(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102300876 A
(43)申请公布日 2011.12.28

(21)申请号 200980155520.7
(22)申请日 2009.12.18
(30)优先权数据
08172522.8 2008.12.22 EP
(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.07.27
(86)PCT申请的申请数据
PCT/EP2009/067566 2009.12.18
(87)PCT申请的公布数据
WO2010/072687 EN 2010.07.01
(71)申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司
地址 丹麦鲍斯韦
(72)发明人 I. 希尔登 J.T. 克劳森
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 郭文洁
(51)Int.Cl.
C07K 16/38(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 19 页
序列表 9 页 附图 4 页

(54)发明名称

针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的抗体

(57)摘要

本发明涉及特异性地结合组织因子途径抑制剂(TFPI)并减少(a)人FVIII-缺乏的血浆和/或(b)人全血的凝固时间的抗体。这种抗体可以用于治疗出血障碍和刺激血液凝固。

CN 102300876 A

1. 一种抗体，其特异性地结合组织因子途径抑制剂 (TFPI)，并减少 (a) 人 FVIII- 缺乏的血浆和 / 或 (b) 人全血的凝固时间，其中所述抗体包含 ：

(a) SEQ ID NO: 3 的轻链可变区氨基酸序列 ；

(b) 保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的至少 7 个氨基酸的片段 ；或

(c) 与 (a) 的序列具有至少 70% 氨基酸序列同一性并保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的变体。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中所述抗体包含一个或多个选自下述的序列 ：

(a) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 24-39 ；

(b) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 55-61 ；和

(c) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 94-102。

3. 一种抗体，其特异性地结合组织因子途径抑制剂 (TFPI)，并减少 (a) 人 FVIII- 缺乏的血浆和 / 或 (b) 人全血的凝固时间，其中所述抗体包含 ：

(a) SEQ ID NO: 6 的重链可变区氨基酸序列 ；

(b) 保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的至少 7 个氨基酸的片段 ；或

(c) 与 (a) 的序列具有至少 70% 氨基酸序列同一性并保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的变体。

4. 根据权利要求 2 所述的抗体，其中所述抗体包含一个或多个选自下述的序列 ：

(a) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 31-35 ；

(b) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 50-65 ；和

(c) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 98-107。

5. 一种抗体，其特异性地结合组织因子途径抑制剂 (TFPI)，并减少 (a) 人 FVIII- 缺乏的血浆和 / 或 (b) 人全血的凝固时间，其中所述抗体包含 ：(i) 如权利要求 1 或 2 中定义的氨基酸序列和 (ii) 如权利要求 3 或 4 中定义的氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体，其包含 SEQ ID NO: 3 的轻链可变区和 SEQ ID NO: 6 的重链可变区。

7. 一种抗体，其特异性地结合组织因子途径抑制剂 (TFPI)，并减少 (a) 人 FVIII- 缺乏的血浆和 / 或 (b) 人全血的凝固时间，其结合与如权利要求 1-6 中任一项中定义的抗体结合的相同的表位。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体，其与根据权利要求 6 所述的抗体竞争结合 TFPI。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体，其在体内减少凝固时间，而不显著降低血小板水平。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体，其是单克隆抗体。

11. 一种多核苷酸，其编码根据前述权利要求中任一项所述的抗体。

12. 根据权利要求 11 所述的多核苷酸，其包含选自 SEQ ID NO: 2、4、5 和 7 的序列。

13. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 1-10 中任一项所述的抗体或根据权利要求 11 或 120 所述的多核苷酸和药学上可接受的载体或稀释剂。

14. 根据权利要求 1-10 中任一项所述的抗体、根据权利要求 11 或 12 所述的多核苷酸或根据权利要求 13 所述的组合物，其用于 ：(a) 治疗或预防出血障碍或 (b) 刺激血液凝固。

针对组织因子途径抑制剂（TFPI）的抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及特异性地结合组织因子途径抑制剂（TFPI）的抗体。

背景技术

[0002] 血管壁损伤会将组织因子（TF）暴露于血液循环，TF 在携带 TF 的细胞的表面上与因子 VII/ 活化的因子 VII（FVII/FVIIa）形成复合物。这导致因子 X（FX）向 Fxa 的活化，所述 Fxa 与 Fva 一起产生有限量的凝血酶（FIIa）。小量凝血酶会活化血小板，这导致磷脂的表面暴露，所述表面暴露会支持由 FVIIIa/FIXa 组成的 tenase 复合物的结合。

[0003] 所述 tenase 复合物产生大量的 Fxa，所述 Fxa 随后促进全凝血酶爆发（burst）。机械上强的纤维蛋白结构的形成和止血塞的稳定化需要全凝血酶爆发。FVIII 或 FIX 在血友病患者中缺失或以低水平存在，且由于 tenase 活性的缺失，产生 Fxa 的能力较低，且不足以支持凝固的传播期（propagation phase）。相反，TF- 介导的开始期（initiation phase）不依赖于 tenase 复合物的形成。但是，在最初的 FXa 产生后不久，TF- 途径被血浆抑制剂阻断。

[0004] 通过中和 Fxa 的催化活性，并通过在 Fxa 存在下对 TF-FVIIa 复合物的抑制，组织因子途径抑制剂（TFPI）会下调正在进行的凝固。TFPI 抑制在细胞表面上的 TF/FVIIa/FXa 复合物，或者抑制释放的 Fxa（继之为 FVIIa/TF 抑制）。

发明内容

[0005] 发明人已经鉴定出特异性地结合 TFPI 并从而调节它的活性的抗体。本发明涉及这些抗体和从这些抗体衍生出的或具有与这些抗体类似的结合性质的其它有关的抗体。

[0006] 因此，本发明涉及这样的抗体，其特异性地结合组织因子途径抑制剂（TFPI），并减少 (a) 人 FVIII- 缺乏的血浆和 / 或 (b) 人全血的凝固时间。

[0007] 优选的抗体包含 SEQ ID NO: 3 的轻链可变区和 SEQ ID NO: 6 的重链可变区。

[0008] 本发明也提供了编码本发明抗体的多核苷酸，诸如编码本发明的抗体轻链和 / 或抗体重链的多核苷酸。

[0009] 本发明也提供了药物组合物，其包含本发明的抗体或多核苷酸和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0010] 还提供本发明的抗体、多核苷酸和组合物用于：(a) 治疗或预防出血障碍，或 (b) 刺激血液凝固。也就是说，本发明提供了 (a) 治疗或预防出血障碍的方法，或 (b) 刺激血液凝固的方法，所述方法包括给有此需要的患者施用治疗或预防有效量的本发明的抗体、多核苷酸或组合物。

