有被抗体 013 抑制, 但是被抗体 111、044 和 025 有效抑制 (后者是这里所描述的所有其他 TF- 特异性人单抗的一个实例)。更强烈诱导的 ERK 磷酸化 (50nM FVIIa) 不被抗体 013、111 和 044 抑制, 但是被抗体 025 抑制。

[0625] 实施例 17

[0626] 对 FVIIa 诱导的 IL-8 释放的抑制

[0627] 用 MDA-MB-231 细胞测试 TF 特异性人单抗抑制 FVIIa 诱导的 IL-8 释放的能力。将细胞接种于 96 孔板 (60,000 细胞 / 孔), 并在含有 CS、丙酮酸钠、1- 谷氨酰胺、MEM NEAA 和青霉素 / 链霉素的 DMEM 中培养 (O/N, 37°C, 5% CO₂)。除去组织培养基, 在无血清、高钙培养基 (含有青霉素 / 链霉素的 DMEM) 中清洗 2 次, 在这种培养基中再培养 105 分钟。添加系列稀释的抗体并将细胞培养 15 分钟。添加 FVIIa (Novo Nordisk; 终浓度 10nM), 将细胞培养 5 小时。移出上清液并离心 (300xg, RT)。用 IL-8ELISA 试剂盒根据制造商的方案

(Sanquin) 测量上清液中 IL-8 的浓度。

[0628] 图 7 显示, 来自交叉阻断组 II 和 III 的抗体高效抑制 FVIIa 诱导的 MDA-MB-231 细胞的 IL-8 释放, 但来自相互作用组 III 的抗体 111 除外。来自交叉阻断组 I 的抗体 (013, 044 和 87-Lg6) 全部不能抑制 FVIIa 诱导的 IL-8 释放。

[0629] 表 7 显示了 TF- 特异性人单抗抑制 FVIIa 诱导的 IL-8 释放的 IC₅₀ 值和最大抑制值 (百分比)。

[0630]

组	人单抗 TF	IC ₅₀ nM	最大抑制
I	13	na	-0.3
I	44	74.6	17.2
I	87-Lg6	na	4.3
II	11	9.4	61.7
II	017-D12	9.0	65.8
II	42	14.9	53.7
II	092-A09	28.2	66.6
II	101	22.7	74.9
II/III	98	9.3	59.0
II/III	114	9.2	71.5
III	3	23.7	76.2
III	25	23.1	75.6
III	109	13.6	70.4
III	111	>200	40.1

[0631] 表 7-TF- 特异性人单抗抑制 FVIIa 诱导的 IL-8 释放的 IC₅₀ 值和最大抑制值 (百分比)。

[0632] 实施例 18

[0633] 抑制 FXa 生成

[0634] 在如下的测定系统中测试 TF 特异性人单抗抑制 FXa 生成的能力, 其中用比色 FXa 特异性底物测量 TF/FVIIa 复合体作用下 FX 向 FXa 的转变。向平底 96 孔板添加 TF (Innovin) 以及系列稀释的 TF 特异性人单抗、阳性对照 (小鼠抗 -TF) 和阴性对照 (人单抗 -KLH) (全部均稀释在含有 3mM CaCl₂ 的 Hepes 缓冲液中)。平板在 RT 下温育 30 分钟, 并添加 FVIIa (终浓度 1nM) 和 FX (ERL ; 终浓度 200nM)。平板在 37°C 温育 30 分钟。从每孔取 50 μl 转移到含有终止缓冲液 (溶于 100ml Hepes 缓冲液中的 5mM EDTA) (预热的, 37°C) 的 96 孔板中。添加 FXa 特异性底物 Chromogenix-2765 (Instrumentation Laboratory Company), 将平板在 37°C 温育 60 分钟, 并测量 37°C 的 OD_{405nm}。

[0635] 图 8 显示, 抗体 017-D12 强烈抑制 FXa 生成, 013 显示中等抑制, 其它抗体对 FXa 生成显示较低的抑制或者没有抑制。

[0636] 表 8 显示了 TF- 特异性人单抗抑制 FXa 生成的 IC₅₀ 值和最大抑制值 (百分比)。

[0637]

分组	人单抗 TF	IC50nM	%最大抑制
I	13	0.05	31
I	44	NA	3
I	87-Lg6	nt	nt
II	11	0.05	26
II	017-D12	0.28	84
II	42	nt	nt
II	092-A09	0.30	21
II	101	nt	nt
II/III	98	0.43	14
II/III	114	0.24	21
III	3	0.07	21
III	25	0.30	19
III	109	0.09	18
III	111	0.07	7

[0638] 表 8-TF- 特异人单抗抑制 FXa 生成的 IC50 值和最大抑制值（百分比）。

[0639] 实施例 19

[0640] 抑制凝血

[0641] 用确定 TF 诱导的凝血时间的测定系统测量 TF- 人单抗对凝血的抑制。在 96 孔板中制备如下的混合物：17 μ l 100mM CaCl₂ (终浓度 17mM)，10 μ l 1 : 100 innovin (终浓度 1 : 1000)，23 μ l 1xHEPES 缓冲液和 50 μ l 系列稀释的抗体。向 Immulon 2B 平板 (Thermo Electron) 的孔中添加 50 μ l 合并的人血浆。向 Immulon 2b 平板添加 50 μ l 制备好的抗体混合物，用动力学读板器每 15 秒测量 405nm 的凝血发展 (coagulation development)，共 25 分钟。将光密度的增加相对时间作图，并计算凝血时间 (t1/2)。将凝血时间相对抗体浓度作图。使用 GraphPad Prism 通过非线性回归分析从该结果计算抗体诱导的抑制凝血的 IC50。

[0642] 图 9 显示，抗体 044、087 和 111 不抑制 TF 诱导的凝血，而所有其它抗体则抑制。

[0643] 表 9 显示了 TF- 特异性人单抗抑制凝血的 IC50 值。

[0644]

组	人单抗 TF	IC50 nM
I	13	0.6
I	44	NA
I	87-Lg6	NA
II	11	1.6
II	017-D12	2.6
II	42	1.5
II	092-A09	0.2
II	101	0.7
II/III	98	1.1
II/III	114	0.4
III	3	7.3
III	25	2.3
III	109	7.6
III	111	NA

[0645] 表 9-TF- 特异性人单抗抑制凝血的 IC50 值 .

[0646] 实施例 20

[0647] 抗体依赖的细胞介导的细胞毒性

[0648] 靶细胞的制备

[0649] 收集表达 TF 的靶细胞 (5×10^6 个 Bx-PC3 细胞, MDA-MB-231 细胞或 A431 细胞), 清洗 (在 PBS 中清洗 2 次, 1500rpm, 5min), 并收集在 1ml RPMI 1640 培养基中, 该培养基中补充了加强型小牛血清 (cosmic calf serum)、丙酮酸钠、L- 谷氨酸、MEM NEAA 和青霉素 / 链霉素, 并添加 $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Cr}$ (铬 -51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands)。将混合物在震荡水浴中 37°C 温育 1 小时。清洗细胞 (PBS 中清洗 2 次, 1500rpm, 5min) 后, 将细胞重悬浮在培养基中, 并通过台盼蓝排斥计数活细胞。将活细胞浓度调节为 1×10^5 细胞 /ml。

[0650] 效应物细胞的制备:

[0651] 用标准 Ficoll 密度离心根据制造商的使用说明 (淋巴细胞分离介质; Lonza, Verviers, France) 从新鲜棕黄层 (buffy coat) (Sanquin, Amsterdam, The Netherlands) 分离外周血单个核细胞 (PBMCs)。将细胞重悬浮在培养基中后, 通过台盼蓝排斥计数细胞, 并将浓度调节到 1×10^7 细胞 /ml。

[0652] ADCC 设置:

[0653] 将 $50 \mu\text{l } ^{51}\text{Cr}$ - 标记的靶细胞转移到微滴定孔中, 并添加 $50 \mu\text{l}$ 系列稀释 (稀释于培养基中) 的抗体。温育细胞 (RT, 15min), 并添加 $50 \mu\text{l}$ 效应物细胞, 得到的效应物与靶标的比例为 100 : 1。为了确定最大裂解水平, 添加 $100 \mu\text{l}$ 5% Triton-X100 代替效应物细胞; 为了确定自发裂解水平, 添加 $100 \mu\text{l}$ 培养基; 为了确定不依赖抗体的裂解水平, 添加 $50 \mu\text{l}$ 效应物细胞和 $50 \mu\text{l}$ 培养基。随后, 在 37°C , 5% CO_2 温育细胞过夜。将细胞离心沉降后 (1200rpm, 3min), 将 $75 \mu\text{l}$ 上清转移到 MICRONIC 管中。在 γ 计数器中计数释放出的 ^{51}Cr , 如按照下式计算抗体介导的裂解百分比:

[0654] $((\text{cpm 样品} - \text{cpm 不依赖抗体的裂解}) / (\text{cpm 最大裂解} - \text{cpm 自发裂解})) \times 100\%$

[0655] 其中 cpm 是每分钟计数 (counts per minute)。

[0656] 图 10 显示,全部测试的 TF- 人单抗均诱导了 ADCC 对 Bx-PC3 细胞的裂解,尽管效力不同 (EC50)。

[0657] 表 10 显示了 TF- 特异性人单抗对不同细胞系 ADCC 的 EC50 值 (nM)。

[0658]

		MDA-MB-231	Bx-PC3	A431
分组	人单抗 TF	EC50	EC50	EC50
I	13	0.06	0.07	0.11
I	44	0.08	0.12	0.19
I	87-Lg6	nt	nt	nt
II	11	0.07	0.22	0.06
II	017-D12	0.14	0.13	0.18
II	42	nt	nt	nt
II	092-A09	0.11	0.13	0.22
II	101	0.10	0.09	0.01
II/III	98	0.15	0.02	0.07
II/III	114	0.07	0.07	0.08
III	3	0.29	0.17	0.58
III	25	0.24	0.15	0.16
III	109	0.12	0.06	0.13
III	111	0.84	0.22	1.56

[0659]

[0660] 表 10-TF- 特异性人单抗对不同细胞系 ADCC 的 EC50 值 (nM)。

[0661] 实施例 21

[0662] 补体沉积

[0663] 通过 FACS 分析测量补体片段 C3c 和 C4c 在与 TF- 人单抗温育过的靶细胞上的沉积。将表达 TF 的靶细胞 (Bx-PC3 或 MDA-MB-231 细胞) 于含有 1% BSA 的 RPMI 中播种于 96 孔圆底平板 (1x10⁵ 个细胞 / 孔) 中。添加抗体 (30 μg/mL), 在 RT 下温育细胞 15 分钟。添加 25 μL 合并人血清作为补体源, 使用热灭活的人血清确定自发补体结合。细胞在 37°C

温育 45 分钟。清洗细胞 1 次,并在 FACS 缓冲液中与抗人 C3c FITC 或抗人 C4c FITC(DAKO)温育,并在冰上温育 30 分钟。用 FACS Canto 分析样品。

[0664] 图 11 显示,来自交叉阻断组 I 的抗体不能诱导 C3c 或 C4c 在 BxPC3 或 MDA-MB-231 细胞上的沉积。测试的所有来自交叉阻断组 II 的抗体均诱导 C3c 和 C4c 沉积,来自交叉阻断组 III 的抗体也一样,但抗体 003 除外。

[0665] 实施例 22:

[0666] 亲合力 / 亲和力研究

[0667] 亲和力确定

[0668] 在 BIAcore 3000 (GE Healthcare) 中通过表面等离子体共振分析抗体与 TF 的结合。使用 TFECDHis 进行分析。根据制造商推荐的实验方案将人单抗抗体 (500 个共振单位) 固定在 CM-5 传感器芯片上。简而言之,在用 EDC 和 NHS 表面活化后,将人单抗抗体注射到活化的 CM-5 表面上,其中抗体置于 10mM pH 4.0-5.5 的醋酸钠中,速度为 5 μ l/min,随后用 1M 乙醇胺去活化。将溶于 HBS-EP 缓冲液中的系列浓度的 TFECDHis 注射到固定的抗体上,流速为 30 μ l/min,持续 180 秒。通过注射 10mM 甘氨酸-HCl pH 2.0 或 10mM 醋酸钠 pH 3.0 进行人单抗表面再生。用双参比差减法 (double reference subtraction) 和模型 1 : 1 (朗格缪尔) 结合分析进行动力学分析。

[0669] 表 11 显示,对于大多数人单抗,所测得的亲和力处于 (亚) 纳摩尔范围。但不是从全部抗体均能够测定动力学参数。044 确实具有高的解离速率 (k_d) 变差,并具有高残差 (residual),这意味着曲线拟合不好。098、111 和 087-Lg6 的解离速率太高,以至 Biacore 3000 不能测量。

[0670]

组	人单抗 TF	亲和力 nM	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
I	13	2.78	5.67E+05	1.57E-03
I	44	n.a.	8.77E+04	可变的
I	87-Lg6	n.a.	5.91E+05	n.a.
II	11	3.15	2.86E+05	9.02E-04
II	017-D12	2.55	1.02E+05	2.59E-04
II	42	4.22	1.64E+05	6.90E-04
II	092-A09	14.1	1.42E+05	2.00E-03
II	101	3.4	3.18E+05	1.07E-03
II/III	98	n.a.	2.90E+05	n.a.
II/III	114	11	1.77E+05	1.95E-03
III	3	4.51	2.33E+05	1.26E-03
III	25	1.97	3.29E+05	6.50E-04
III	109	4.75	1.65E+05	7.77E-04
III	111	n.a.	2.13E+05	n.a.

[0671] n. a. 不可评估 = $> 10^{-3} \text{ sec}^{-1}$

[0672] 表 11. TF- 人单抗对 TFECDHis 的反应性的动力学常数 - 亲和力测量

[0673] 亲合力测定

[0674] TF (TFECDHIs) 与 TF-特异人单抗结合的测定基本上如上所述, 其中将 TFECDHIs 固定在 CM-5 传感器芯片上 (300 个共振单位), 使用系列浓度的人单抗抗体进行动力学分析。动力学分析使用双参比差减 (double reference subtraction) 和模型 1 : 1 (朗格缪尔) 结合分析来进行。

[0675] 表 12 显示了抗体 11, 98, 109 和 111 的亲合力测量结果。尽管 98 和 111 的亲合力测量结果显示高解离速率 (超过 Biacore 的测定极限 (i. e. $> 10^{-3}$)), 亲合力测定则显示出纳摩尔范围内的互作。

[0676]

分组	人单抗 TF	亲合力 nM
II	11	0.47
II/III	98	4.85
III	109	0.01
III	111	0.11

[0677] 表 12. TFECDHIS 对 TF- 人单抗 - 亲合力测量反应的动力学常数

[0678] 实施例 23 :**[0679] 与正常人组织和胰腺肿瘤结合的免疫组织化学分析**

[0680] TF- 人单抗与各种已知表达 TF 的人组织 (结肠、心脏、肾脏、皮肤、肺和脑) 的结合通过免疫组织化学 (IHC) 进行测定。

[0681] 对冷冻组织的 IHC

[0682] 切割冷冻组织切片 (4-6 μm 厚), 并固定在丙酮中。封闭内源组织过氧化物酶 (PO), 并且用正常的人血清预温育组织切片, 以除去后面施用的抗体对内源 Fc 受体的非特异结合。将针对人 TF 的小鼠抗体 (和阴性对照小鼠抗体) 以最佳稀释度施用于组织上, 随后用 Powervision-PO (山羊抗 - 小鼠 / - 兔 IgG) - PO 进行检测。将 TF 特异性的人单抗与 Fab' 山羊抗 - 人 IgG (Fc) - FITC 偶联, 之后以 3 个稀释度施用于冷冻的组织切片, 包括一个预先确定的最佳稀释度。随后, 通过兔抗 - FITC 和 Powervision-PO 检测人单抗 - Fab-FITC 复合体。用 AEC 作为底物使 PO 活性可视化, 细胞核用苏木精可视化。染色通过亮场显微镜分析。

[0683] 在福尔马林固定和石蜡包埋 (FFPE) 的组织上使用小鼠抗体的 IHC

[0684] FFPE 组织活检以 4 μm 切片, 脱蜡, 封闭内源组织过氧化物酶, 并进行抗原恢复 (retrieval) (pH6, 柠檬酸缓冲液)。用小鼠抗体温育前, 将组织切片在正常人血清中预温育, 以防止与内源 Fc 受体的非特异结合。将针对人 TF 的小鼠抗体 (和阴性对照小鼠抗体) 以最佳稀释度施用于组织切片, 随后用 Powervision-PO (山羊抗 - 小鼠 / - 兔 IgG) - PO 进行检测。PO 活性用 AEC 作为底物可视化, 细胞核用苏木精可视化。染色通过亮场显微镜分析。

[0685] 图 12 显示了抗体 013 (阳性染色)、011 (阳性染色)、114 (阳性染色) 和 111 (中间染色) 与肾小球的结合实例。抗体 098 和 044 没有结合肾小球。

[0686] 表 13 给出了全部 TF- 人单抗在人肾脏所有被检测组织中的染色结果的概览。

[0687]

分组	人单抗 TF	IHC 人 肾小球
I	13	+
I	44	-
I	87-Lg6	nt
II	11	+
II	017-D12	+
II	42	nt
II	092-A09	nt
II	101	+
II/III	98	-
II/III	114	+
III	3	+
III	25	nt
III	109	+
III	111	+/-

[0688] 表 13. 人肾小球的 IHC 染色

[0689] 表 14 给出了所选 TF- 特异性人单抗在人肾脏、结肠、心脏、大脑和皮肤以及人胰腺肿瘤中的染色结果

[0690]

Ab	人肾	人结肠	人心脏	人大脑	人皮肤	胰腺肿瘤
13	肾小体 +	基底膜 ++	-	+	表皮 +	+++
114	肾小体 ++	基底膜 ++	-	++	表皮 ++	++++
11	肾小体 +	基底膜 ++	-	++	n. a. (+)	+++
44	-	基底膜 +	-	+/-	n. a.	++
98	-	基底膜 +	-	+/-	n. a. (+)	+++
111	肾小体 +/-	基底膜 +	-	+	n. a.	+++