附图说明

[0011] 图 A 和 B 显示了在用对照 IgG（血友病）或抗 -TFPI 抗体 TFPI-3F18A2 (3F18) 治疗后在暂时患血友病的兔中测得的表皮出血时间和血液损失。

[0012] 图 2 显示了抗体 TFPI-3F18A4B1 的 VL (图 2A)和 VH (图 2B)序列的核苷酸序列和翻译的多肽序列。

[0013] 图 3 显示了 3F18 抗体的 VL (A) 和 VH (B) 的氨基酸序列。根据 Kabat，显示在序列上面的编号。在 Kabat 编号中，用粗体带有下划线的文字突出与 CDR 环对应的位置。

[0014] 图 4 显示了 TFPI1 的序列。用粗体显示 Kunitz 结构域 :TFPI1 Kunitz 结构域 1 = 氨基酸 26-76 ;TFPI1 Kunitz 结构域 2 = 氨基酸 97-147 ;TFPI1 Kunitz 结构域 3 = 氨基酸 188-238。用斜体显示 TFPI1 的 C- 端部分氨基酸 240-276。

[0015] 图 5 显示了在用抗 -FVIII 抗体、抗 -TFPI- 抗体刺激后、并随后取血的血小板数目。这在对照血友病模型中和在有本文所述的抗 -TFPI 抗体 3F18 存在下进行。

[0016] 序列表简述

SEQ ID NO: 1 给出了人 TFPI1 的氨基酸序列。

[0017] SEQ ID NO 2-4 给出了 TFPI-3F18A4B1 单克隆抗体的轻链可变结构域 (VL) 的多核苷酸（编码和互补体）和多肽序列。

[0018] SEQ ID NO 5-7 给出了 TFPI-3F18A4B1 单克隆抗体的重链可变结构域 (VH) 的多核苷酸（编码和互补体）和多肽序列。

[0019] SEQ ID NO: 8给出了用于重链可变结构域扩增的反向引物的序列，且SEQ ID NO: 9 给出了用于轻链扩增的反向引物的序列。

具体实施方式

[0020] 本发明涉及结合 TFPI 的抗体。所述抗体优选地特异性地结合 TFPI，即它们结合 TFPI，但是它们不结合或以较低的亲和力结合其它分子。具体地，本发明涉及结合 TFPI 并调节它的活性的抗体。本发明的抗体因而可以具有缩短凝固时间的能力。例如，本发明的抗体可以具有缩短人 FVIII- 缺乏的血浆的凝固时间或减少凝固所需时间（通过人全血的凝血弹性描记术 (TEG) 分析）的能力。本发明也涉及这种抗体的应用，诸如治疗和药物用途。

[0021] 本文使用的术语 TFPI 包括 TFPI 的任意天然存在形式，其可以源自任意合适的生物体。例如，用于本文所述用途的 TFPI 可以是哺乳动物 TFPI，诸如人、小鼠、大鼠、灵长类动物、牛、羊或猪 TFPI。优选地，所述 TFPI 是人 TFPI。所述 TFPI 可以是 TFPI 的成熟形式，诸如已经在合适的细胞内经历翻译后加工的 TFPI 蛋白。这样的成熟的 TFPI 蛋白可以例如被糖基化。所述 TFPI 可以是全长 TFPI 蛋白。术语 TFPI 也包括这样的 TFPI 分子的变体、同种型和其它同系物。变体 TFPI 分子通常特征在于具有与天然存在的 TFPI 相同类型的活性，诸如转换中和 FXa 的催化活性的能力，或抑制 TF-FVIIa/FXa 的复合物的能力。

[0022] 本发明抗体具有结合 TFPI 的能力。优选地，本发明抗体会特异性地结合 TFPI。也就是说，与它结合另一种分子的亲和力相比，本发明抗体优选地以更大的结合亲和力结合 TFPI。本发明的抗体可以具有结合或特异性地结合本文所述的 TFPI 分子的能力，诸如本文所述的任意靶分子。

[0023] 术语“结合活性”和“结合亲和力”意在表示抗体分子的结合或不结合靶物的趋势。通过测定抗体和它的靶物的解离常数 (Kd)，可以定量结合亲和力。类似地，与相对于抗体和另一种非靶分子的解离常数相比，根据抗体对它的靶物的比较解离常数 (Kd)，可以确定抗

体结合它的靶物的特异性。

[0024] 通常，抗体相对于靶物的 Kd 为相对于其它非靶分子（诸如无关物质或在环境中的伴随物质）的 Kd 的 1/2、优选 1/5、更优选 1/10。更优选地，所述 Kd 为相对于其它非靶分子的 Kd 的 1/50，甚至更优选地为 1/100，更优选地为 1/200。

[0025] 通过众所周知的方法，可以直接地测定该解离常数的值，且可以通过下述方法甚至计算复合混合物的该解离常数的值：诸如在例如Caceci 等人 (Byte 9:340-362, 1984) 所述的方法。例如，使用双滤器硝酸纤维素滤器结合试验，诸如 Wong & Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993) 所公开的试验，可以建立 Kd。用于评价诸如抗体等配体与靶物的结合能力的其它标准试验是本领域已知的，包括例如 ELISA、蛋白印迹、RIA 和流式细胞术分析。通过本领域已知的标准试验，诸如通过 Biacore™ 系统分析，也可以评估抗体的结合动力学（*例如*，结合亲和力）。

[0026] 可以进行竞争结合试验，其中将所述抗体对靶物的结合和该靶物的另一种已知配体（诸如另一种抗体）对该靶物的结合相对比。发生 50% 抑制时的浓度称作 Ki。在理想条件下，Ki 等同于 Kd。Ki 值绝不会小于 Kd，所以可以方便地用 Ki 的测量替代，以提供 Kd 的上限。

[0027] 本发明抗体的优选的 Kd（或 Ki）值可以是至少 1 x 10^{-11}M、至少 1 x 10^{-10}M、至少 1 x 10^{-9}M 或 1 x 10^{-8}M。本发明抗体对于它的靶物可以具有 1 x 10^{-7}M 或更小、1 x 10^{-8}M 或更小或 1 x 10^{-9}M 或更小的 Kd （或 Ki）。

[0028] 特异性地结合它的靶物的抗体可以以高亲和力（诸如上面讨论的 Kd （或 Ki））结合它的靶物，且可以以更低的亲和力结合其它的非靶分子。例如，所述抗体可以以 1 x 10^{-6}M 或更大、更优选 1 x 10^{-5} M 或更大、更优选 1 x 10^{-4} M 或更大、更优选 1 x 10^{-3} M 或更大、甚至更优选 1 x 10^{-2} M 或更大的 Kd （或 Ki）结合非靶分子。与其结合其它非靶分子的亲和力相比，本发明抗体优选地能以至少 2- 倍、10- 倍、50- 倍、100- 倍或更大的亲和力结合它的靶物。