- [0691] 表 14. 正常人组织和胰腺肿瘤的 IHC 染色
- [0692] TF- 人单抗与人胰腺肿瘤结合的 IHC 分析显示所有 TF- 人单抗均有阳性染色 (图 13 举例说明)。
- [0693] 实施例 24 :
- [0694] 对 SCID 小鼠乳腺脂肪垫中已建立的 MDA-MB-231 肿瘤异种移植物的治疗
- [0695] 在 SCID 小鼠体内已建立的原位 MDA-MB-231 异种移植肿瘤中确定 TF- 人单抗的体内效力。将 2×10^6 个置于 PBS 中的肿瘤细胞皮下注射在雌性 SCID 小鼠第二乳腺脂肪垫内, 随后当肿瘤尺寸变得可以测量时开始用 TF- 人单抗或对照单抗 (人单抗 -KLH) 进行治疗。抗体在第 21 天 ($260 \mu\text{g}/\text{小鼠}$), 28 天 ($130 \mu\text{g}/\text{小鼠}$) 和 42 天 ($130 \mu\text{g}/\text{小鼠}$) 注射。肿瘤体积至少每周测量 2 次。由卡尺 (PLEXX) 测量结果计算体积 (mm^3): $0.52 \times (\text{长度}) \times (\text{宽度})^2$ 。
- [0696] 图 14 显示, 抗体 114、111、013、098、011 和 044 全部能够有效抑制已经建立的原位 MDA-MB-231 肿瘤生长。
- [0697] 实施例 25 :
- [0698] TF- 特异性人单抗在食蟹猴中的试验性重复给药 (Pilot repeat dosing)
- [0699] 为了获得关于 TF- 特异性人单抗毒理学的初步信息, 包括评估抗体干扰凝血级联并因此潜在地增加暴露动物的出血风险的能力, 在食蟹猴中进行了试验性重复剂量给药研究。
- [0700] 两只雄性和两只雌性食蟹猴 (*Macaca fascicularis*), 年龄为大约 2 年, 接受静脉内注射抗体 011 :
- [0701] - 研究第 1 天 : $0\text{mg}/\text{kg}$ (仅溶媒 (vehicle))
- [0702] - 第 8 天 : $1\text{mg}/\text{kg}$; $1\text{mL}/\text{分钟}$
- [0703] - 第 15 天 : $10\text{mg}/\text{kg}$; $1\text{mL}/\text{分钟}$
- [0704] - 第 22 天 : $100\text{mg}/\text{kg}$; $1\text{mL}/\text{分钟}$
- [0705] 跟踪动物达 27 天, 在该时间点使动物安乐死, 进行尸体解剖和器官组织学评估。
- [0706] 主要的研究终点为 :
- [0707] - 临床观察 : 每天确定从牙龈、眼出血的迹象。
- [0708] - 功能性出血时间和失血 : 在第 1、8、15 和 22 天 (给药后 1、24 和 120h) 和在 2 个试验前时间点进行测定。
- [0709] - 血液 / 血液痕迹 / 血块 : 全部组织进行 HE 染色 (在最终处死时获得的组织上确定)
- [0710] - 尿液、粪便、呕吐物中的血液 : 每天 / 每周确定。
- [0711] 重复或增加剂量给药的抗体 011 没有观察到表观毒性。动物没有显示临床征候, 没有细胞因子释放的征象。此外, 没有表明凝血系统受损或系统性出血的表观临床迹象。在给药后 1 小时的时间点, 第 22 天的平均出血时间显著长于在第 1 天观察到的结果 ($p = 0.012$)。第 8、15 和 22 天与第 1 天相比, 没有其它统计学上显著的差异。而且, 发现对主要器官没有表观毒性并且没有不利的血液学影响。从该研究中得到的关于组织的组织学评估的初步结论是, 在 4 只被处理的动物中没有可以归因为测试物处理的组织学发现。
- [0712] 图 15 显示了每只动物的各个数据点 (二个重复样品), 作为时间的函数。在第 1、

8、15 和 22 天 (1、24 和 120h) 以及两个试验前 (pre-trial) 时间点测定 4 只动物的出血时间。

[0713] 实施例 26

[0714] 在 SCID 小鼠中预防和治疗性处理 BxPC3 肿瘤异种移植

[0715] 确定了 TF- 人单抗在预防和治疗性处理 SCID 小鼠中 BxPC3 细胞异种移植物的体内效力。将 10×10^6 个置于 PBS 中的 BxPC3 肿瘤细胞皮下注射在雌性 SCID 小鼠体内, 随后用 TF- 人单抗或对照单抗 (人单抗 -KLH) 进行治疗。对于预防性治疗, 在肿瘤诱导 1 小时后腹腔注射抗体 ($400 \mu\text{g}/\text{小鼠}$)。对于治疗性处理, 在肿瘤诱导 8 天后开始注射抗体 ($300 \mu\text{g}/\text{小鼠}$), 随后每周进行抗体注射 ($150 \mu\text{g}/\text{小鼠}$)。肿瘤体积每周至少测定 2 次。体积 (mm^3) 由卡尺 (PLEXX) 测量结果计算: $0.52 \times (\text{长度}) \times (\text{宽度})^2$ 。

[0716] 图 16 显示, TF 特异的性人单抗能够预防性以及治疗性处理 BxPC3 异种移植肿瘤。

[0717] 实施例 27

[0718] 鼠和人 TF 之间的 DNA 改组, 以确定对结合抗 -TF 人单抗重要的域

[0719] 为了确定对抗 -TF 人单抗与人 TF 的结合重要的域, 在人和小鼠 TF 之间进行 DNA 改组。通过用鼠的域替换人的域从编码人 TF 的 DNA 制备改组构建体, 并通过用人域替换鼠域从编码鼠 TF 的 DNA 制备改组构建体。如果人 TF 中的某个域对抗 -TF 人单抗的结合重要, 那么当用鼠域替换时, 结合将丧失。人和鼠 TF 在蛋白质水平具有 57% 同源性。图 17A 和 17B 显示了含有鼠 TF 域的人 TF 构建体 (TFhs, 含有 TFmm 域), 和含有人 TF 域的鼠 TF 构建体。用构建体或者单独的载体 (pcDNA3.3SP; 模拟) 瞬时转染 HEK293F 细胞。基本上如上所述进行 FACS 分析, 使用 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 纯化的亲本材料。人单抗 -KLH 用作对照抗体。

[0720] 图 17 显示, 除一个之外, 全部的抗 -TF 人单抗都仅与人 TF 结合, 而不与鼠 TF 结合。人单抗 -TF-003 显示与鼠 TF 的一些结合。

[0721] 图 18A-0 显示了不同抗 -TF 人单抗与在 HEK293F 细胞上表达的构建体的结合结果。这些结果在表 15 中概括。在该表中, 根据人 TF 上对这些人单抗的结合重要的域将这些抗 -TF 人单抗分组。

	改组构建体: TFhs-	显示降低结合的人单抗
	1-41 mm	无
	42-84 mm	11, 17, 42, 92, 98, 101, 111
	85-122 mm	25, 42, 98, 109, 111
	123-137 mm	44, 114
[0722]	185-225 mm	13, 27, 44, 87
	226-250 mm	44
	基于与改组构建体的结合的分组	分组中的人单抗
	1. 42-84	11, 17, 92, 101
	2. 42-84 + 85-122	42, 98, 111
	3. 85-122	25, 109
	4. 123-137	114
[0723]	5. 185-225	13, 27, 87
	6. 123-137 + 185-225 + 226-250	44

[0724] 表 15

[0725] 实施例 28

[0726] 抗-TF 人单抗的 Fab 片段与 TF 胞外域的结合（通过 ELISA 测定）和与 BxPC3 细胞上的细胞 TF 的结合（通过 FACS 测定）

[0727] 通过 ELISA（包被 TF 的胞外域）和 FACS（BxPC3 细胞上的 TF）测量抗-TF 人单抗的 Fab 片段与 TF 的结合。ELISA 基本上如前文所述进行。结合的 Fab 片段用 HRP 偶联的驴-抗人 H+L 进行检测。FACS 分析基本上如前文所述进行。使用 FITC 偶联的山羊抗-人 IgG(H+L) (Jackson) 检测结合的前导候选物。荧光在 FACSCantoII 上测量。结合曲线的分析用 GraphPad Prism 5 软件如前文所述地进行。

[0728] 图 19 显示,与人单抗-TF-011Fab 片段相比,人单抗-TF-098 和 -111Fab 片段显示与 TF 胞外域的结合较少（通过 ELISA 测量）。

[0729] 图 20 显示,与人单抗-TF-011Fab 片段相比,人单抗-TF-098 和 -111Fab 片段显示与细胞 TF 的结合较少（通过对 BxPC3 细胞的 FACS 测量）。

[0730] 表 16 显示人单抗-TF Fab 片段与 TF 胞外域的结合 EC50 值（通过 ELISA 确定）和与细胞 TF 的结合 EC50 值（通过 BxPC3 细胞的 FACS 测量）。

[0731]

人单抗-TF	EC50 (ELISA)	EC50 (FACS)
011	0.04	0.132
013	0.03	0.301
044	0.59	8.040
098	1.98	n.a.
109	0.02	0.143
111	3.14	na

[0732] 表 16- 人单抗 -TF Fab 片段与 TF 胞外域的结合 EC50 值（通过 ELISA 测定）和与 BxPC3 细胞上细胞 TF 的结合的 EC50 值（通过 FACS 测定）的概览。

[0733] EC50 值以 $\mu\text{g/mL}$ 计。

[0734] Na- 不能计算。

[0735] 实施例 29

[0736] 抗 -TF 单抗与表达不同水平 TF 的细胞系的结合

[0737] 通过 FACS 分析测定抗 -TF 人单抗与表达不同水平 TF 的细胞系上的膜结合 TF 的结合,基本上如前文所述。阳性对照使用小鼠抗 -TF 抗体后续 PE- 偶联的抗 - 小鼠 IgGf_c。荧光在 FACSCantoII 上测量。结合曲线的分析用 GraphPad Prism 5 软件基本上如前文所述地进行。细胞系上 TF 分子的量通过 Qifi 试剂盒 (Dako, Glostrup, Denmark) 按照制造商的使用说明书加以确定。测得 SW480 细胞每个细胞表达 ~ 20,000 个 TF 分子, SK-OV-3 细胞每个细胞表达 ~ 60,000 个分子, AsPC-1 细胞每个细胞表达 ~ 175,000 个分子, 而 MDA-MB-231 细胞每个细胞表达 ~ 900,000 个分子。

[0738] 图 21 在高表达 TF 的细胞系 MDA-MD-231 中, 人单抗 -TF-98 和 -111 显示与人单抗 -TF-11, -13 和 109 相似的结合特性。在每个细胞 TF 分子数较低的细胞系, 例如 SK-OV-3 和 SW480 细胞系中, 人单抗 -TF-98 和 111 显示与其它人单抗 -TF 抗体不同的结合特性。

[0001]

序列表

<110> 根马布股份公司 (Genmab)
 <120> 针对组织因子的人抗体
 <130> P57
 <160> 112
 <170> PatentIn version 3.2
 <210> 1
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 1
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
 50 55 60
 Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala
 100 105 110
 Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 2
 Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr Trp
 1 5
 <210> 3
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 3
 Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
 1 5

[0002]

<210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 4

 Ala Arg Ile His Arg Gly Ala Gly Tyr Ser Ser Ser Trp Pro Gly Ala
 1 5 10 15

 Phe Asp Ile

 <210> 5
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 5

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

 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp
 20 25 30

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

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

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

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

 Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 6

 Gly Phe Thr Val Ser Asn Asp Gly
 1 5

 <210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 7

[0003]

Ile Trp Tyr Asp Gly Val Asn Lys
 1 5

<210> 8
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8

Ala Arg Arg Pro Gly Thr Phe Tyr Gly Leu Asp Val
 1 5 10

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9

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

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

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

Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 10
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
 1 5

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11

[0004]

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Tyr Thr
 1 5

<210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12

Ala Arg Ser Pro Trp Gly Tyr Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 13

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 14
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 14

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
 1 5

<210> 15
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 15

[0005]

Ile Ser Gly Ser Gly Asp Ser Thr
1 5

<210> 16
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Ala Lys Asp Gly Tyr Phe Leu Leu Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

[0006]

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Thr Thr
 1 5

 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 20

 Ala Lys Ala Pro Trp Thr Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

 <210> 21
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 21

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

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

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

 Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

 Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 22

 Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
 1 5

 <210> 23
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 23

[0007]

Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr
1 5

<210> 24
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

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

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

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Ala Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile
100 105 110

Leu Val Ala Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr Ala
1 5

<210> 27
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 27

[0008]

Ile Ser Gly Ser Gly Val Thr Thr
1 5

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 28

Ala Lys Thr Pro Trp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 29

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

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

Thr Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 30

Arg Gly Thr Phe Ser Tyr Tyr Thr
1 5

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

[0009]

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Val Ala
1 5

<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

<400> 32

Ala Arg Glu Gly Asp Arg Arg Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 33
<211> 120
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 34
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 34

Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr Ala
1 5

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 35

[0010]

Ile Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Asp
 1 5

<210> 36
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 36

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 37
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 37

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 38
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 38

Gly Phe Thr Phe Ser Ile Tyr Ala
 1 5

<210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 39

[0011]

Val Ser Asn Asp Gly Tyr Asn Lys
 1 5

<210> 40
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 40

Ala Arg Asp Gly Gln Leu Gly Arg Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 41
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 41

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ala
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 42
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 42

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala
 1 5

<210> 43
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 43

[0012]

Ile Pro Tyr Asp Gly Asp Asn Lys
 1 5

<210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 44

Ala Arg Glu Asp Trp Gly Leu Glu Val Asp Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 45

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

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys
 20 25 30

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

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

Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 46
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 46

Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Cys Trp
 1 5

<210> 47
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 47

[0013]

Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr
1 5

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 人

<400> 48

Ala Arg His Lys Leu Gly Met Asp His Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 49
<211> 118
<212> PRT
<213> 人

<400> 49

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

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr
20 25 30

Pro Ile Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr Ala Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Ser Val Ser Ser
115

<210> 50
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 50

Gly Gly Ser Phe Asn Asn Tyr Pro
1 5

<210> 51
<211> 8
<212> PRT
<213> 人

<400> 51

[0014]

Ile Ile Pro Ile Leu Gly Ile Thr
 1 5

 <210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 52

 Ala Gly Gly Asp Asp Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

 <210> 53
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 53

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

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

 Ala Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
 35 40 45

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

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

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

 Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

 <210> 54
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 54

 Gly Phe Thr Phe Asn Arg Tyr Ala
 1 5

 <210> 55
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人

 <400> 55

[0015]

Ile Ser Asn Asp Gly Ile Asn Lys
1 5

<210> 56
<211> 13
<212> PRT
<213> 人

<400> 56

Ala Arg Asp His Thr Met Val Arg Gly Ala Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 57
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 57

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Arg Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asp Ser Asp Pro Ile
85 90 95

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

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 58

Gln Gly Ile Ser Arg Trp
1 5

<210> 59
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 59

Ala Ala Ser
1

[0016]

<210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 60

Gln Gln Tyr Asp Ser Asp Pro Ile Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 61

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu
 85 90 95

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

<210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 62

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 63
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 63

Gly Ala Ser
 1

<210> 64
 <211> 8
 <212> PRT

[0017]

<213> 人

<400> 64

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> 人

<400> 65

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

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

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 66

Gln Gly Ile Ser Ser Arg
1 5

<210> 67

<211> 3

<212> PRT

<213> 人

<400> 67

Ala Ala Ser
1

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 68

[0018]

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 69
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 69

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 70

Gln Ser Val Arg Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 71
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 71

Gly Ala Ser
 1

<210> 72
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 72

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
 1 5

[0019]

<210> 73
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 73

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

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

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

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

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

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

<210> 74
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 74

Gln Ser Val Gly Ser Ser Ser
 1 5

<210> 75
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 75

Gly Ala Ser
 1

<210> 76
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Arg Thr
 1 5

<210> 77
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人

[0020]

<400> 77

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Arg
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95

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

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 78

Gln Gly Ile Ser Ser Arg
 1 5

<210> 79

<211> 3

<212> PRT

<213> 人

<400> 79

Ala Ala Ser
 1

<210> 80

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 80

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 81

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

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

[0021]

1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu	85	90	95
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105	
<210> 82			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 82			
Gln Gly Ile Ser Ser Trp	1	5	
<210> 83			
<211> 3			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 83			
Ala Ala Ser	1		
<210> 84			
<211> 10			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 84			
Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Tyr Thr	1	5	10
<210> 85			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 85			
Ala Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Ala			

[0022]

	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	35	40	45
Tyr Asp Ala Ser Ile Leu Glu 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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
<210> 86			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 86			
Gln Asp Ile Ser Ser Ala	1	5	
<210> 87			
<211> 3			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 87			
Asp Ala Ser	1		
<210> 88			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 88			
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr	1	5	
<210> 89			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 89			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly	1	5	10
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			

[0023]

50 55 60

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

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

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

<210> 94
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 94

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 95
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 95

Asp Ala Ser
1

<210> 96
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 96

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 97

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Asn Ser Ala
20 25 30

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

Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu 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

[0025]

65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	100	105	
<210> 98			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 98			
Gln Gly Ile Asn Ser Ala			
1	5		
<210> 99			
<211> 3			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 99			
Asp Ala Ser			
1			
<210> 100			
<211> 9			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 100			
Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Leu Thr			
1	5		
<210> 101			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 101			
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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp	20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile	35	40	45
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Pro			

[0026]

85 90 95

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

<210> 102
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 102

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 103
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 103

Ala Ala Ser
1

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 104

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr
1 5

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 105

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 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln 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 Asn Ser Tyr Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0027]

100 105

<210> 106
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 106

Gln Gly Ile Ser Ser Trp
1 5

<210> 107
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 107

Ala Ala Ser
1

<210> 108
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 108

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 109
<211> 107
<212> PRT
<213> 人

<400> 109

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

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

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

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

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

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

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

<210> 110

[0028]

<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 110

Gln Ser Val Ser Ser Tyr
1 5

<210> 111
<211> 3
<212> PRT
<213> 人

<400> 111

Asp Ala Ser
1

<210> 112
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 112

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

序列比对

下面给出了本发明的抗体的序列。

SEQ ID NO 在序列右边的括号中给出。

依照 Kabat 的 CDR1、CDR2 和 CDR3 高亮表示：斜体字表示的序列代表 CDR2，粗体字表示的序列代表 CDR3。

```

VH:          |---CDR1---|          |---CDR2---|          |-----CDR3-----|
EVQLVDSGAEVKGEGEELKESIGISLIGNVRQAPGKGLKRWGQIYDSSSRYSRPSFQGGYTIADKSIETAIYLGNSSELSKASDTAMTIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
013 (1)
QVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]HWVROAPGKGLRWAL[REDACTED]YADSVKGRFTISRDKSKITLTIQNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
014 (5)
EVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
014 (9)
EVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
017 (3)
EVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
042 (17)
EVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
092 (21)
EVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
101 (25)
QVQLVDSGAEVKGEGEELKESIGISLIGNVRQAPGKGLKRWGQIYDSSSRYSRPSFQGGYTIADKSIETAIYLGNSSELSKASDTAMTIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
003 (29)
QVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]HWVROAPGKGLRWAL[REDACTED]YADSVKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
025 (33)
QVQLVDSGGVWVQRRSILKLSCTAS[REDACTED]MSVTRQAPGKGLRWVSS[REDACTED]YTDVSKGRFTISRDNSKNTLYIQNNSLRAREDYAVYIC[REDACTED]WGQGTAVTVSS VHI1015-
109 (37)

```

图 1

QVQLVESGQGVGQVQGRSLRLSCTAAS...MHWVROAPGKLELWAV...VYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYCC...MCOGALVTVSS8 VHL1015-044 (41)

EYQLYVQSGAEVYKPKGSELSIKISCKGS...TCHWVROAPGKLELWNGE...EYSPSPGQGVTFIENDASISLSTALQNSLSLADSTAVYCC...MCOSTMTVSS8 VHL1015-087 (45)

QVQLVQSGAEVYKPKGSSVYKVSCKAS...ITWVROAPGQGFEMNGR...VYAQVPOKAVTITADKSTSTAWELNSLRSLEDTAVYCC...MCOSTMTVSS8 VHL1015-098 (49)

QVQLVESGQGVGQVQGRSLRLSCTAS...MHWVROAPGKLELWAV...VYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLRAEDTAVYCC...MCOSTMTVSS8 VHL1015-111 (53)

图1(续)

VL4:

DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-013 (57)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGQAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-114 (61)
DIQNTQSPSSLSASAGRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-011 (65)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGQAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-017 (69)
EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGQAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VHL1015-042 (73)
DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-092 (77)
DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-101 (81)
AIGLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGAPKLLIY	TLTLESGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-003 (85)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-025 (89)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-109 (93)
AIGLTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPGAPKLLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-044 (97)
DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-087 (101)
DIQNTQSPSSLSASVGDRTVITCRAS	LAWYQOKPEKAPKSLIY	SLQSGVSRFSGSGSDFTLTISSLOPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-098 (105)
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRAS	LAWYQOKPGAPKLLIY	SRATGIIPDRFSGSGSDFTLTISSLEPEDFATVYCC	FGGQTKVEIK VLA1015-111 (109)

图1(续)