[0029] 所述靶分子可以是本文所述的任意 TFPI 分子，诸如天然存在的 TFPI 分子、完全成熟的 TFPI 分子或全长 TFPI 分子。优选的 TFPI 分子是完全成熟的、天然存在的、全长哺乳动物 TFPI 分子。例如，所述 TFPI 分子可以包含本文所述的 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列或其片段或其它变体，或由其组成。

[0030] 所述靶分子可以是 TFPI 分子的变体，诸如 TFPI 分子的片段。例如，所述靶分子可以是 TFPI 的片段或其它变体，其维持抗体结合的适合的表位。例如，所述靶分子可以是 TFPI 的片段或其它变体，其保留本文所述的表位。所述靶分子可以包含这样的表位。

[0031] 在一个实施方案中，所述靶分子是全长 TFPI 分子。所述全长 TFPI 分子可以包含本文所述的第一、第二和第三 Kunitz 结构域。所述全长 TFPI 分子可以包含本文所述的第一、第二和第三 Kunitz 结构域以及本文所述的羧端区域。所述全长 TFPI 分子可以是天然存在的 TFPI 分子，诸如从 TFPI 基因表达的或由表达 TFPI 的细胞分泌的全长 TFPI 多肽。所述全长 TFPI 分子可以是天然存在的 TFPI 分子，发现其以游离形式在血浆中循环。所述全长 TFPI 分子不是截短的 TFPI 分子，诸如本文所述的天然存在的截短的 TFPI 分子。

[0032] 在一个实施方案中，所述靶分子是截短的 TFPI 分子。例如，所述截短的 TFPI 分子可以包含羧基端截短。例如，TFPI 的许多天然存在的截短形式是已知的。这些可以包括

TFPI 的羧基端部分的一部分或全部的截短。它们可以进一步包括 Kunitz 结构域中的一个或多个结构域的一部分或全部的截短。例如，TFPI 的截短形式可以包括羧基端部分和第三 Kunitz 结构域的一部分或全部的删除。

[0033] 当希望抗体针对 TFPI 的特定截短形式（诸如天然存在的截短的 TFPI）时，截短的 TFPI 优选地用作靶分子。例如，一种天然存在的 TFPI 截短形式仅包含全长 TFPI 分子的氨基酸 1-161（在本文中称作 TFPI (1-161)）。TFPI (1-161) 是 TFPI 的一种活性形式，其具有与全长分子相比降低的活性。TFPI (1-161) 在结构上不同于全长 TFPI，针对 TFPI (1-161) 作为靶分子产生的抗体因此可以不同于针对全长 TFPI 产生的抗体。

[0034] 在一个实施方案中，所述靶分子是 TFPI 的天然存在形式。这可以以其中它存在于体内的形式使用。例如，所述靶分子可以是上面讨论的全长天然存在的 TFPI。所述靶分子可以是上面讨论的截短的天然存在的 TFPI。所述靶分子可以是以它在体内存在于血浆中的形式的 TFPI。所述靶分子可以是这样的 TFPI，其以在体内存在于血浆中相同的方式结合脂蛋白。所述靶分子可以是这样的 TFPI，其以与在体内发生的相同方式结合细胞，诸如结合内皮细胞的 TFPI。本发明的抗体可以结合 TFPI 的这些天然存在形式中的任意一种或多种。本发明的抗体可以能够结合 TFPI 的所有这些天然存在形式，或可以能够辨别这些不同形式，结合某些形式，但是不结合其它形式。

[0035] 所述靶分子可以是或可以包含 TFPI 的 Kunitz 结构域。这样的靶分子可以包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 26-76 或来自另一种 TFPI 多肽的等效 Kunitz 结构域 1 区域。这样的靶分子可以包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 97-147 或 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 91-150 或来自另一种 TFPI 多肽的等效 Kunitz 结构域 2 区域。这样的靶分子可以包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 188-138 或来自另一种 TFPI 多肽的等效 Kunitz 结构域 3 区域。所述靶分子可以是或可以包含 TFPI 的 Kunitz 结构域的片段。例如，所述靶分子可以包含来自 Kunitz 结构域的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个氨基酸。

[0036] 所述靶分子可以是或可以包含 TFPI 的羧基端部分。TFPI 的羧基端部分可以定义为 TFPI 的位于蛋白的第三 Kunitz 结构域和 C 端之间的氨基酸序列部分。这样的靶分子可以包含 SEQ ID NO: 1 的氨基酸 240-276 或来自另一种 TFPI 多肽的等效羧基端区域。所述靶分子可以是或可以包含 TFPI 的羧基端部分的片段。例如，所述靶分子可以包含来自 TFPI 的羧基端部分的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个氨基酸。

[0037] 所述靶分子可以包含 TFPI 或 TFPI 的特定区域（诸如 TFPI 的特定 Kunitz 结构域或 C 端部分）的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个表面可及的残基（surface accessible residue）。表面可接近的残基是具有超过 40% 相对可及性（relative accessibility）的残基。

[0038] 例如，对于 TFPI1 （参见 SEQ ID NO: 1）的 Kunitz 2 结构域，下述氨基酸具有超过 40% 相对可达性：94-95、98、100-110、118-121、123-124、131、134、138-142 和 144-145。所述靶分子可以包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个，诸如包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个的 TFPI 片段。对于 TFPI1 （参见 SEQ ID NO: 1）的 Kunitz 1 结构域，预期下述氨基酸具有超过 40% 相对可及性：23-24、27、28-41、47-50、

52-53、60-65、67-71 和 73-74。所述靶分子可以包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个，诸如包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个的 TFPI 片段。对于 TFPI1 （参见 SEQ ID NO: 1）的 Kunitz 3 结构域，预期下述氨基酸具有超过 40% 相对可及性：186-187、190、192-208、213、215-220、225-228、230-234 和 236-237。所述靶分子可以包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个，诸如包含这些残基中的 5 个或更多个、8 个或更多个、10 个或更多个、12 个或更多个、或 15 个或更多个的 TFPI 片段。

[0039] 所述靶分子可以包含来自 TFPI 的已知表位。所述抗体因而可以结合与本发明的另一种已知抗体相同的表位。

[0040] 本文使用的术语“表位”通常表示被诸如抗体等免疫受体识别的靶抗原上的部位。优选地，它是源自蛋白或作为蛋白的一部分的短肽。但是，该术语也意在包括具有糖肽和碳水化合物表位的肽。单个抗原性分子（诸如本文所述的靶蛋白）可以包含几个不同的表位。从肽的氨基酸和对应 DNA 序列的知识，以及从特定氨基酸的性质（例如，大小、电荷等）和密码子字典，无需过多实验，可以鉴定出表位。参见，例如，Ivan Roitt, Essential Immunology, 1988; Janis Kuby, Immunology, 1992 例如，第 79-81 页。

[0041] 通过常规方法，可以鉴定表位的位置。例如，通过评估抗体结合不同片段或变体 TFPI 多肽的能力，可以确定表位的大体位置。使用常规方法，诸如在实施例中所述的方法，还可以确定在 TFPI 内与抗体接触的具体氨基酸。例如，可以组合抗体和靶分子，且可以使抗体 / 靶物复合物结晶。可以确定复合物的晶体结构，并用于鉴定抗体和它的靶物之间的相互作用的特异位点。

[0042] 本发明的抗体可以结合与本发明的另一种抗体相同的表位或区域。例如，在已知本发明抗体的情况下，可以鉴定本发明的其它抗体，这通过将它们对 TFPI 的结合与已知抗体对 TFPI 的结合进行对比来进行。本发明的抗体可以结合与本文所述的 3F18 抗体相同的表位或区域。

[0043] 本发明的抗体可以具有与本发明的另一种抗体交叉竞争结合 TFPI 或本文所述的另一种适当靶物的能力。例如，本发明的抗体可以与本文所述的 3F18 抗体交叉竞争结合 TFPI 或被 3F18 抗体结合的 TFPI 的适当片段或变体，诸如本文所述的靶分子。基于它们在标准结合试验中与本发明的已知抗体交叉竞争的能力，可以鉴定这样的交叉竞争抗体。例如，BIAcore 分析、ELISA 测定或流式细胞术可以用于证实交叉竞争。这样的交叉竞争可以表明两种抗体结合相同或类似的表位。

[0044] 因此，通过下述方法，可以鉴定本发明的抗体，所述方法包括这样的结合测定，该测定评估实验抗体是否能与本发明的已知抗体交叉竞争靶分子上的结合部位。进行竞争结合测定的方法是本领域众所周知的。例如，它们可以包括：在抗体可以结合靶分子的条件下，使本发明的已知抗体和靶分子一起接触。然后可以使抗体 / 靶物复合物接触实验抗体，并可以评估实验抗体能够从抗体 / 靶物复合物中置换出本发明抗体的程度。一种替代方法可以包括：在允许抗体结合的条件下，使实验抗体接触靶分子，然后加入能结合该靶分子的本发明抗体，并评估本发明的抗体能够从抗体 / 靶物复合物中置换出实验抗体的程度。

[0045] 实验抗体的抑制本发明抗体结合靶物的能力证实：实验化合物可以与本发明抗体

竞争结合靶物，因而实验抗体结合与本发明的已知抗体相同的在 TFPI 蛋白上的表位或区域。在这样的方法中被鉴定为与本发明的已知抗体交叉竞争的实验抗体也是根据本发明的潜在抗体。实验抗体可以在与本发明的已知抗体相同的区域结合 TFPI 并与本发明的已知抗体交叉竞争的事实表明：实验抗体可以在与已知抗体相同的结合部位作为配体，且实验抗体因此可以模仿已知抗体的行为。这可以通过在本文所述的实验化合物存在下评估 TFPI 的活性来确认。

[0046] 本发明的已知抗体可以是本文所述的抗体，诸如本文所述的 TFPI-3F18A4B1 (3F18) 抗体，或保留结合 TFPI 的能力的本文所述的其任意变体或片段。

[0047] 本发明的抗体可以结合与本文所述的 3F18 抗体或保留结合 TFPI 的能力的本文所述的其任意变体或片段相同的表位。

[0048] 参照抗体对非靶物的分子的结合，可以评估特异性结合。通过对比抗体结合靶物的能力和结合另一种分子的能力，可以进行该对比。可以如上所述，在 Kd 或 Ki 的评估中进行该对比。在这样的对比中使用的其它分子可以是非靶分子的任意分子。优选地，其它分子不同于靶分子。优选地，所述靶分子不是靶分子的片段。

[0049] 本发明的抗体可以结合它的靶物，但是不结合具有下述特征的肽或蛋白：(a) 不具有与所述靶物相同的氨基酸序列，和 (b) 不是所述靶物的片段。例如，在所述靶物是 TFPI 或其特定片段或表位的情况下，本发明的抗体可以结合所述 TFPI、片段或表位，但是不结合具有下述特征的肽或蛋白：(a) 具有与所述 TFPI、片段或表位相同的序列，和 (b) 不是所述 TFPI、片段或表位的片段。

[0050] 用于测定特异性结合的其它分子可以在结构或功能上与靶物无关。例如，其它分子可以是无关物质或在环境中的伴随物质。

[0051] 用于测定特异性结合的其它分子可以是参与与靶分子相同的体内途径的另一种分子。例如，在所述靶物是 TFPI 或其片段或变体的情况下，用于对比的其它分子可以是形成血液凝固级联的一部分的蛋白。通过确保本发明的抗体具有对 TFPI 的特异性(胜过另一种这样的分子)，可以避免不希望的体内交叉反应性。

[0052] 用于对比的其它分子可以与靶分子有关。例如，在希望鉴定仅结合特定表位的抗体的情况下，用于对比的其它分子可以是其中该表位缺失或被破坏的 TFPI 分子。用于对比的其它分子因而可以是另一种靶分子，其不同于被目标抗体(the antibody in question)结合的靶分子。

[0053] 本发明的抗体可以保留结合与靶分子有关的某些分子的能力。例如，全长成熟人 TFPI 可以用作靶物，但是所述抗体也可以能够结合例如人 TFPI 的未成熟形式、人 TFPI 的片段或截短形式、结合到脂蛋白或细胞上的 TFPI 或来自其它物种的 TFPI(诸如其它哺乳动物 TFPI)。

[0054] 或者，本发明的抗体可以具有对特定靶分子的特异性。例如，它可以结合本文所述的一种靶分子，但是不结合或以明显降低的亲和力结合本文所述的不同靶分子。例如，全长成熟人 TFPI 可以用作靶物，但是结合该靶物的抗体可以不能结合或以更低亲和力结合例如人 TFPI 的未成熟形式、人 TFPI 的片段或截短形式、结合到脂蛋白或细胞上的 TFPI 或来自其它物种的 TFPI (诸如其它哺乳动物 TFPI)。