SEQ ID NO: 113: 人 IgG4 的野生型 C_H 区的氨基酸序列。

```

1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQV
51  HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV
101  HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVSV FLFPPKPKDT LMIERTPEVT CVVVDVVSQED
151  PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK
201  CKVSNKGLPS SIEKTISKAK QPREPQVYT LPPSOEEMTK NOVSLTCLVK
251  GFYRSDIAVE WESNGOPENN YKTTPEVLDS DGSEFLYSRL TVDKSRMOEG
301  NVPSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLGLK

```

斜体字表示的序列代表 CH1 区，高亮的序列代表铰链区，正常字体的序列代表 CH2 区，加下划线的序列代表 CH3 区。

SEQ ID NO: 114: 人 IgG4 的无铰链 C_H 区的氨基酸序列

```

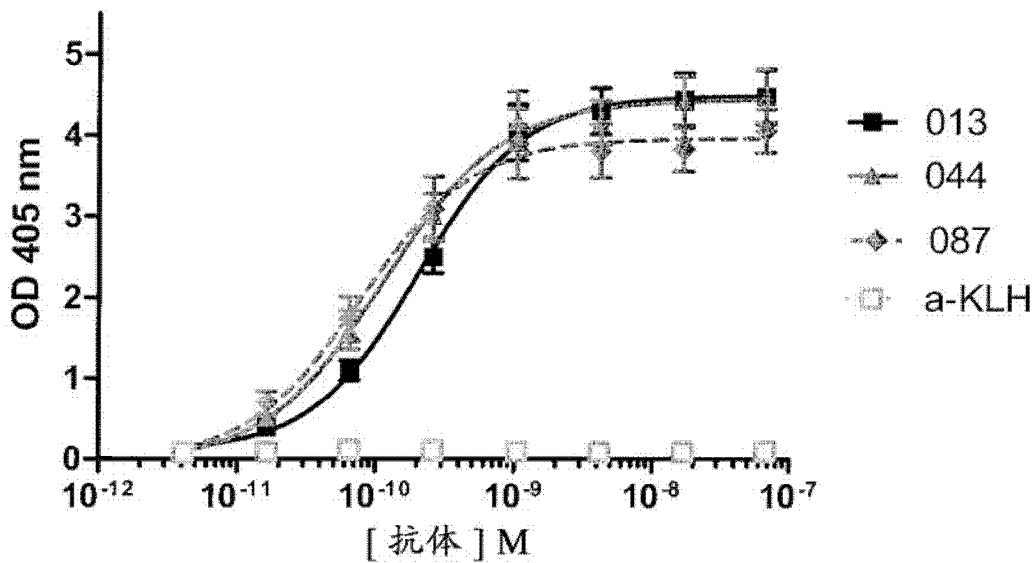
1  ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSQV
51  HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVAP
101  EFLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVVSQEDPE VQFNWYVDGV
151  EVHNAKTKPR EEQFNSTYRV VSVLTVLHQD WLNKEYKCK VSNKGLPSSI
201  EKTISKAKGQ PREPQVYITL PSEQEEMTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE
251  SNGQPEENYK TTPFVLDSDG SFFLYSRLTV DKSRWQEGNV FSCSVMHEAL
301  HNHYTQKSLS LSLGLK

```

图 2

ELISA TFECDhis

交叉阻断组 I



ELISA TFECDhis

交叉阻断组 II

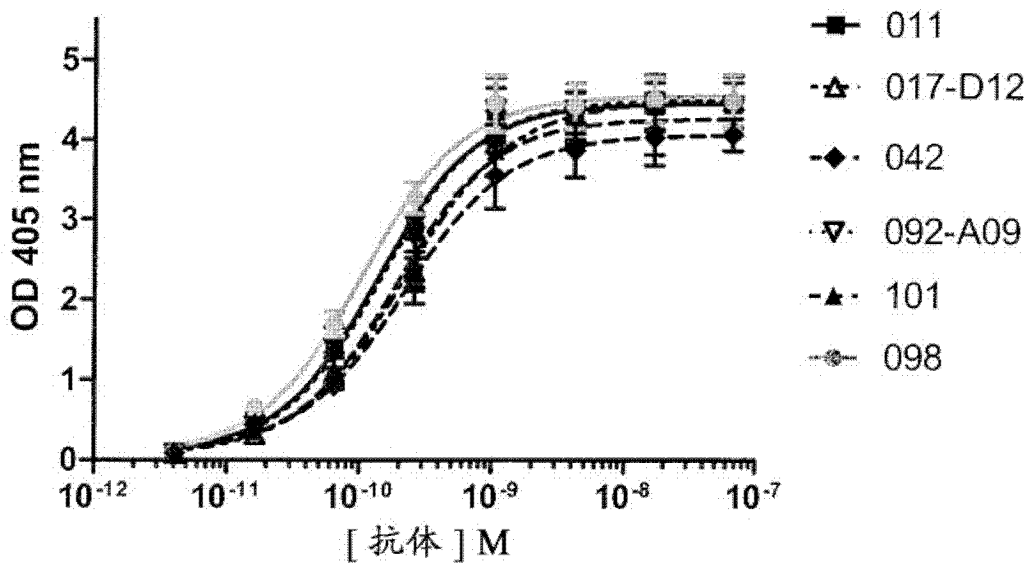


图 3

ELISA TFECDhis

交叉阻断 III (II/III)

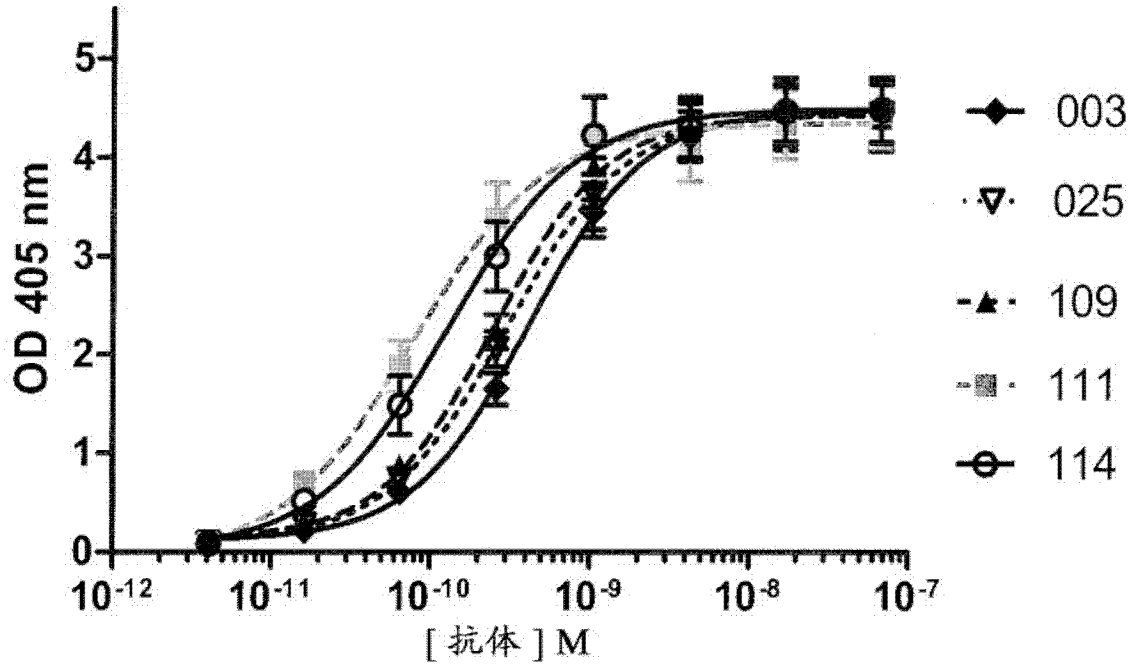
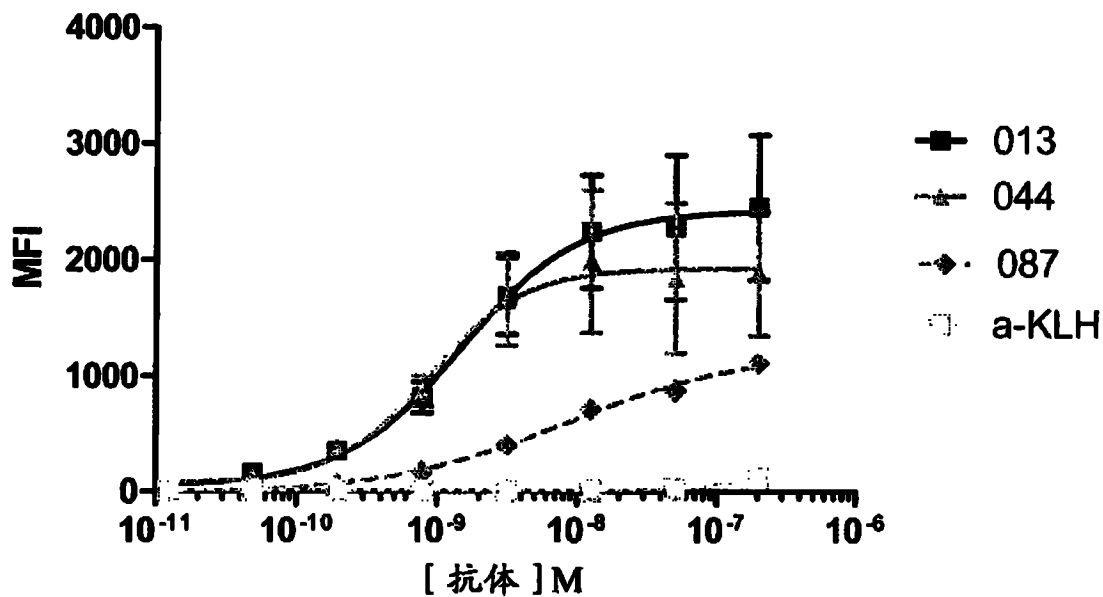


图 3 :通过 ELISA 确定了抗 TF 人单抗在 ELISA_ 结合中对 TF 的胞外域的结合

图 3(续)

FACS MDA-MB-231

交叉阻断组 I



FACS MDA-MB-231

交叉阻断组 II

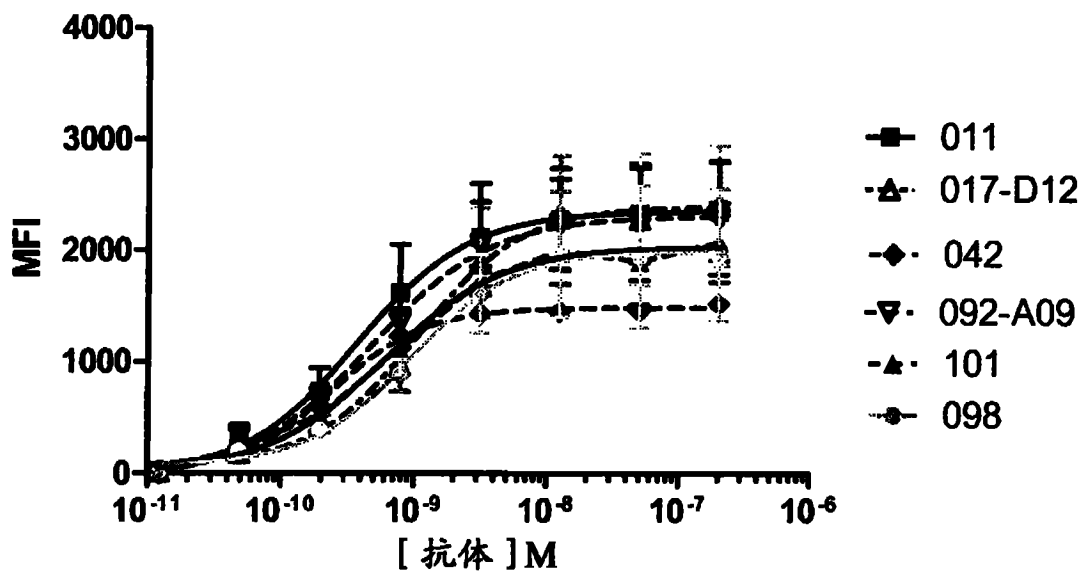


图 4

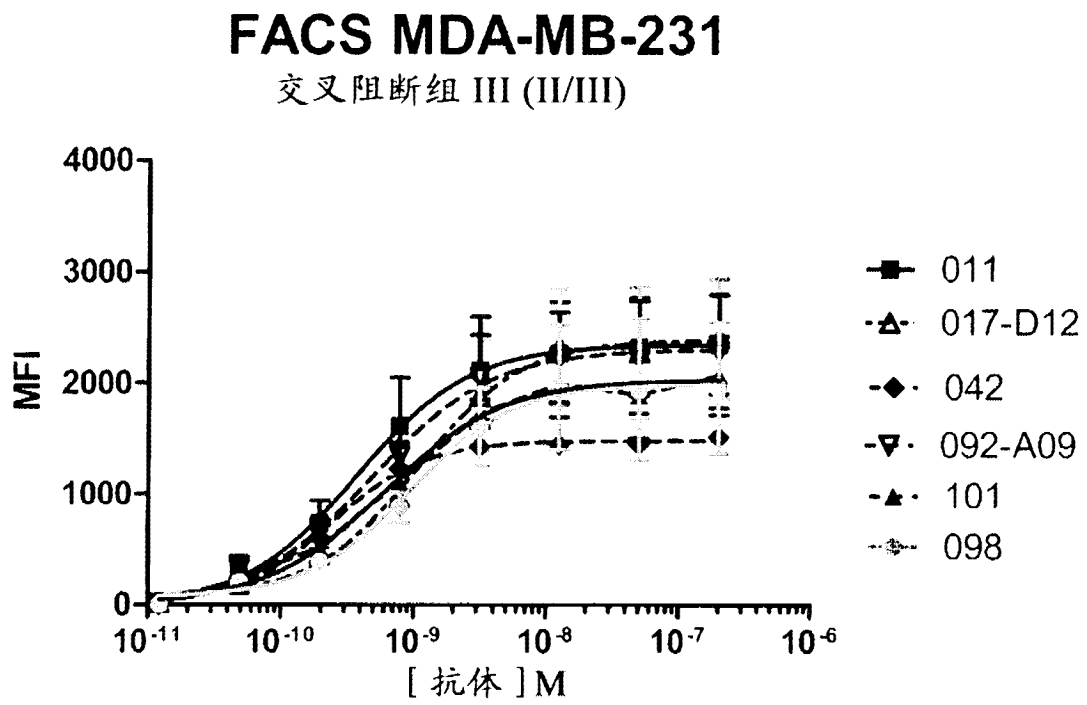


图 4a, 4b, 4c : 抗 TF 人单抗对 MDA-MD-231 上的膜结合 TF 的结合。结合通过 FACS 分析来确定。

图 4(续)

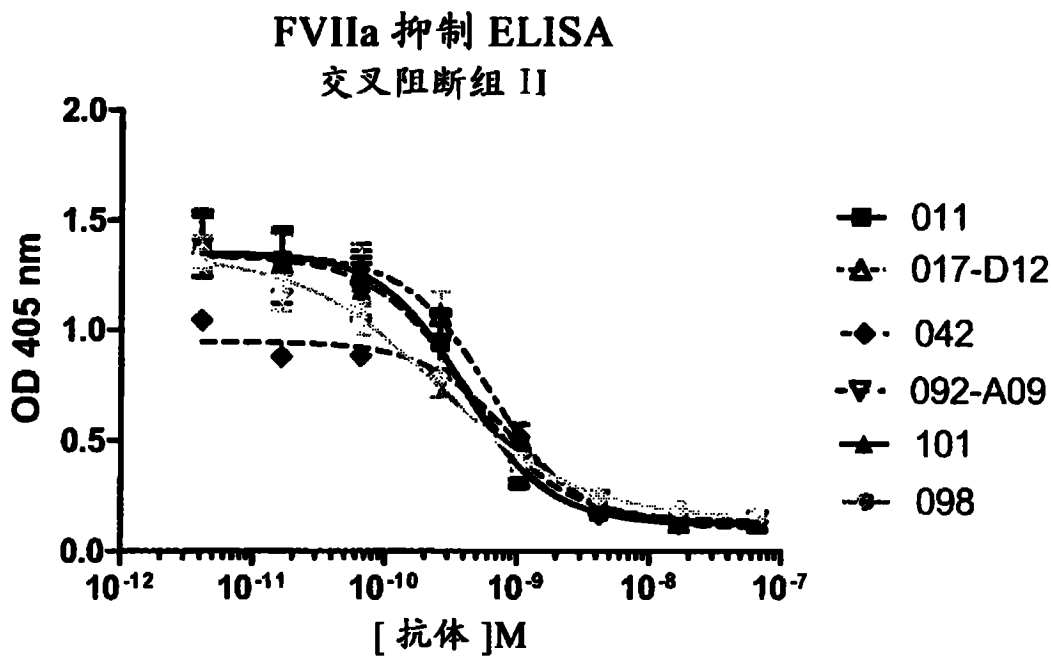
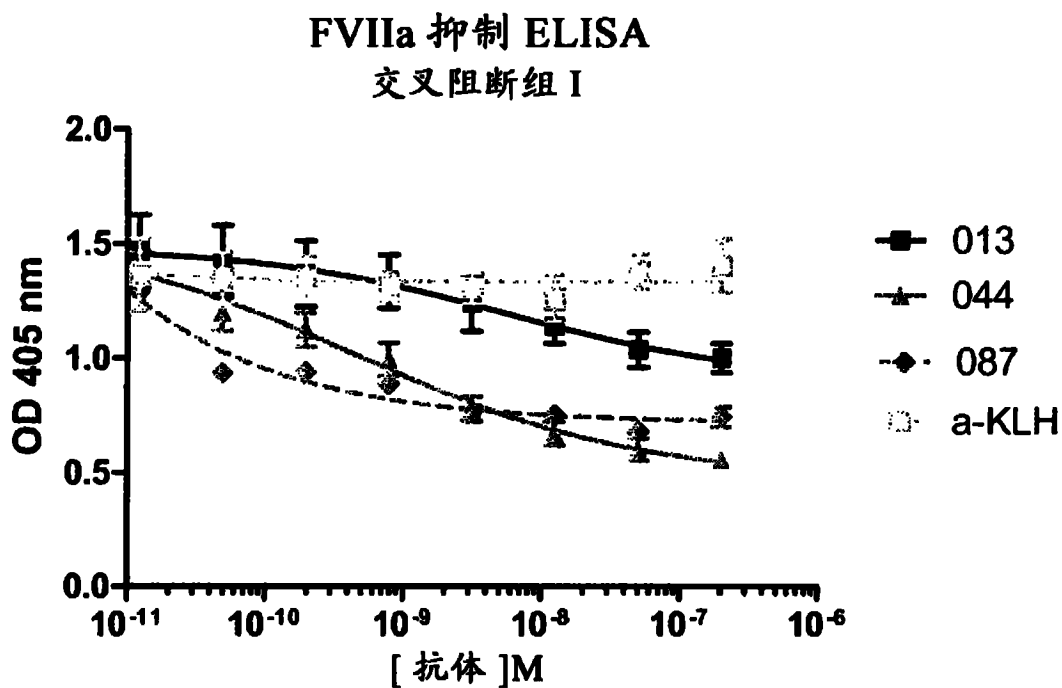


图 5

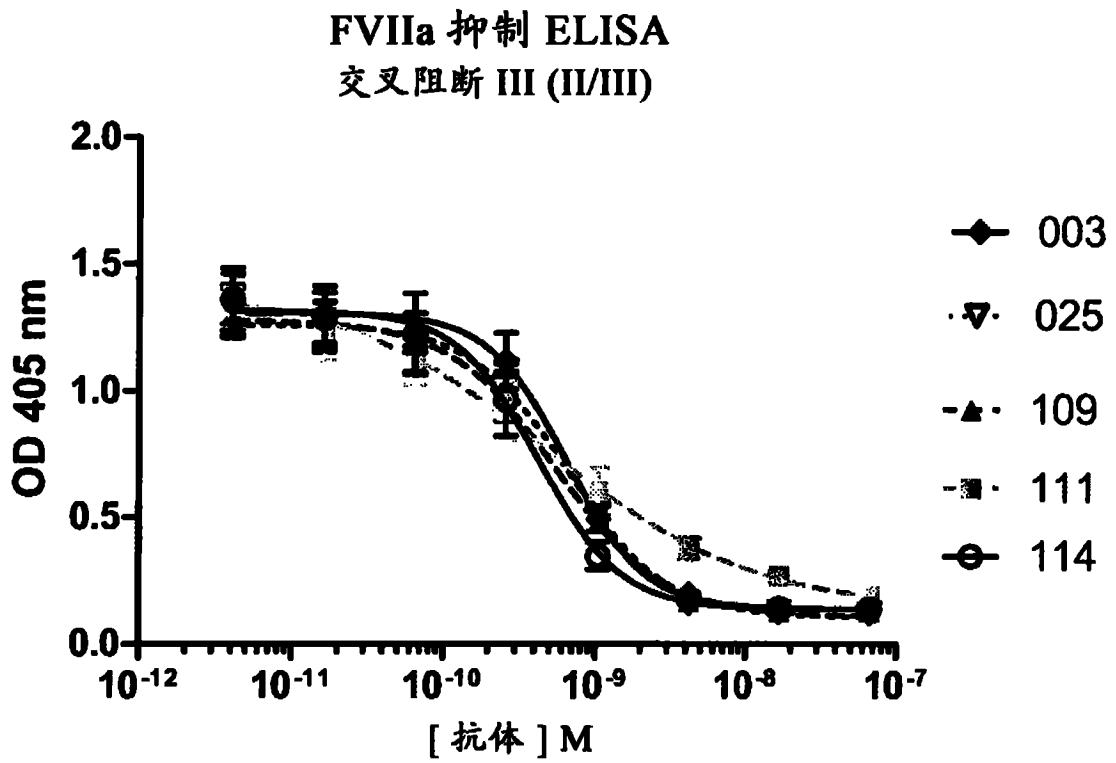
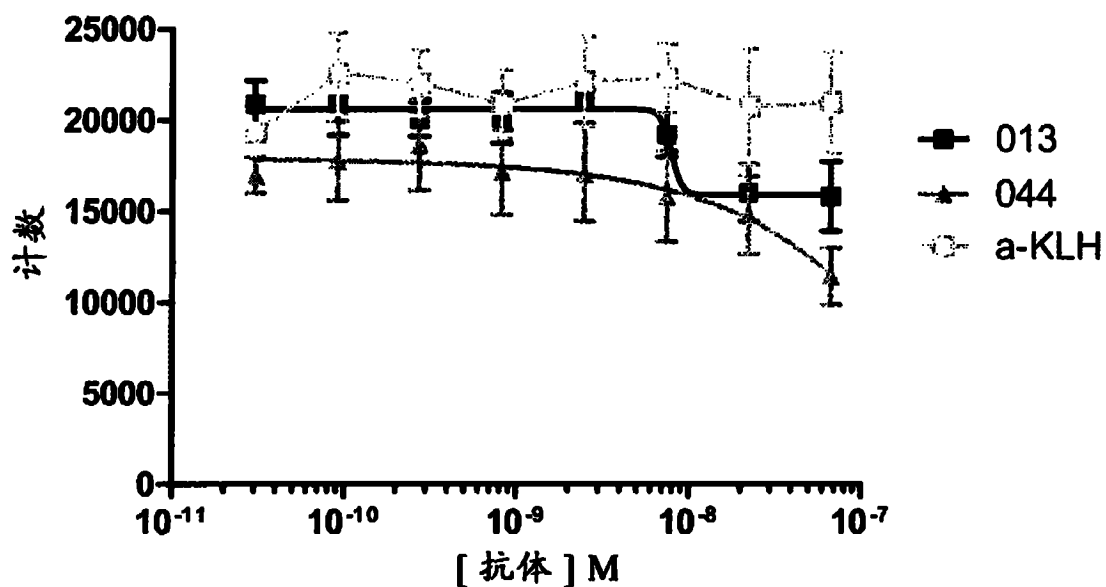


图 5 :FVIIa 对 TF 的结合的抑制。通过 ELISA 测定 FVIIa 结合以及 TF 特异性人单抗对该结合的抑制。

图 5(续)

抑制 ERK-P
A431
交叉阻断组 I



抑制 ERK-P 产生
A431
交叉阻断组 II

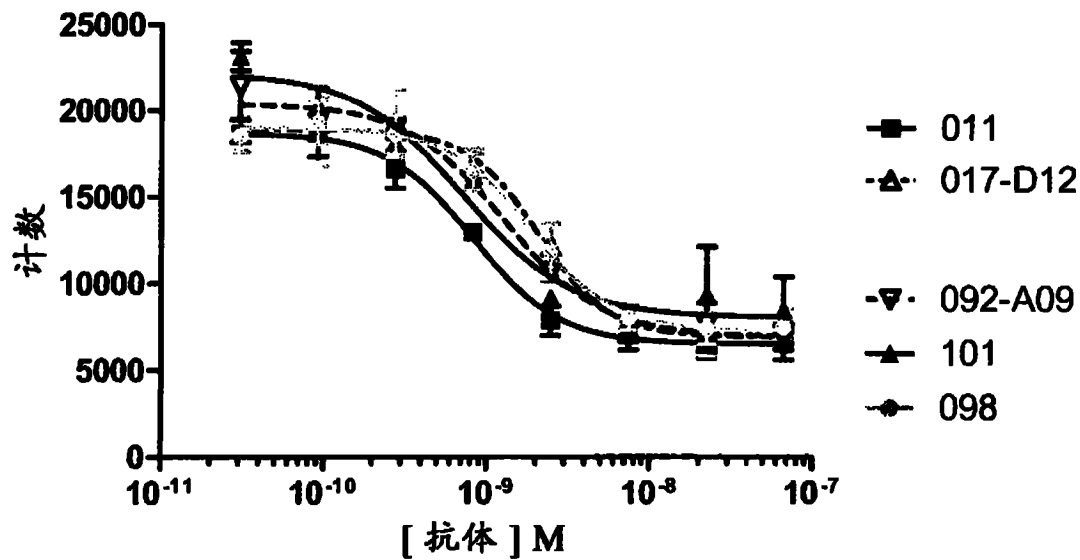


图 6

抑制 ERK-P
A431

交叉阻断 III (II/III)

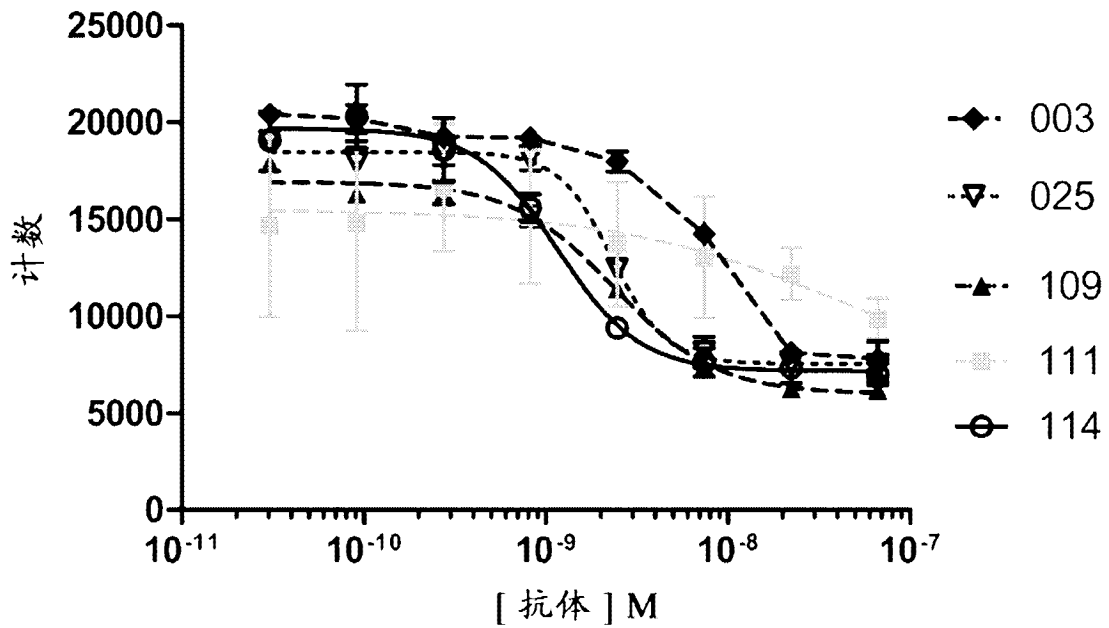


图 6: FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化的抑制

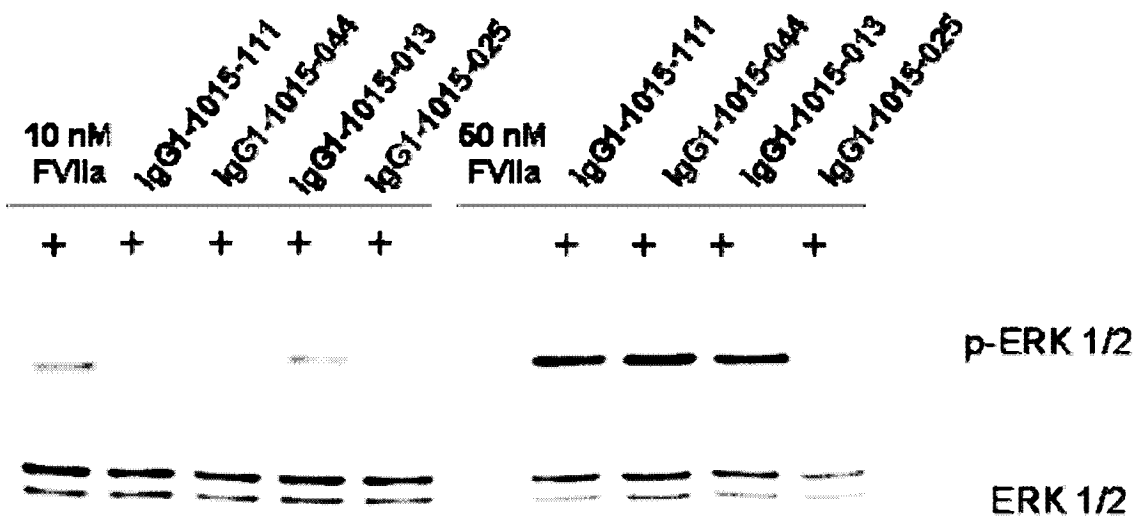
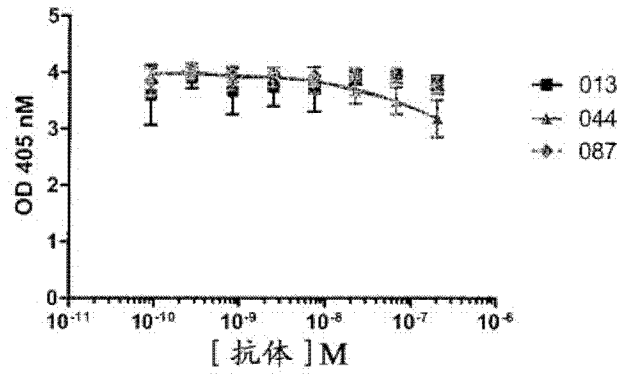


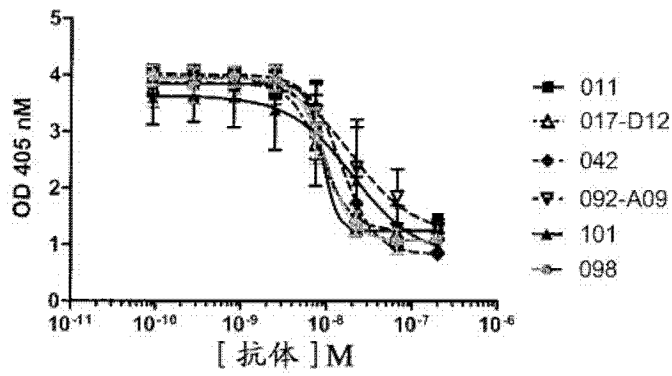
图 6A: FVIIa 诱导的 ERK 磷酸化的抑制, 使用 Western 印迹分析

图 6(续)

抑制 IL-8 产生
MDA-MB-231
交叉阻断组 I



抑制 IL-8 产生
MDA-MB-231
交叉阻断组 II



抑制 IL-8 产生
MDA-MB-231
交叉阻断 III (II/III)

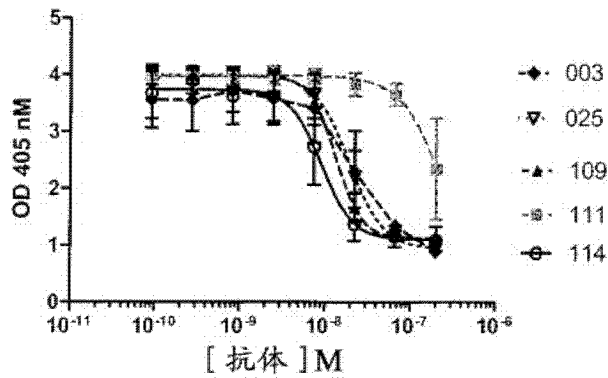
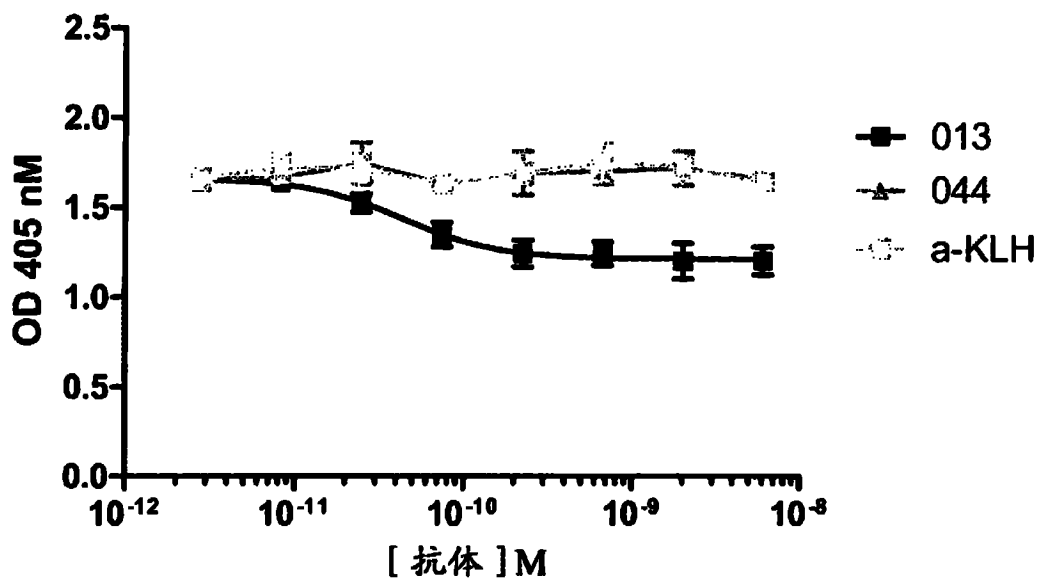


图 7

图 7. 对 FVIIa 诱导的 IL-8 释放的抑制。MDA-MB-231 在无血清培养基中培养，添加 TF 特异性抗体和 FVIIa。通过 ELISA 来测量 FVIIa 诱导的 IL-8。

图 7(续)

抑制 FXa 生成 交叉阻断组 I



抑制 FXa 生成 交叉阻断组 II

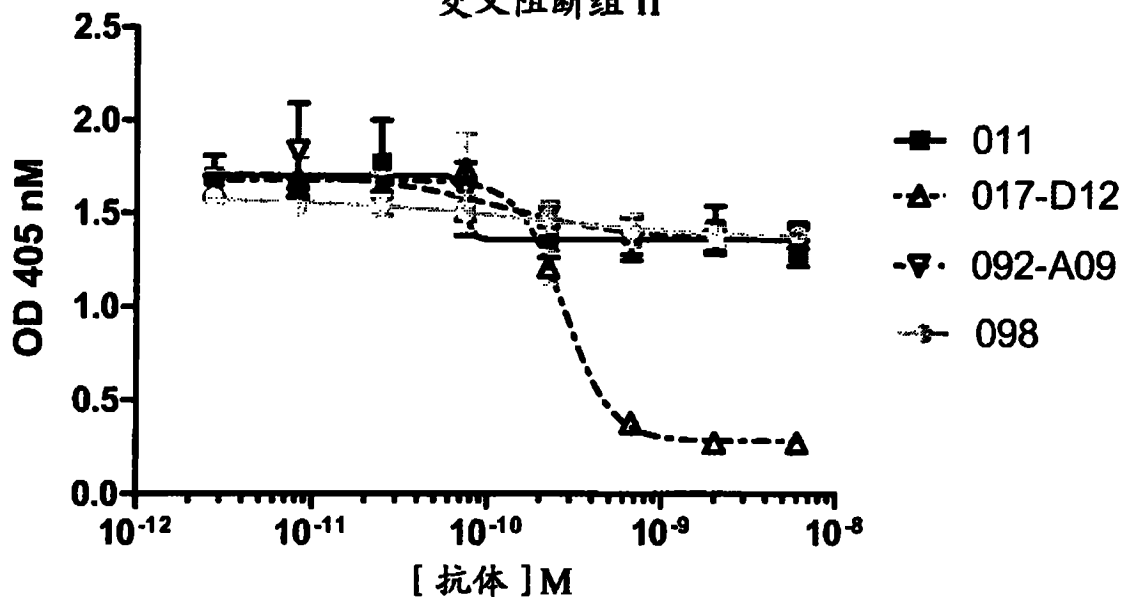


图 8

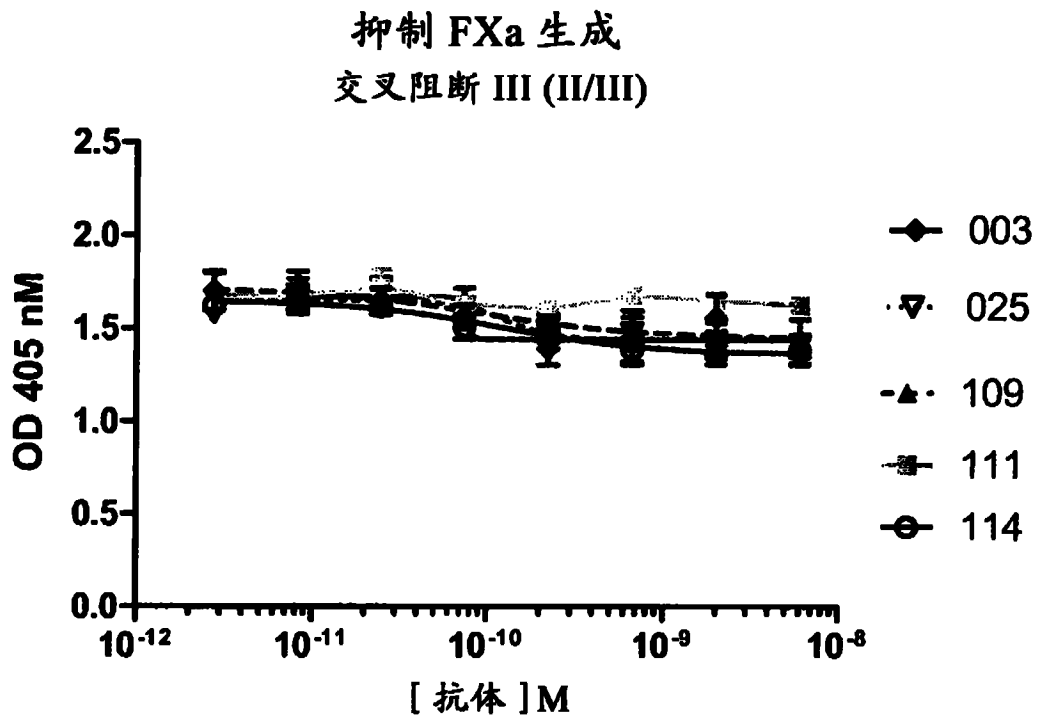


图 8. FXa 生成的抑制。测试 TF 特异性人单抗抑制 FXa 生成的能力,在测定系统中利用比色 FXa 特异性底物来测量 TF/FVIIa 作用下 FX 到 FXa 的转化。