[0055] 本发明的抗体可以结合 TFPI，且在如此进行时，可以抑制 TFPI 的活性。

[0056] 如上面解释的，TFPI 会下调节血液凝固。它通过抑制 Fxa 的活性和通过在 Fxa 存在下抑制 TF-FVIIa 复合物来进行。被本发明的抗体抑制的 TFPI 的活性可以是这些活性中的任一种或其任意下游效应。例如，本发明的抗体可以导致血液凝固增加、Fxa 的存在或水平增加、或 TF-FVIIa 的活性增加。优选地，当接触 (a) 人 FVIII 缺乏的血浆或 (b) 人全血时，本发明的抗体会减少凝固时间。

[0057] TFPI 活性的测量可以包括评估 TFPI 抑制血液样品的凝固或减少凝固时间的活性。例如，这样的方法可以包括 :在会发生凝固的条件下，使 TFPI 接触包含凝血因子的血液样品或血液产品样品 (诸如血浆或血清)，并测定 TFPI 的存在是否抑制血液的凝固或减少凝固时间。然后可以将这样的样品的血液凝固水平或凝固时间与其中也存在实验抗体的等效样品相对比。如果抗体样品的凝固水平增加或凝固时间减少，这表明所述抗体正抑制该样品中的 TFPI 活性。

[0058] 通过寻找血液凝固本身或位于 TFPI 作用点下游的一种或多种凝固级联特征，可以检测血液凝固。例如，所述方法可以评估样品中 Fxa 的水平或 TF-FVIIa 的活化。

[0059] 用于评估血液凝固和凝固时间的各种其它方法是本领域众所周知的。例如，使用在实施例中所述的稀释凝血酶原时间分析，可以评估抗体对血液凝固时间的任何作用。简而言之，使人血浆接触人促凝血酶原激酶。在有和没有实验抗体存在下，测量血浆到凝块所需的时间。可以在这样的分析中使用阳性对照，诸如添加预期会减少凝固时间的 FVIIa。本发明的抗体应当能够在这样的方法中减少凝固时间。优选地，本发明的抗体应当能够以剂量依赖性的方式减少凝固时间。

[0060] 凝血弹性描记术可以用于评估全血样品中的血块形成和纤维蛋白溶解的动力学。因而，通过对比在有和没有抗体存在下血块形成所需的时间，可以在全血样品中类似地评估抗体的减少凝固时间或刺激血液凝固的能力。

[0061] 因而可以在体外进行评估本发明抗体的功能作用的方法。这样的方法优选地在人血液或血浆样品上进行。这样的样品可以是正常的人血液或血浆，或可以缺少或添加了一种或多种参与血液凝固的因子。例如，使用正常的人全血、正常的人血浆或 FVIII- 缺乏的血浆或全血，可以进行这些方法。通过使合适的血液或血浆样品接触中和抗 -FVIII 抗体，可以产生 FVIII- 缺乏的血液或血浆。

[0062] 优选地，本发明抗体能减少下述样品的凝固时间和 / 或刺激下述样品的血液凝固 :(a) 人全血、(b) 人血浆、(c) FVIII- 缺乏的人全血或 (d) FVIII- 缺乏的人血浆。

[0063] 也可以在体内进行测定抗体的刺激血液凝固或减少凝固时间的能力的方法。例如，可以在如实施例中所述的暂时患血友病的兔中进行体内研究。简而言之，通过施用抗 -FVIII 抗体，可使兔暂时患血友病。然后可以施用实验抗体，并评估表皮出血时间和 / 或血小板数目。在有实验抗体存在下表皮出血时间的减少指示该抗体能减少凝固时间和刺激血液凝固。具有这样的效应的抗体因此可以是本发明的抗体。

[0064] 本发明的抗体也可以不导致血小板数目的显著减少。具体地，本发明的抗体可以能减少下述样品的或在动物体内的凝固时间和 / 或刺激下述样品的或在动物体内的血液凝固而不导致血小板数目的任何显著减少 :(a) 人全血、(b) 人血浆、(c) FVIII- 缺乏的人全血或 (d) FVIII- 缺乏的人血浆。可以在与上面讨论的其它效应相同的样品或动物中，评估血小板数目，或可以单独评估。例如，可以在血液样品 (诸如从患者或实验动物得到的血

液样品）中，评估血小板数目。可以在将抗体施用给如上所述的暂时患血友病的兔以后，评估血小板数目。优选的本发明的抗体能够减少暂时患血友病的兔的表皮出血时间，而不导致血小板数目的并行减少。通过对比施用抗体之前和之后的血小板数目，或通过对比用目标抗体处理的样品或动物和没有用该抗体处理的对照样品或动物之间的血小板数目，可以评估血小板数目的变化。优选地，当进行这样的对比时，血小板数目没有差异或没有统计上显著的差异。也就是说，本发明的抗体不会造成血小板数目的任何减少。

[0065] 本文提及的术语“抗体”包括完整抗体及其任意抗原结合片段（*即*，“抗原结合部分”）或单链。抗体表示包含通过二硫键相连的至少 2 个重 (H) 链和 2 个轻 (L) 链的糖蛋白或其抗原结合部分。每个重链包含重链可变区（在本文中缩写为 VH）和重链恒定区。每个轻链包含轻链可变区（在本文中缩写为 VL）和轻链恒定区。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。VH 和 VL 区域可以进一步分成高变异性区域（称作互补性决定区 (CDR) ），所述区域内夹杂着更保守的区域（称作框架区 (FR)）。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子（包括免疫系统的不同细胞（*例如*，效应细胞）和经典补体系统的第一组分 (C1q)）的结合。

[0066] 本发明的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体。在一个实施方案中，本发明的抗体是单克隆抗体。本发明的抗体可以是嵌合抗体、CDR- 移植的抗体、人或人源化的抗体或其任一种的抗原结合部分。关于单克隆和多克隆抗体的生产，实验动物合适地是哺乳动物，诸如山羊、兔、大鼠或小鼠。

[0067] 多克隆抗体是源自不同 B 细胞系的抗体。多克隆抗体可以包含针对特定抗原的不同免疫球蛋白分子的混合物。多克隆抗体可以包含结合抗原分子内的一种或多种不同表位的不同免疫球蛋白分子的混合物。通过常规方法，诸如用目标抗原免疫适当的动物，可以生产多克隆抗体。随后，可以从该动物取出血液，并纯化 IgI 组分（fraction）。