图 8(续)

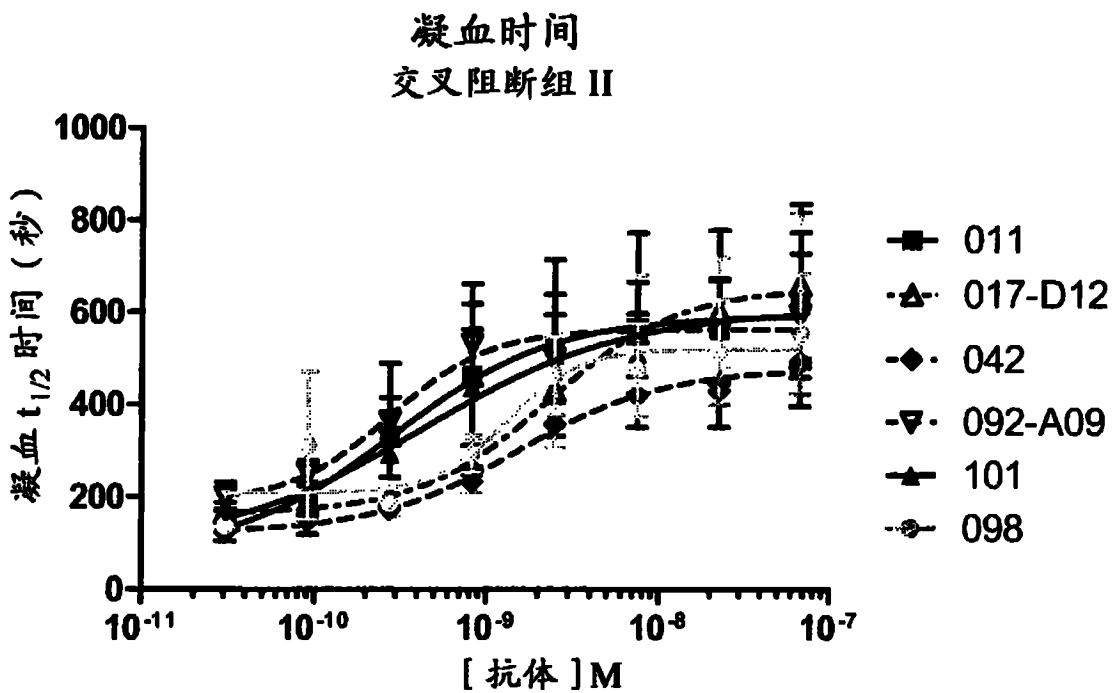
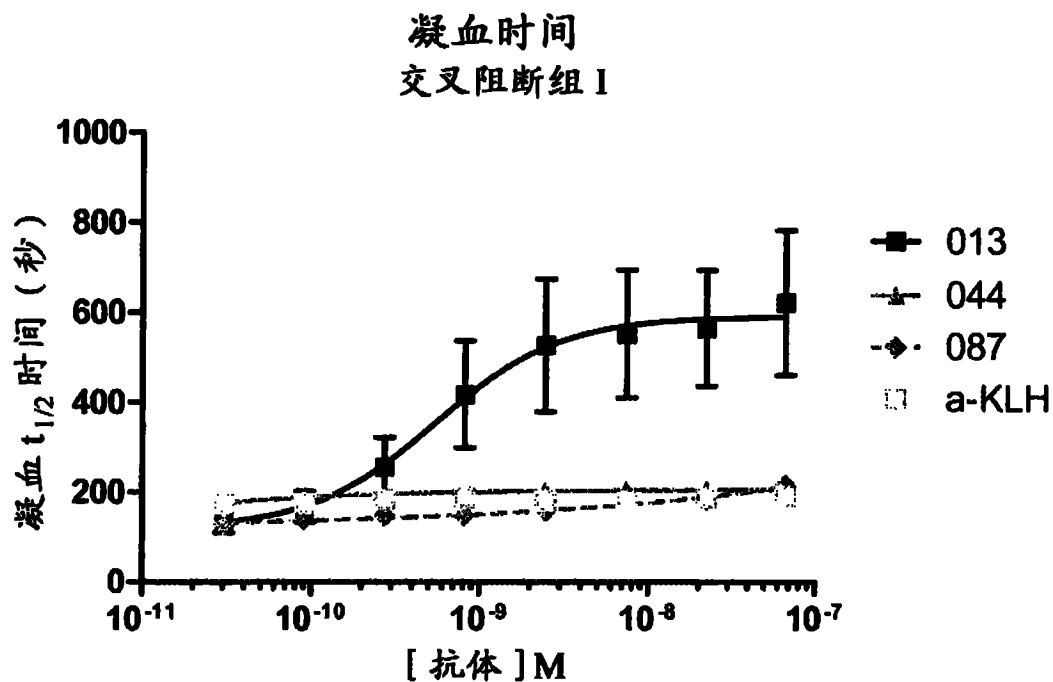


图 9

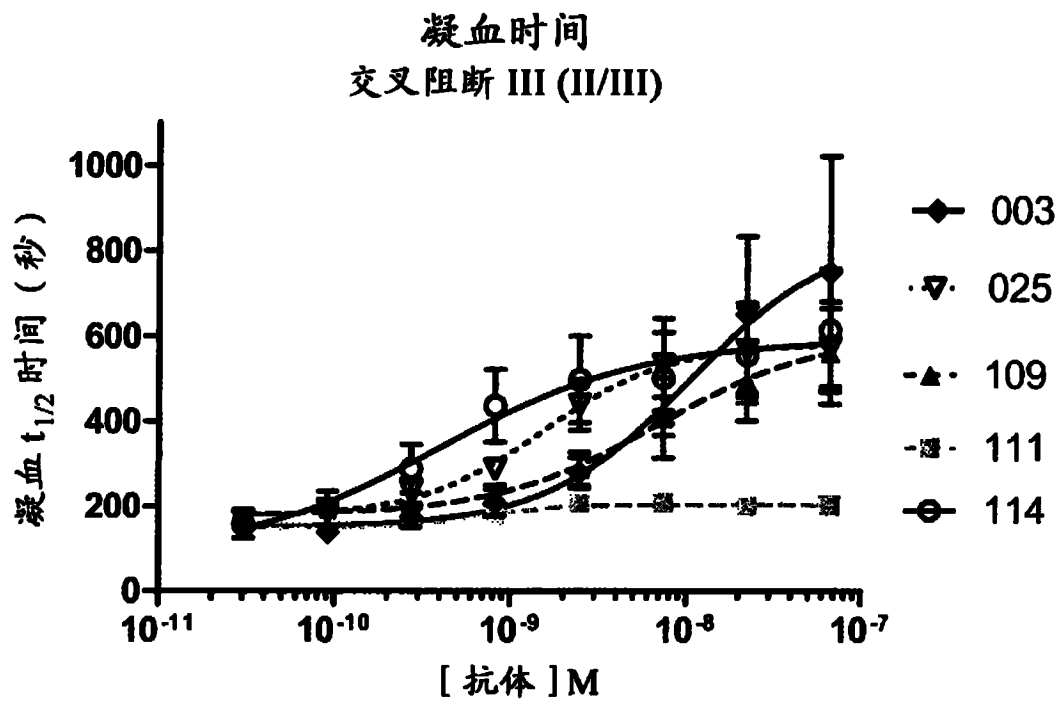
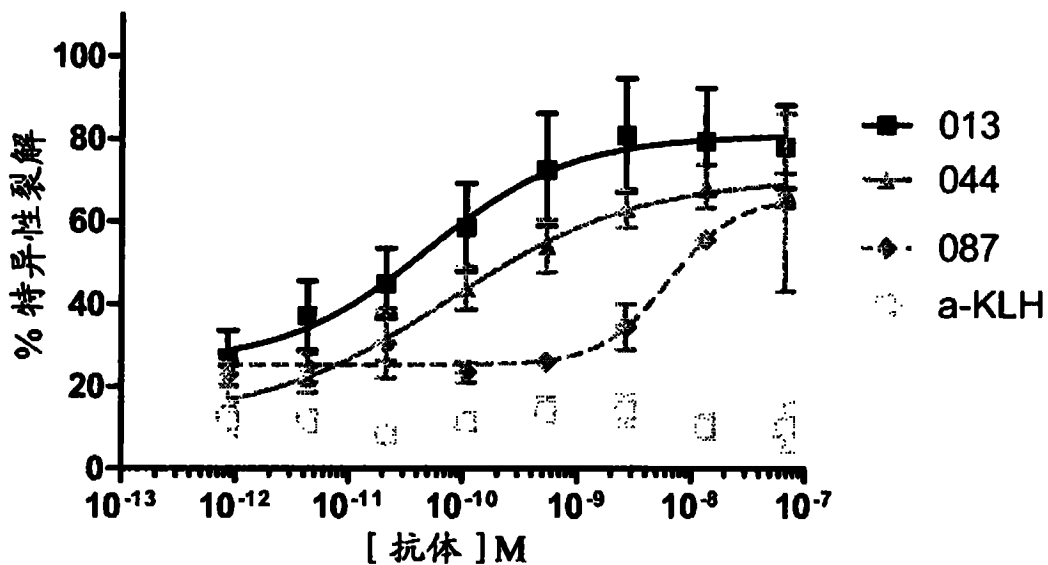


图 9. 凝血抑制。用测定 TF 诱导的凝血时间的测定系统来测量 TF- 人单抗对凝血作用的抑制。

图 9(续)

ADCC Bx-PC3 细胞 交叉阻断组 I



ADCC Bx-PC3 细胞 交叉阻断 II

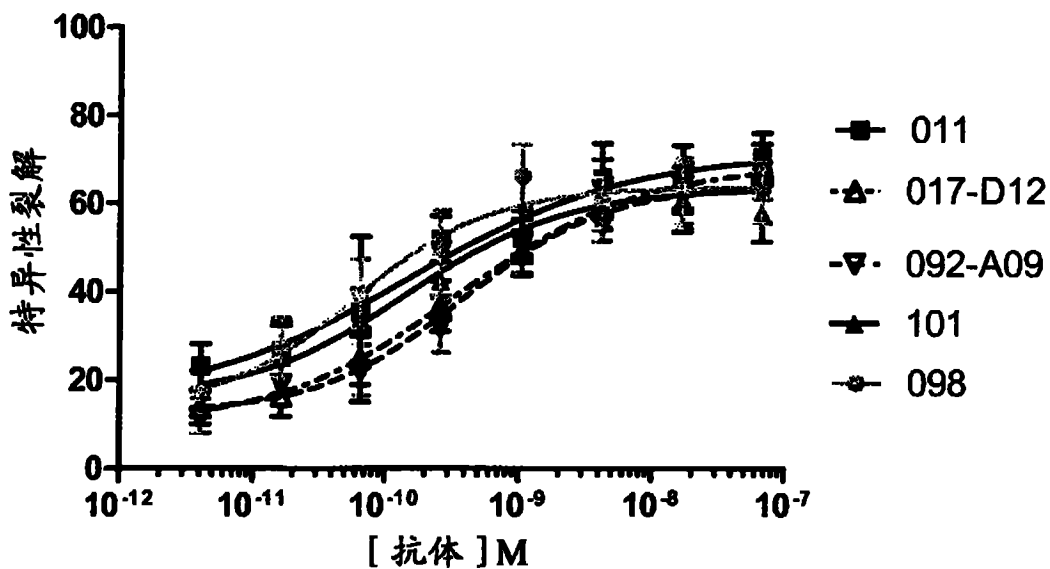


图 10

ADCC Bx-PC3 细胞
交叉阻断组 III (II/III)

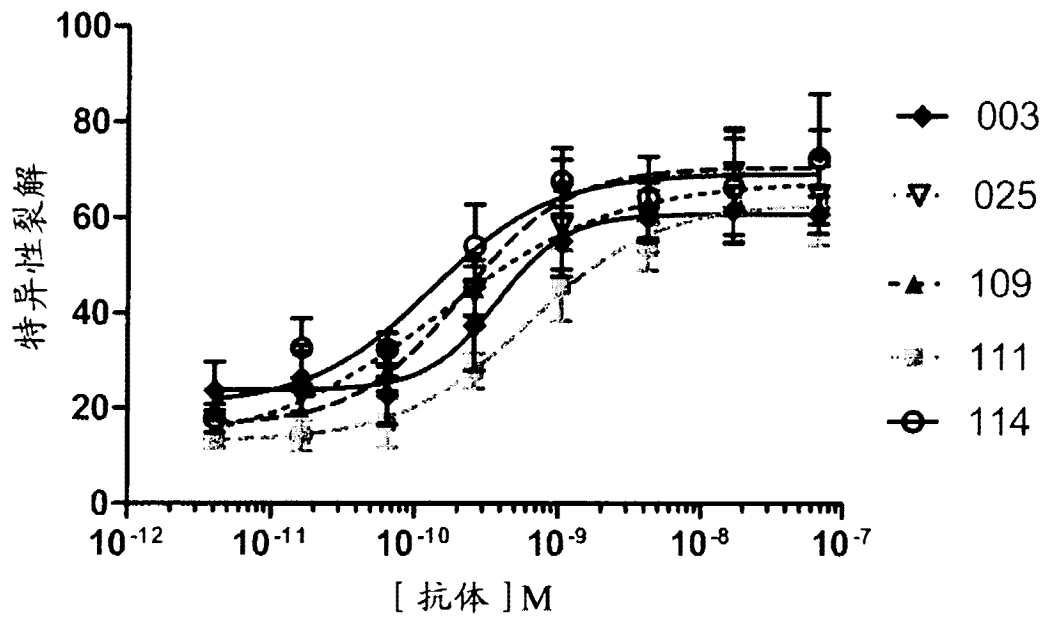


图 10 :TF- 人单抗诱导的 ADCC 对 Bx-PC3 细胞的裂解。

图 10(续)

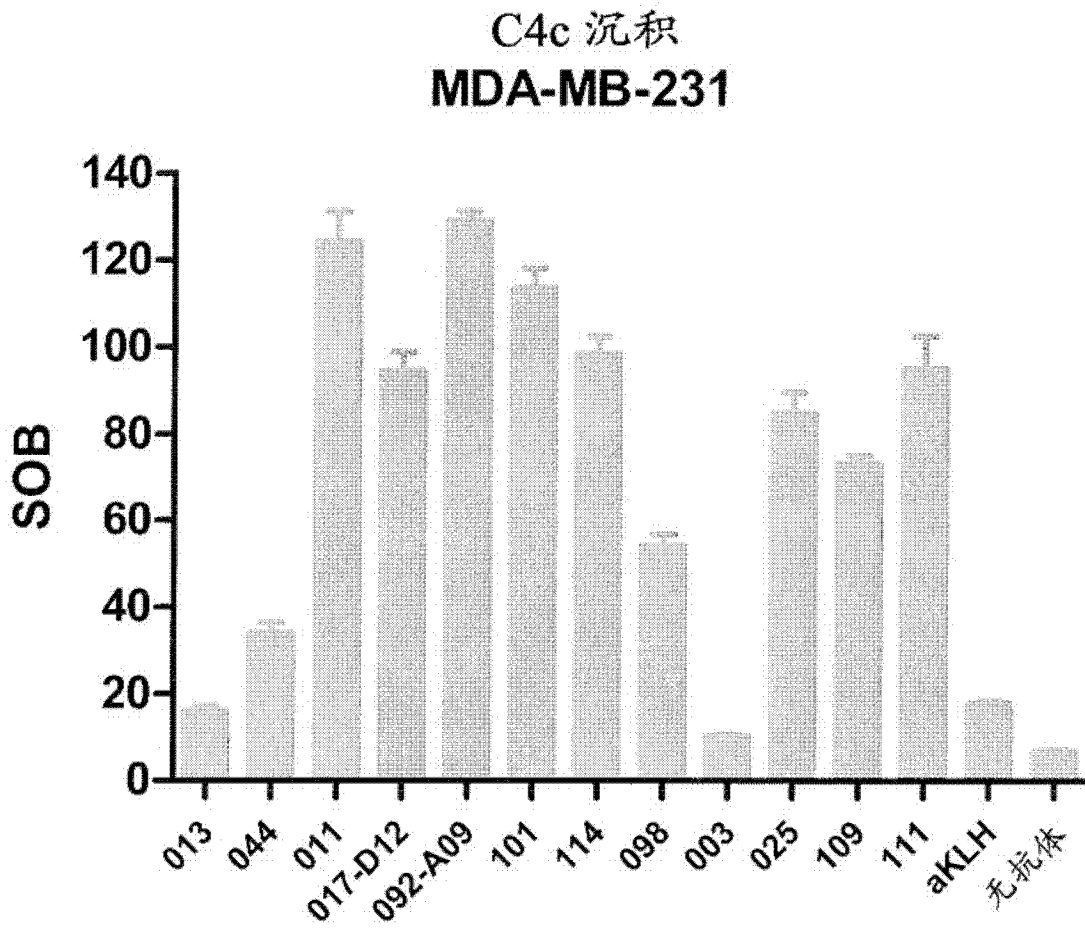


图 11

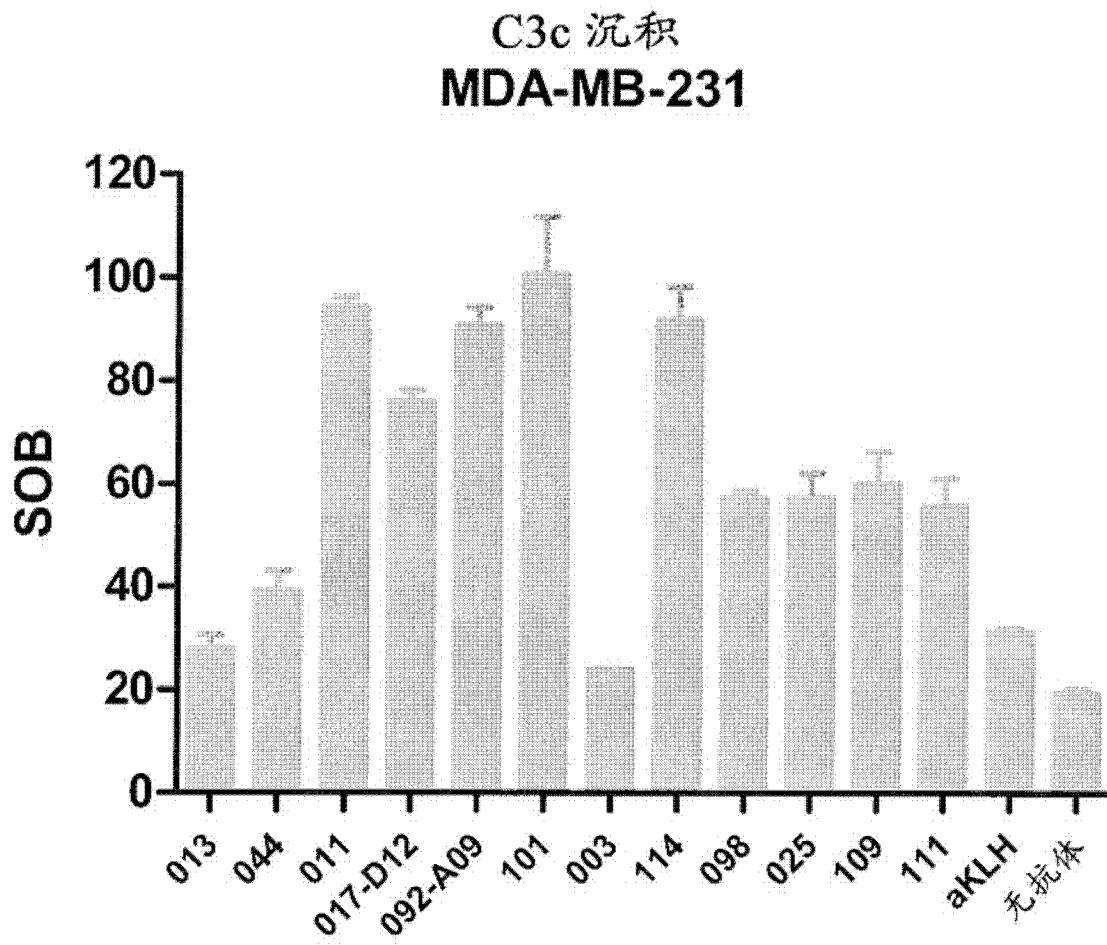


图 11(续)

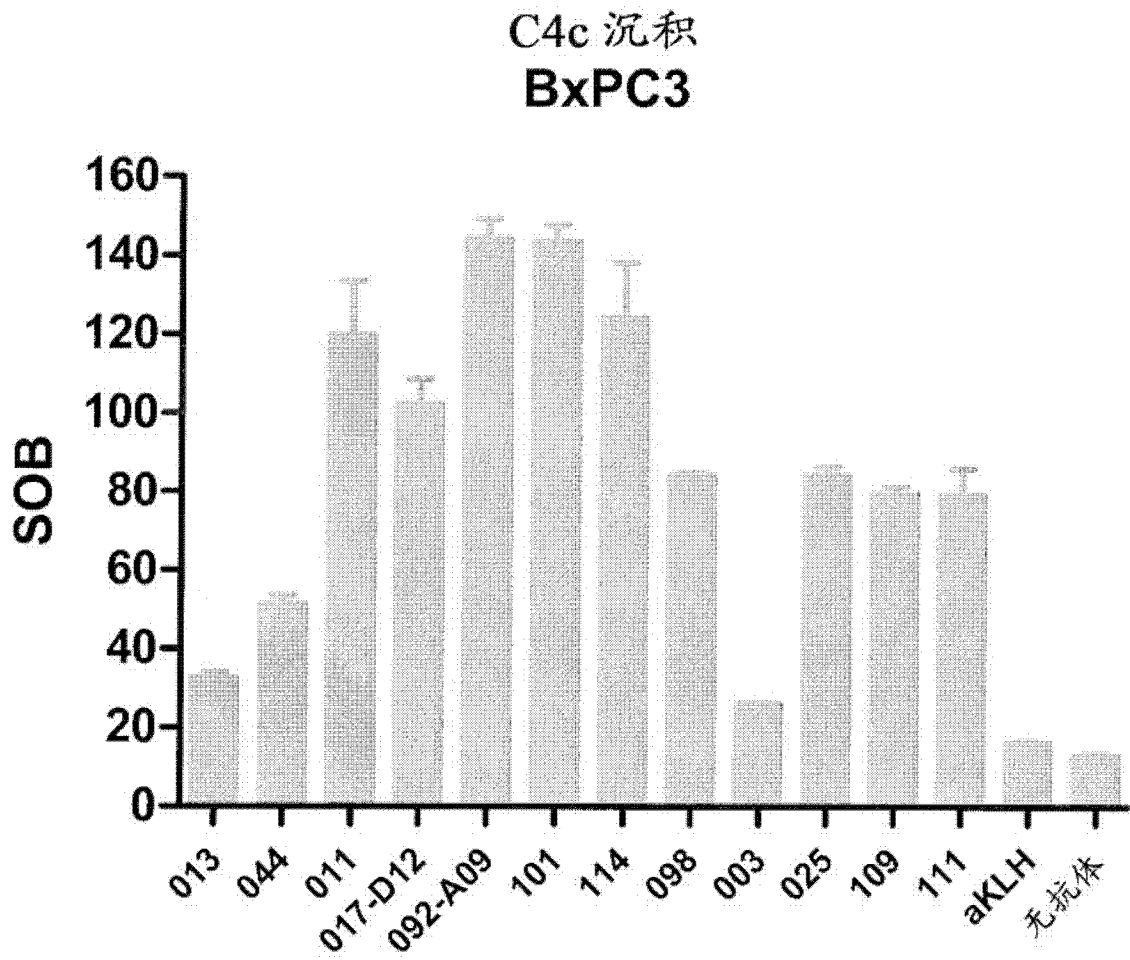


图 11(续)

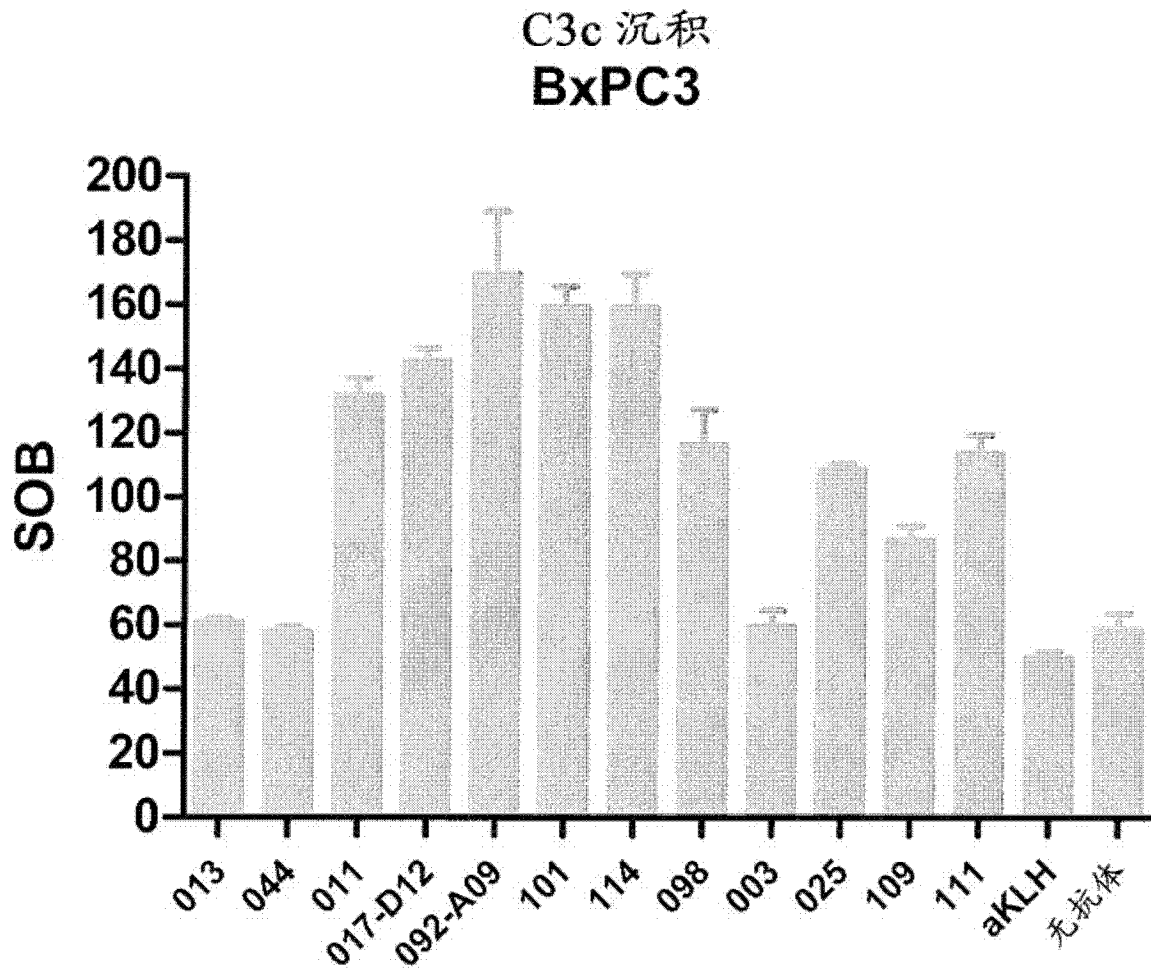


图 11 :补体沉积

图 11(续)

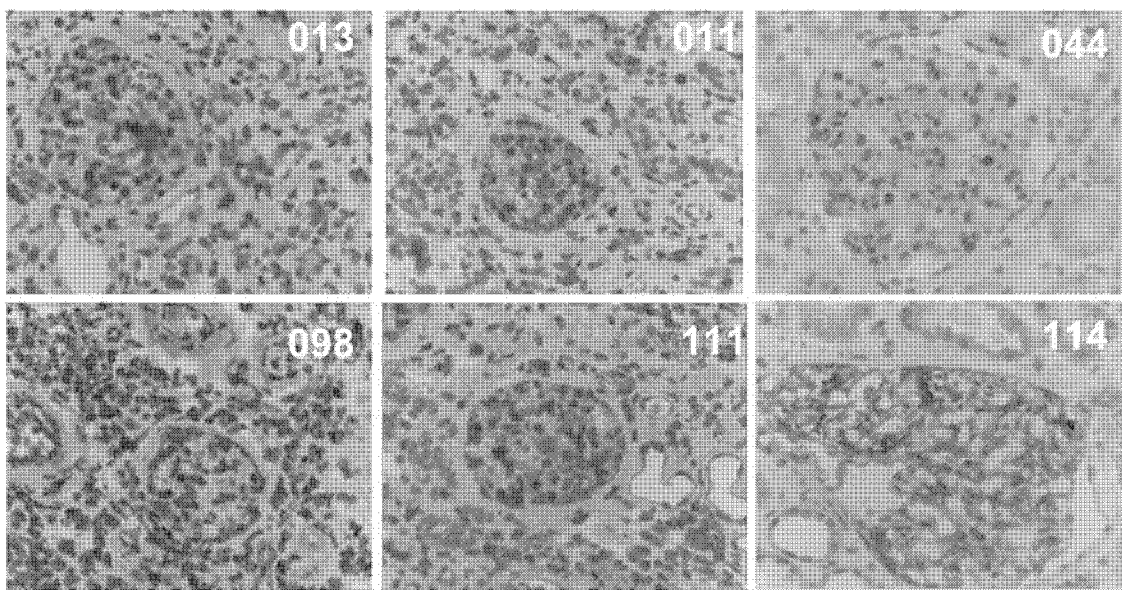


图 12 :TF- 人单抗对正常人肾的结合的免疫组织化学分析

图 12

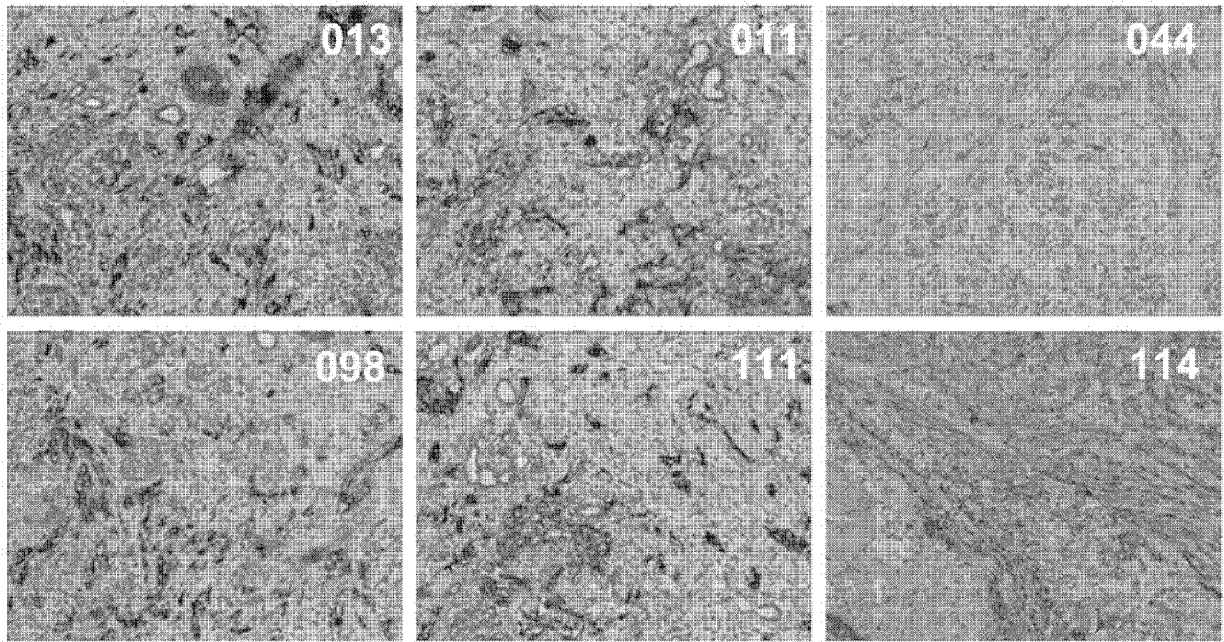


图 13 :TF- 人单抗对胰腺肿瘤的结合的免疫组织化学分析

图 13

肿瘤化 / 组

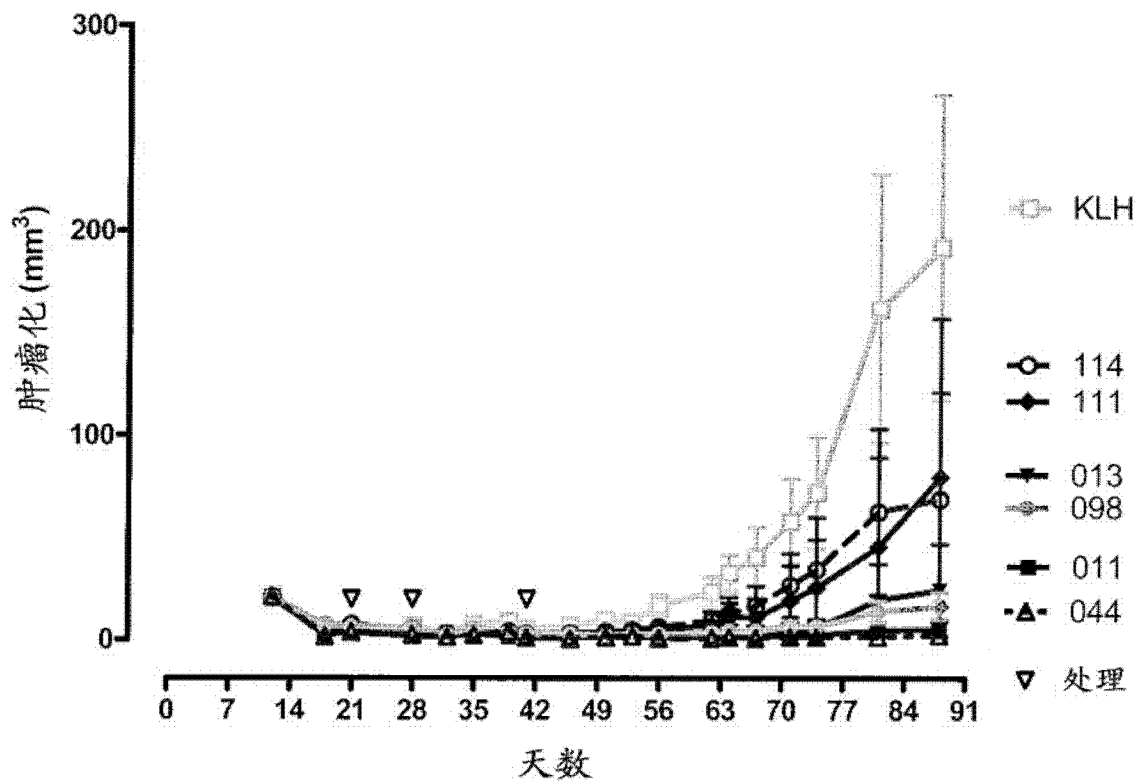
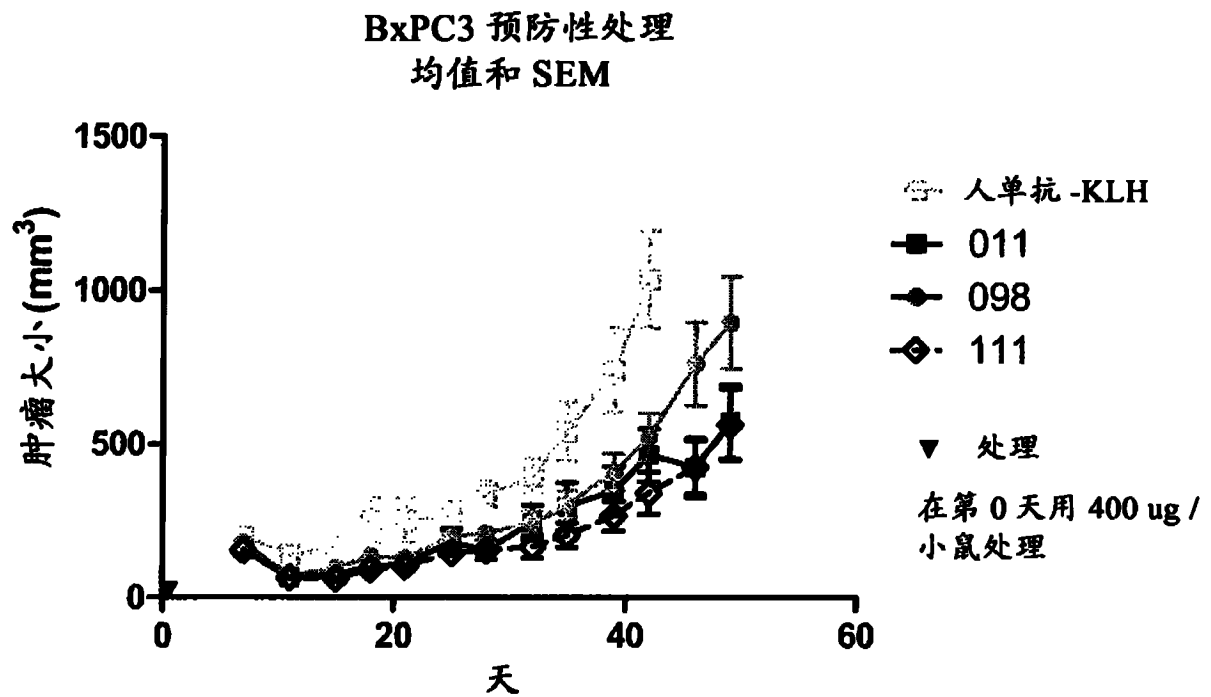
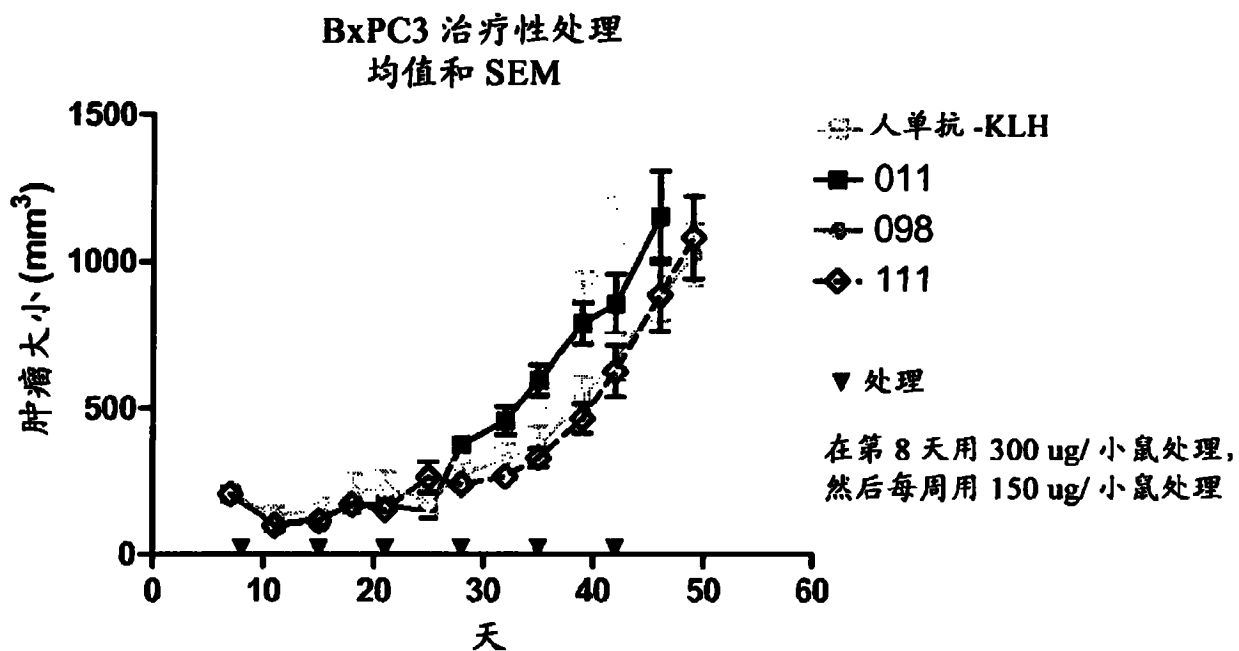


图 14



双因素重组测量方差分析，随后进行 Bonferroni 事后检验：111 对 KLH：
从第 28 天往后：P<0.05，从第 32 天往后：P<0.01。

图 16



双因素重组测量方差分析, 随后进行 Bonferroni 事后检验:
111 对 KLH: 从第 35 天往后: $P < 0.05$.