[0068] 单克隆抗体是彼此相同且对特定表位具有单一结合特异性和亲和力的免疫球蛋白分子。通过多种技术，包括常规单克隆抗体方法，*例如* Kohler 和 Milstein (1975) *Nature*256: 495 的标准体细胞杂交技术，或 B 淋巴细胞的病毒或致癌性转化，可以生产本发明的单克隆抗体 (mAb)。优选的制备杂交瘤的动物系统是鼠系统。在小鼠中的杂交瘤生产是非常确定的步骤。免疫方法和用于融合的被免疫的脾细胞的分离技术是本领域已知的。融合配偶体 (partners)（*例如*，鼠骨髓瘤细胞）和融合步骤也是已知的。

[0069] 为了制备产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤，可以从免疫的小鼠分离脾细胞和 / 或淋巴结细胞，并与适当的永生化的细胞系（诸如小鼠骨髓瘤细胞系）融合。可以针对抗原特异性的抗体的产生来筛选得到的杂交瘤。可以将分泌抗体的杂交瘤重新铺板，再次筛选，且如果仍然是合适的 IgG 阳性的，则通过有限稀释，将该单克隆抗体亚克隆至少 2 次。然后可以在体外培养该稳定的亚克隆，以在组织培养基中生成小量抗体用于表征。

[0070] 术语抗体的“抗原结合部分”表示保留特异性地结合抗原（诸如 TFPI 或本文所述的另一种靶蛋白）的能力的一种或多种抗体片段。已经证实：抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段来实现。被包括在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段的实例包括 Fab 片段、$F(ab')_2$ 片段、Fab’ 片段、Fd 片段、Fv 片段、dAb 片段和分离的互补性决定区 (CDR)。单链抗体（诸如 scFv）和重链抗体（诸如 VHH）和骆驼抗体也意图被包括在术语抗体的“抗原结合部分”内。使用本领域技术人员已知的常规技术可以得到这些抗体片段，且可以以与完

整抗体相同的方式筛选所述片段的效用。

[0071] 通过重组方法可以制备、表达、建立或分离本发明的抗体，例如：(a) 从对于目标免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的动物（*例如*，小鼠）或由其制备的杂交瘤分离的抗体，(b) 从转化成表达目标抗体的宿主细胞(*例如*，从转染瘤)分离的抗体，(c) 从重组的、组合抗体文库分离的抗体，和 (d) 通过包含剪接免疫球蛋白基因序列至其它 DNA 序列的任意其它方法制备、表达、建立或分离的抗体。

[0072] 本发明的抗体可以是人抗体或人源化的抗体。本文使用的术语“人抗体”意在包括具有可变区的抗体，其中构架区和 CDR 区都源自人种系(germline)免疫球蛋白序列。此外，如果抗体含有恒定区，那么该恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基（例如，通过在体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变而导入的突变）。但是，本文使用的术语“人抗体”无意包括这样的抗体，其中源自另一哺乳动物物种(如小鼠)种系的 CDR 序列已经被移植到人构架序列上。

[0073] 这样的人抗体可以是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以由杂交瘤生产，所述杂交瘤包括从转基因的非人动物(例如转基因小鼠)得到的 B 细胞，其具有包含与永生化细胞融合的人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0074] 通过体外免疫人淋巴细胞，并随后用 EB 病毒转化淋巴细胞，可以制备人抗体。

[0075] 术语“人抗体衍生物”表示人抗体的任意修饰形式，例如，抗体和另一种试剂或抗体的缀合物。

[0076] 术语“人源化的抗体”意在表示这样的抗体，其中源自另一哺乳动物物种(如小鼠)种系的 CDR 序列已经被移植到人框架序列上。在人框架序列内可以进行另外的框架区修饰。

[0077] 可以测试本发明的抗体对靶蛋白的结合，例如，通过标准的 ELISA 或蛋白印迹法来进行。ELISA 测定也可以用于筛选表现出与靶蛋白具有正反应性的杂交瘤。通过监测抗体对表达靶蛋白的细胞的结合，例如通过流式细胞术，也可以测定抗体的结合特异性。

[0078] 通过测定抗体是否结合其它蛋白，可以进一步研究本发明抗体对靶蛋白的特异性。例如，在希望产生特异性地结合 TFPI 或 TFPI 的特定部分(例如表位)的抗体的情况下，通过测定抗体是否也结合缺少目标部分的其它分子或 TFPI 的修饰形式，可以评估抗体的特异性。

[0079] 如上面解释的，本发明的抗体可以改变 TFPI 的活性。因而可以进一步测试具有需要的结合性质的抗体，以确定它们对 TFPI 活性的影响。因而，可以使用方法来鉴定合适的抗体，所述抗体能够结合 TFPI，且能够改变、尤其是降低它的活性。

[0080] 一旦已经鉴定和选择出合适的抗体，通过本领域已知的方法，可以鉴定抗体的氨基酸序列。使用简并引物，可以克隆编码抗体的基因。通过常规方法，可以重组地生产抗体。

[0081] “多肽”在本文中以它的最广泛的含义使用，表示 2 个或更多个亚基氨基酸、氨基酸类似物或其它肽拟似物的化合物。术语“多肽”因而包括短肽序列以及更长的多肽和蛋白。本文使用的术语“氨基酸”表示天然的和 / 或非天然的或合成的氨基酸，包括甘氨酸和 D 或 L 光学异构体和氨基酸类似物和肽拟似物。

[0082] 本发明人已经鉴定出在实施例中所述的抗体。该抗体在本文中称作

TFPI-3F18A4B1 或 3F18。本发明包括该抗体及其保留该抗体的一种或多种活性的变体和片段。这些抗体的活性包括 :结合 TFPI 的能力、结合 TFPI 分子中的特定位置的能力和抑制 TFPI 活性的能力,任选地不会导致血小板数目的下降。

[0083] 任一种这样的抗体的合适的片段或变体会保留结合 TFPI 的能力。优选地保留特异性地结合 TFPI 的能力。优选地保留特异性地结合与它的来源抗体 (3F18) 结合的相同的 TFPI 分子表位或区域的能力。优选地保留它的来源抗体的一种或多种另外功能,诸如抑制 TFPI 活性的能力或减少凝固时间的能力,任选地不会导致血小板数目的下降。

[0084] 可以如下制备根据本发明的多肽或抗体“片段”:通过截短,例如通过从多肽的 N 和 / 或 C- 端末端去除一个或多个氨基酸。以此方式,可以从 N 和 / 或 C 端去除多达 10、多达 20、多达 30、多达 40 或更多个氨基酸。通过一个或多个内部缺失,也可以产生片段。

[0085] 本发明抗体可以是或可以包含 3F18 抗体的片段或其变体。本发明的抗体可以是或可以包含如上面进一步讨论的该抗体的抗原结合部分或其变体。例如,本发明的抗体可以是该抗体的 Fab 片段或其变体,或可以是源自该抗体的单链抗体或其变体。

[0086] 3F18 抗体的 VL 和 VH 链的氨基酸序列分别在 SEQ ID NO: 3 和 6 中给出。

[0087] 本发明的抗体可以包含在 SEQ ID NO: 3 中所示的 3F18 VL 氨基酸序列或其片段或变体。抗体可以额外地或替换地包含本文所述的 SEQ ID NO: 6 中所示的 3F18 VL 氨基酸序列或其片段或变体。

[0088] 本发明的抗体可以包含在图 2 中所示的 VL 或 VH 氨基酸序列之一的片段。例如,本发明的抗体可以包含来自 SEQ ID NO 3 或 6 的至少 7、至少 8、至少 9、至少 10、至少 12、至少 15、至少 18、至少 20 或至少 25 个连续氨基酸的片段。这样的片段优选地保留一种或多种上面讨论的功能,诸如结合 TFPI 的能力。

[0089] 任一个这样的 VH 或 VL 序列的合适的片段或变体会保留结合 TFPI 的能力。优选地保留特异性地结合 TFPI 的能力。优选地保留特异性地结合与它的来源抗体 (3F18) 结合的相同的 TFPI 分子表位或区域的能力。优选地保留它的来源抗体的一种或多种另外功能,诸如抑制 TFPI 活性的能力或减少凝固时间的能力。

[0090] 本发明的抗体可以包含来自本文鉴定出的 3 种具体抗体之一的 CDR 区,诸如来自 SEQ ID NO: 3 或 6 的 CDR 区。鉴定 CDR 区的方法是本领域已知的。可以在计算机中(*in silico*)评估 CDR 的位置,例如通过根据 Kabat 分配编号。通过在抗体和它的表位之间形成的复合物的 X 射线结晶,可以实验地评估参与抗体结合的氨基酸残基的位置(在抗体分子中或在表位中)。可以评估两种分子之间的距离。例如,可以将抗体的互补位(paratope)和抗原表位鉴定为包含这样的氨基酸,所述氨基酸具有离其它分子中的重原子在 4 A 距离内的重原子。

[0091] 例如,如图 3 所示,使用 Kabat 编号,在 SEQ ID NO: 3 的氨基酸 24-39、55-61 和 94-102 处,可以鉴定出在 3F18 的轻链内的 CDR 序列。在 SEQ ID NO: 6 的氨基酸 31-35、50-65 和 98-107 处,可以鉴定出在 3F18 的重链内的 CDR 序列。本发明的抗体可以包含在图 3 中所示的任意一个或多个 CDR 序列。例如,本发明的抗体可以包含 1、2 或所有 3 段在 SEQ ID NO: 3 的残基 24-39、55-61 和 94-102 处所示的氨基酸序列。本发明的抗体可以可选地或另外地包含 1、2 或所有 3 段在 SEQ ID NO: 6 的残基 31-35、50-65 和 98-107 处所示的氨基酸序列。本发明的抗体可以包含所有 6 段在 SEQ ID NO: 3 的残基 24-39、55-61 和

94-102 和在 SEQ ID NO: 6 的残基 31-35、50-65 和 98-107 处所示的氨基酸序列。

[0092] 本发明的抗体可以可选地是或可以包含这些具体序列之一的变体，诸如 3F18 抗体的变体。例如，变体可以是任一个上述氨基酸序列的置换、缺失或添加变体。

[0093] 变体抗体可以包含来自上面讨论的具体序列和片段的 1、2、3、4、5、多达 10、多达 20、多达 30 或更多个氨基酸置换和 / 或缺失。“缺失” 变体可以包含单个氨基酸的缺失、小氨基酸组（诸如 2、3、4 或 5 个氨基酸）的缺失或更大的氨基酸区域的缺失，诸如特定氨基酸结构域或其它特征的缺失。“置换”变体优选地包含用相同数目的氨基酸替换一个或多个氨基酸，和进行保守氨基酸置换。例如，可以将一个氨基酸置换为一个具有类似性质的替代氨基酸，例如，另一个碱性氨基酸、另一个酸性氨基酸、另一个中性氨基酸、另一个带电荷的氨基酸、另一个亲水氨基酸、另一个疏水氨基酸、另一个极性氨基酸、另一个芳族氨基酸或另一个脂族氨基酸。可以用于选择合适的取代基的 20 种主要氨基酸的某些性质如下：

Ala	脂族、疏水的、中性的	Met	疏水的、中性的
Cys	极性的、疏水的、中性的	Asn	极性的、亲水的、中性的
Asp	极性的、亲水的、带电荷的(-)	Pro	疏水的、中性的
Glu	极性的、亲水的、带电荷的(-)	Gln	极性的、亲水的、中性的
Phe	芳族、疏水的、中性的	Arg	极性的、亲水的、带电荷的(+)
Gly	脂族、中性的	Ser	极性的、亲水的、中性的
His	芳族、极性的、亲水的，带电荷的(+)	Thr	极性的、亲水的、中性的
Ile	脂族、疏水的、中性的	Val	脂族、疏水的、中性的
Lys	极性的、亲水的、带电荷的(+)	Trp	芳族、疏水的、中性的
Leu	脂族、疏水的、中性的	Tyr	芳族、极性的、疏水的

。

[0094] 优选的“衍生物”或“变体”包括这样的“衍生物”或“变体”，其中出现在序列中的氨基酸不是天然存在的氨基酸，而是它们的结构类似物。也可以衍生化或修饰（例如标记）在序列中使用的氨基酸，只要抗体的功能不会显著地受到不利影响即可。

[0095] 在抗体合成过程中，或通过产生后修饰，或当使用定位诱变、随机诱变或核酸的酶切割和 / 或连接的已知技术产生重组形式的抗体时，可以制备上述的衍生物和变体。

[0096] 优选地，根据本发明的变体抗体具有与 SEQ ID NO 3 或 6 具有超过 60% 或超过 70%、例如 75 或 80%、优选超过 85%、例如超过 90 或 95% 氨基酸同一性的氨基酸序列或其片段。可以在有关的 SEQ ID NO 序列的全长上或在该序列的一部分上（诸如 20、30、50、75、100、150、200 或更多个氨基酸上，取决于全长多肽的大小）观察该氨基酸同一性水平。