图 16(续)

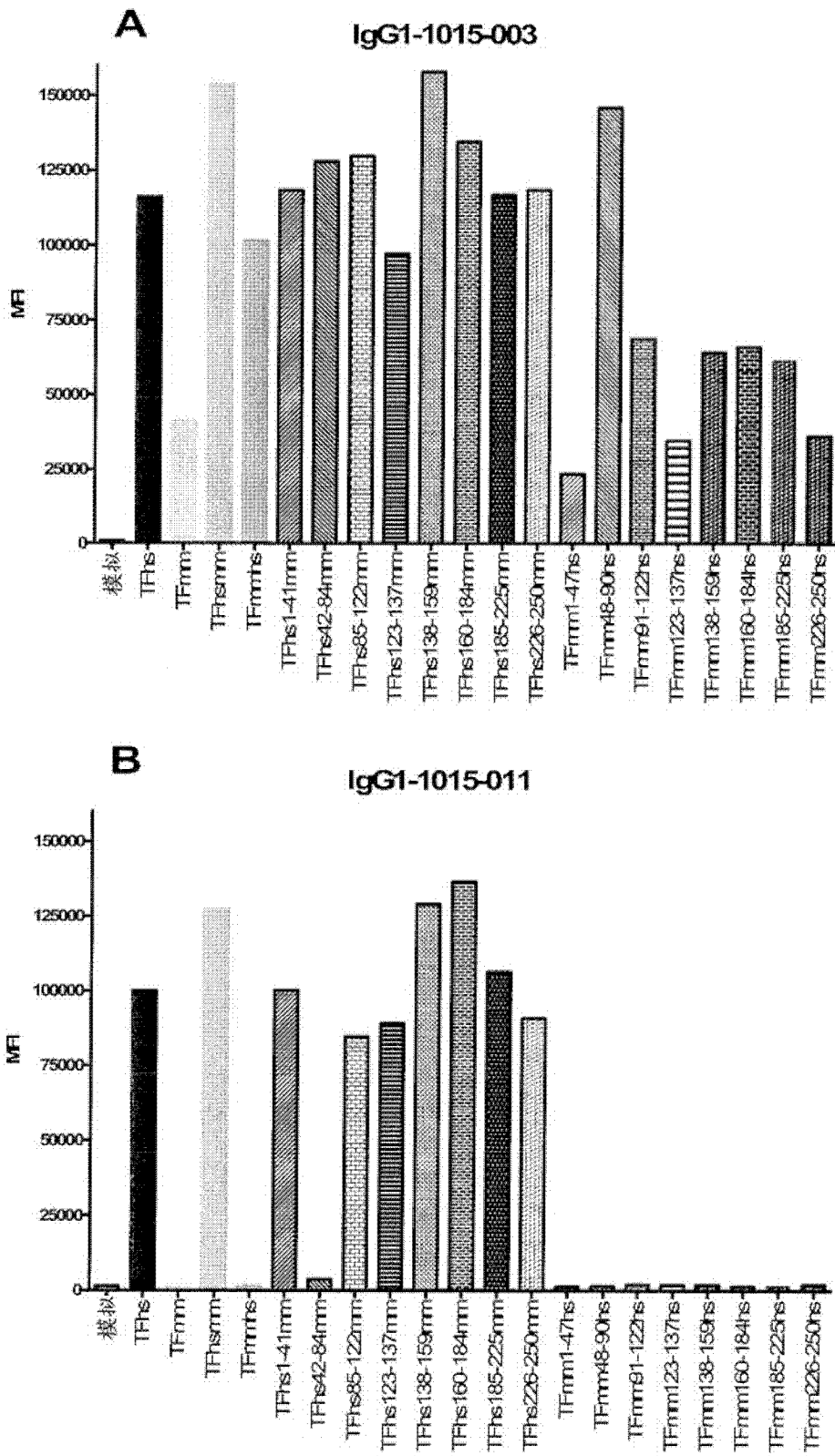


图 18

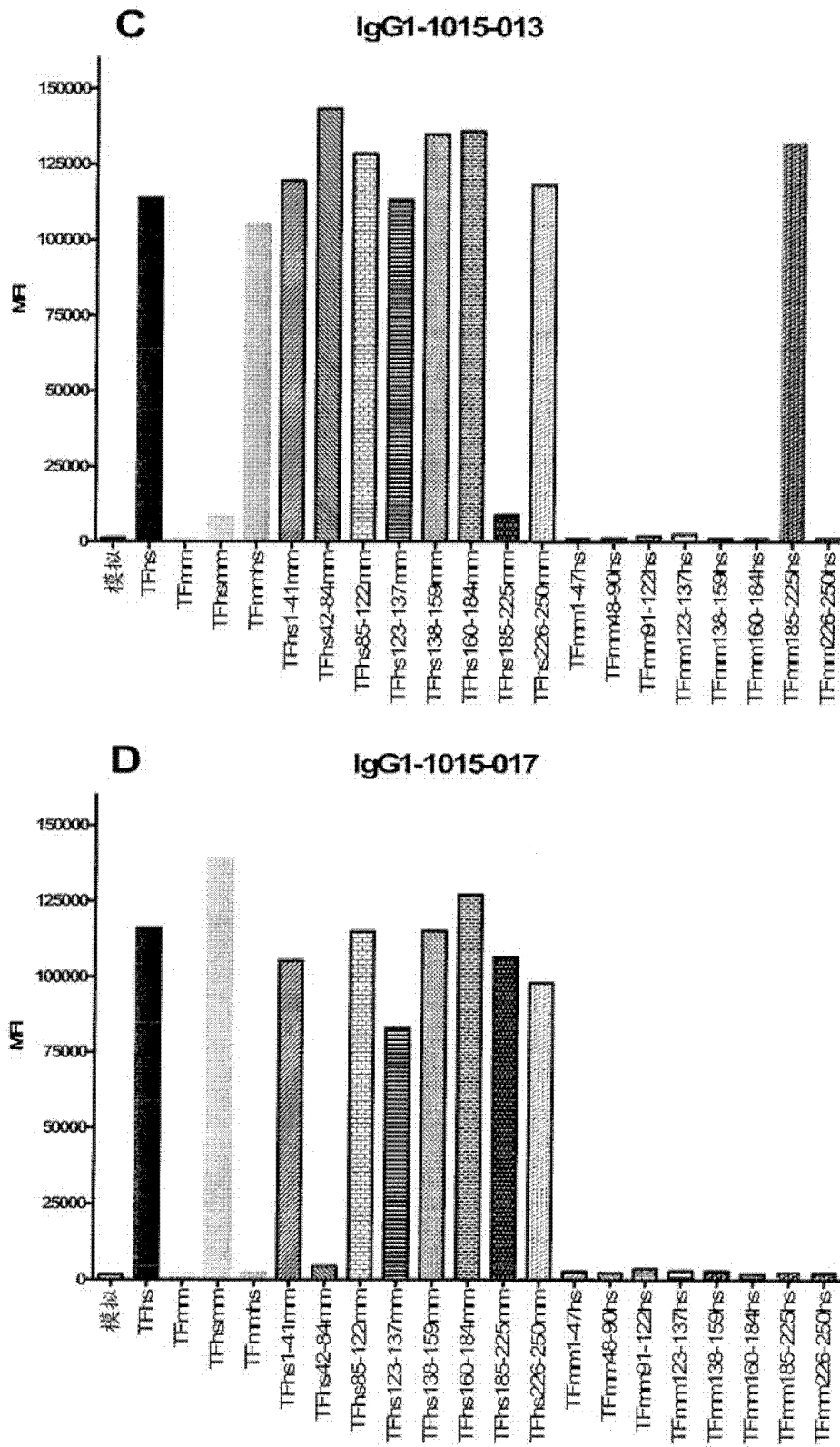


图 18(续)

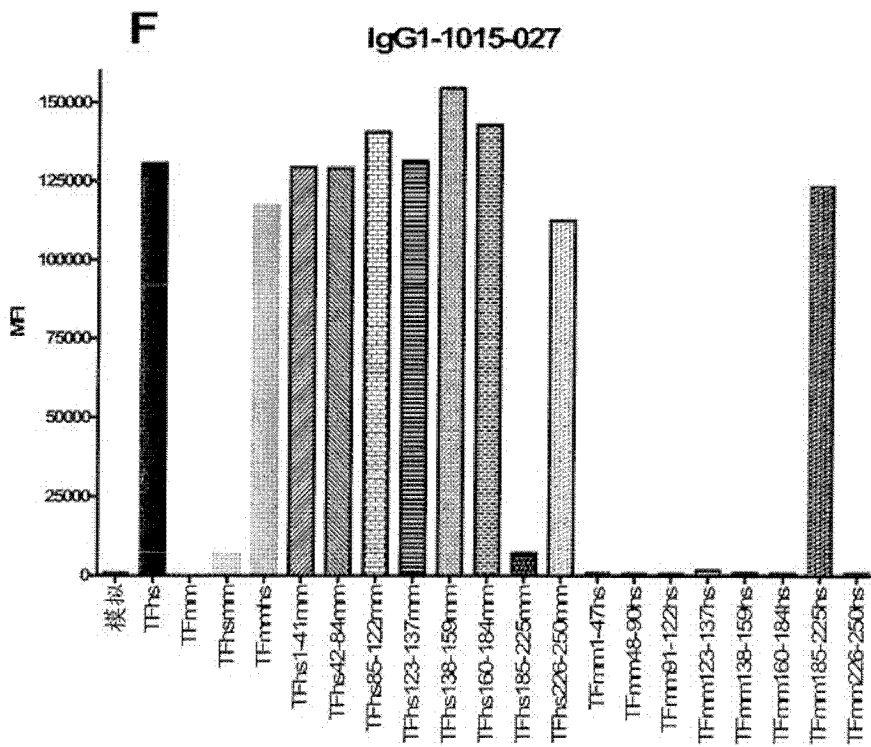
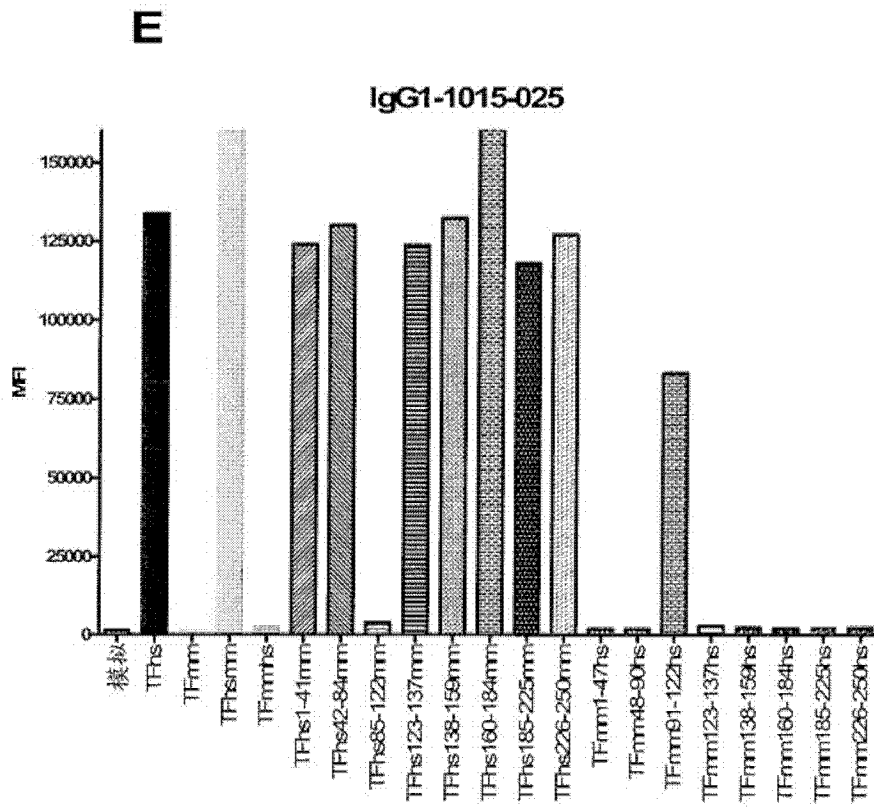


图 18(续)

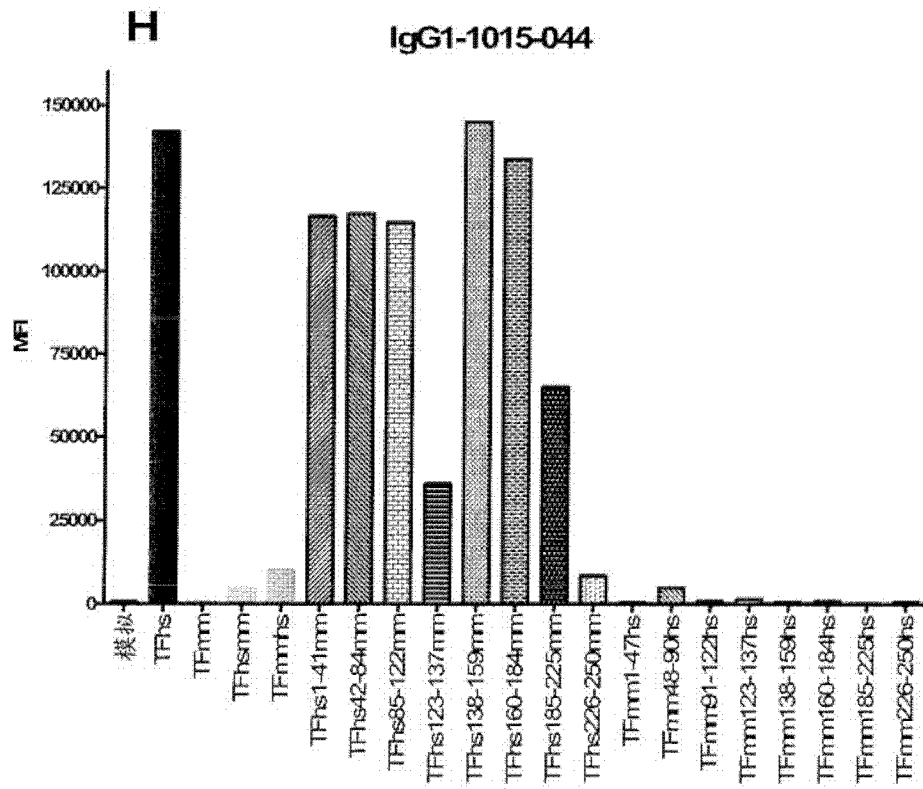
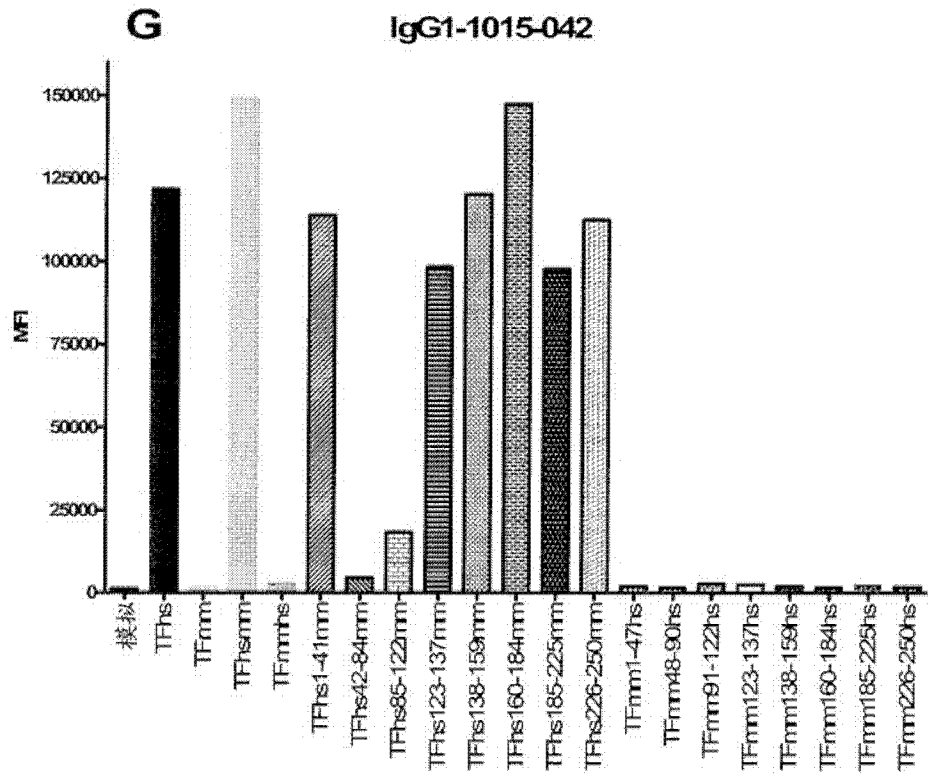


图 18(续)

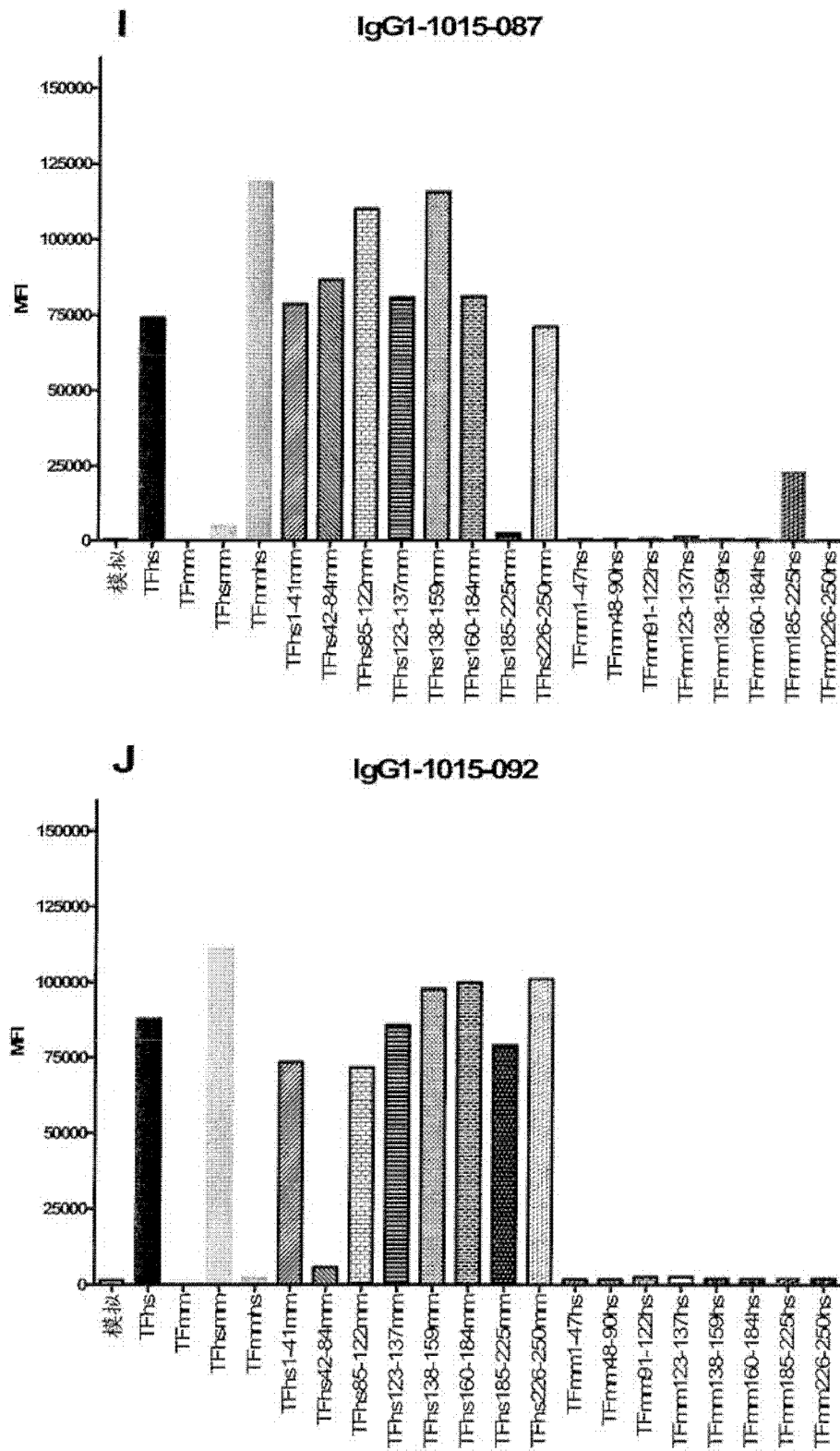


图 18(续)

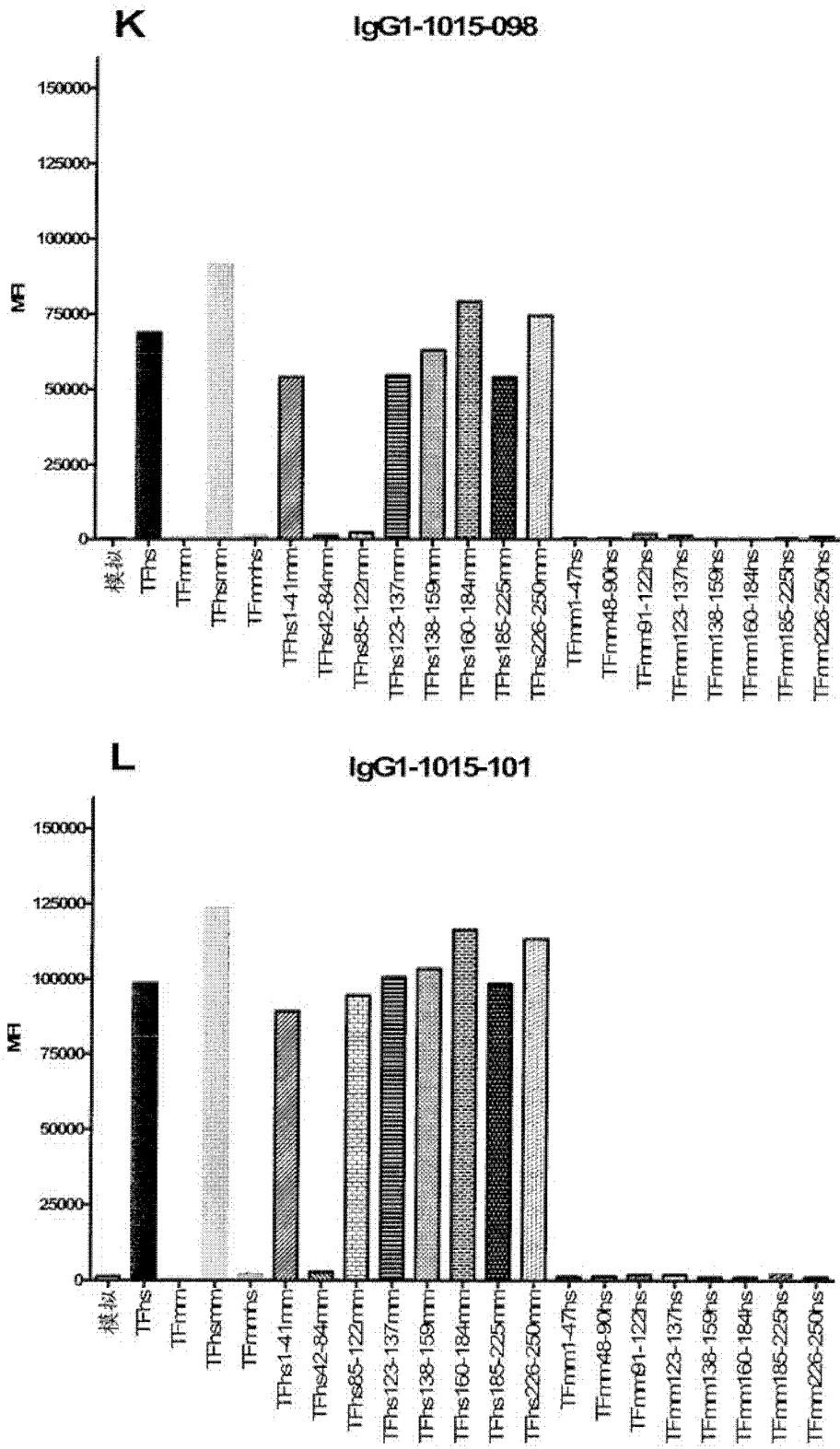


图 18(续)

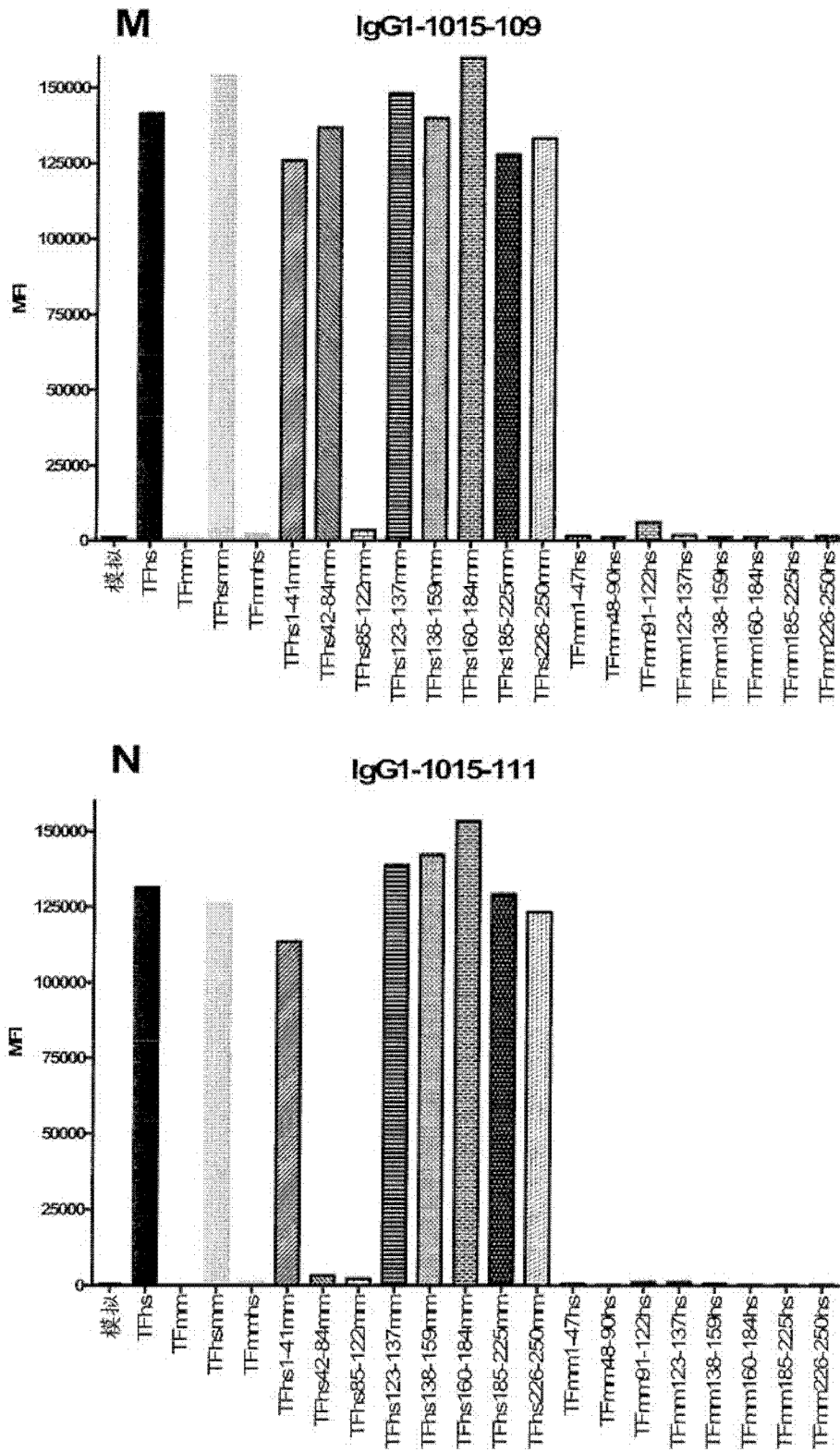


图 18(续)

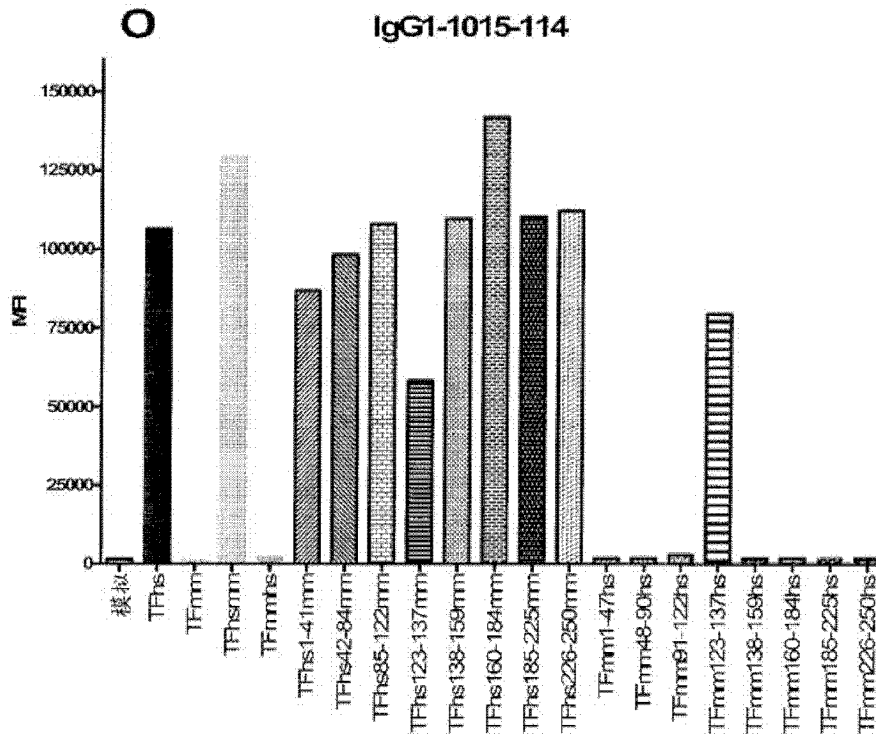


图 18. 抗 TF 人单抗对 HEK293F 细胞上表达的 TF 改组构建体的结合所示为抗 TF 人单抗对 HEK293F 细胞上表达的不同 TF 改组构建体的结合情况,通过 FACS 测定。每个组显示来自一个主要克隆的数据。x 轴示出了不同的构建体,模拟, TFhs, TFmm, TFhsmm, TFmmhs, TFhs1-41mm, TFhs42-84mm, TFhs85-122mm, TFhs123-137mm, TFhs138-159mm, TFhs160-184mm, TFhs185-225mm, TFhs226-250mm, TFmm1-47hs, TFmm48-90hs, TFmm91-122hs, TFmm123-137hs, TFmm138-159hs, TFmm160-184hs, TFmm185-225hs, T Fmm226-250hs。

图 18(续)

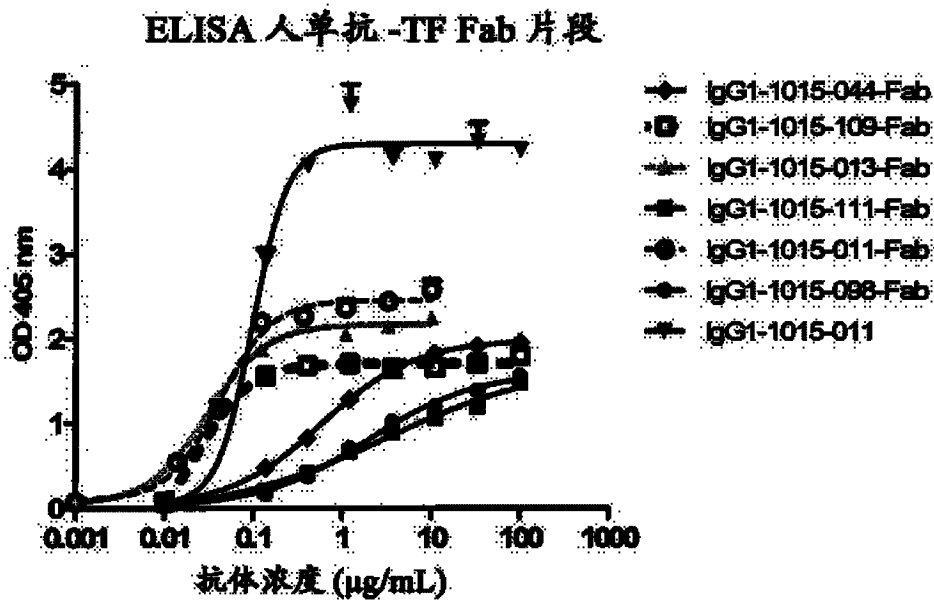


图 19. 人单抗-TF Fab 片段对 TF 的胞外域的结合,通过 ELISA 测定

图 19

对 BxPC3 的 FACS

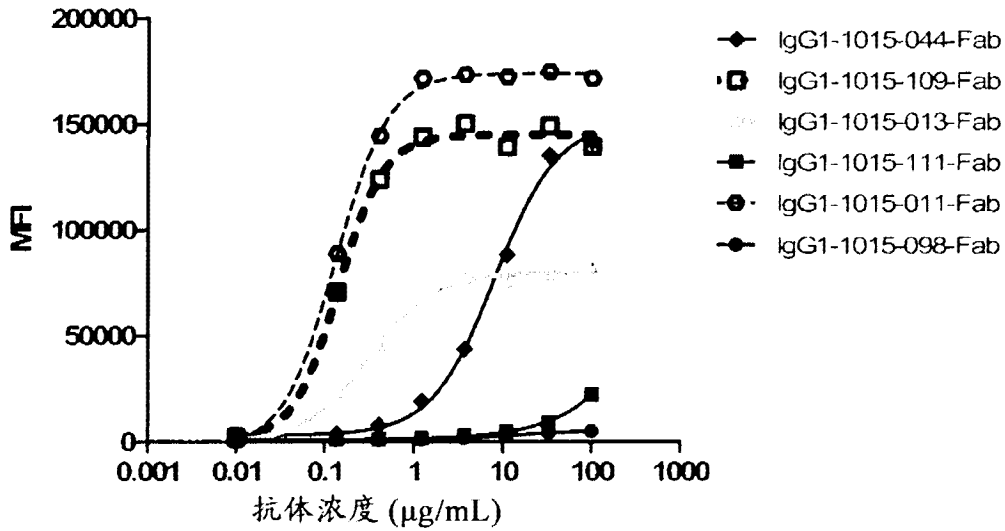


图 22. 人单抗 -TF Fab 片段对细胞 TF 的结合,通过对 BxPC3 细胞的 FACS 测定

图 20

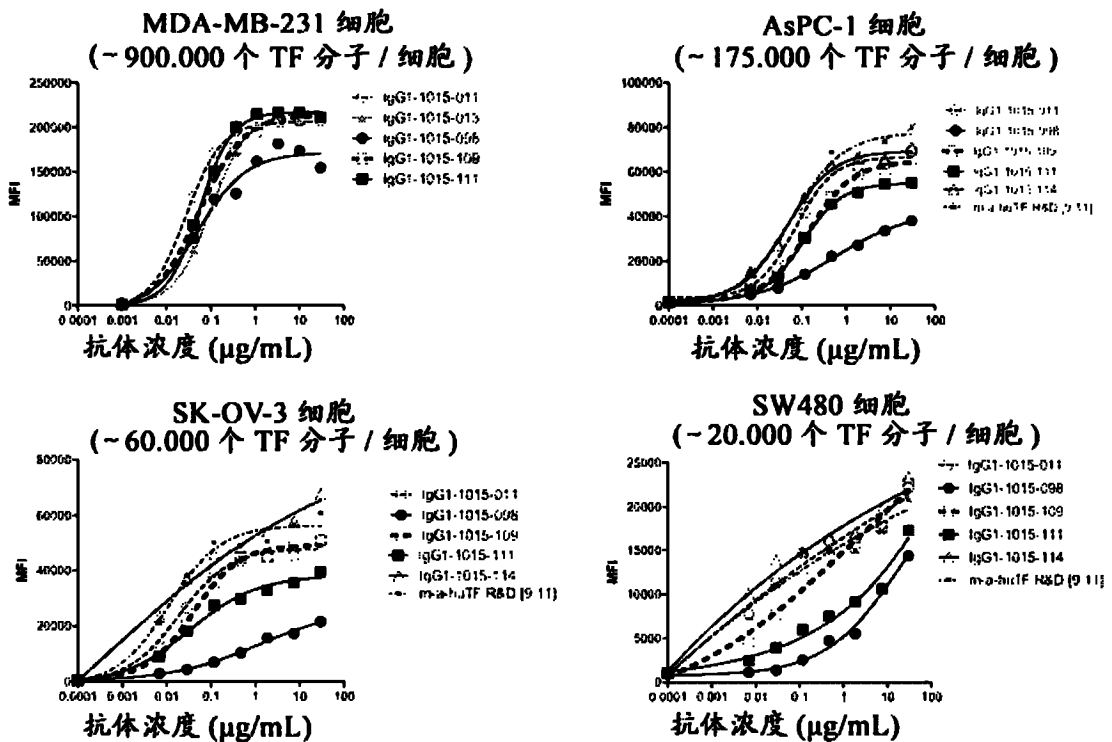


图 21. 抗 TF 人 Mab 的结合曲线依赖于表达的 TF 分子数通过 FACS 测定了抗 TF 人单抗对表达不同水平的 TF 的细胞系的结合。

图 21