[0097] 与氨基酸序列相关，“序列同一性”表示当使用具有下述参数的 ClustalW (Thompson 等人，1994，同上）评估时具有所述值的序列：

逐对比对参数 - 方法 :准确的，矩阵 :PAM，间隙开口罚分 :10.00，间隙延伸罚分 :0.10；

多重比对参数 - 矩阵 :PAM，间隙开口罚分 :10.00，延迟的 % 同一性 :30，处罚末端间隙：开启，间隙分隔距离 :0，负矩阵 :无，间隙延伸罚分 :0.20，残基特异性的间隙罚分 :开启，亲水间隙罚分 :开启，亲水残基 :GPSNDQEKR。在特定残基处的序列同一性意在包括已经简单地衍生化的相同残基。

[0098] 本发明因而提供了具有特定 VH 和 VL 氨基酸序列及保留这些 VH 和 VL 结构域的功

能或活性的变体和片段的抗体。

[0099] 因此，本发明的抗体可以包含：

(a) SEQ ID NO: 3 的轻链可变区氨基酸序列；

(b) 保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的至少 7 个氨基酸的片段；或

(c) 与 (a) 的序列具有至少 70% 氨基酸序列同一性并保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的变体。

[0100] 本发明的抗体可以包含：

(a) SEQ ID NO: 6 的重链可变区氨基酸序列；

(b) 保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的至少 7 个氨基酸的片段；或

(c) 与 (a) 的序列具有至少 70% 氨基酸序列同一性并保留特异性地结合 TFPI 的能力的 (a) 的变体。

[0101] 本发明的抗体可以包含 SEQ ID NO: 3 的轻链可变区和 SEQ ID NO: 6 的重链可变区。

[0102] 本发明的抗体可以包含：

(a) SEQ ID NO: 3 的轻链可变区和 SEQ ID NO: 6 的重链可变区；

(b) (a) 的变体，其中重链和轻链序列之一或二者被修饰，使得它包含在 (a) 中指出的序列的至少 7 个氨基酸的片段；或

(c) (a) 或 (b) 中任一个的变体，其中重链和轻链序列之一或二者被修饰，使得它与 (a) 或 (b) 的序列具有至少 70% 氨基酸序列同一性，

其中所述抗体保留特异性地结合 TFPI 的能力。所述抗体也可以保留本文所述的本发明抗体的一种或多种额外功能或活性，诸如抑制 TFPI 的能力或缩短凝固时间的能力，任选地不会导致血小板数目的下降。

[0103] SEQ ID NO: 3 的优选片段和变体包含：(i) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 24-39；和 / 或 (ii) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 55-61；和 / 或 (iii) SEQ ID NO: 3 的氨基酸 94-102。SEQ ID NO: 6 的优选片段和变体包含：(i) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 31-35；和 / 或 (ii) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 50-65；和 / 或 (iii) SEQ ID NO: 6 的氨基酸 98-107。

[0104] 如上面解释的，本发明的抗体可以结合与本发明的另一种抗体结合的相同的表位或区域。因而可以看出：这样的抗体可以结合与本文所述的任一种具体抗体、片段和变体结合的相同的 TFPI 表位或区域。

[0105] 本发明也涉及编码本发明抗体的多核苷酸。因而，本发明的多核苷酸可以编码本文所述的任一种抗体。术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中互换地使用，表示任意长度的核苷酸 (脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物) 的聚合形式。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、信使 RNA (mRNA)、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、任意序列的分离的 DNA、任意序列的分离的 RNA、核酸探针和引物。本发明的多核苷酸可以以分离的或纯化的形式提供。

[0106] “编码”选择的多肽的核酸序列是这样的核酸分子，当置于适当调节序列的控制下时，其在体内被转录 (在 DNA 的情况下) 和翻译 (在 mRNA 的情况下) 成多肽。编码序列的边界由在 5’ (氨基) 末端的起始密码子和在 3’ (羧基) 末端的翻译终止密码子确定。为了本发明的目的，这样的核酸序列可以包括但不限于：来自病毒、原核或真核 mRNA 的 cDNA，

来自病毒或原核 DNA 或 RNA 的基因组序列，和甚至合成的 DNA 序列。转录终止序列可以位于编码序列的 3’。

[0107] 在一个实施方案中，本发明的多核苷酸包含编码上述 VH 或 VL 氨基酸序列的序列。例如，本发明的多核苷酸可以编码这样的多肽，其包含 SEQ ID No: 3 或 6 的序列或上述的它们的变体或片段。这样的多核苷酸可以包含 SEQ ID NO: 2、4、5 和 7 中任一的核酸序列，或由其组成。或者，合适的多核苷酸序列可以是这些具体多核苷酸序列之一的变体。例如，变体可以是任一上述核酸序列的置换、缺失或添加变体。变体多核苷酸可以包含来自在序列表中给出的序列的 1、2、3、4、5、多达 10、多达 20、多达 30、多达 40、多达 50、多达 75 或更多个核酸置换和 / 或缺失。

[0108] 合适的变体可以与 SEQ ID NO: 2、4、5 和 7 中的任一多核苷酸具有至少 70% 同源性。优选与其具有至少 80 或 90% 和更优选至少 95%、97% 或 99% 同源性。测量同源性的方法是本领域众所周知的，且本领域技术人员会理解 :在本上下文中，以核酸同一性为基础来计算同源性。这样的同源性可能存在于至少 15、优选至少 30、例如至少 40、60、100、200 或更多个连续核苷酸的区域上。这样的同源性可能存在于未修饰的多核苷酸序列的整个长度上。

[0109] 测量多核苷酸同源性或同一性的方法是本领域已知的。例如 UWGCG 程序包提供了 BESTFIT 程序，它可用于计算同源性（例如以它的默认设置使用）(Devereux 等人 (1984) Nucleic Acids Research 12, p387-395)。

[0110] PILEUP 和 BLAST 算法也可以用于计算同源性或比对（line up）序列（一般以它们的默认设置），例如描述在 Altschul S.F. (1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S, F 等人 (1990) J Mol Biol 215:403-10 中。

[0111] 用于执行 BLAST 分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 公开获得。该算法包括首先识别高评分序列对 (HSP)，这通过识别待查询序列中长度为 W 的短字段来实现，该字段在与数据库序列中相同长度的字段比对时，匹配或满足某种正值的阈评分 T。T 表示相邻字段评分阈 (Altschul 等人，同上）。这些最初的相邻字段命中（word hits）作为开始检索的种子，以发现含有它们的 HSP。字段命中沿每个序列的两个方向延伸，使累积比对评分可以尽量增加。在以下情形时，停止字段命中在每个方向的延伸 :由于一个或多个负评分残基比对的累积，累积比对评分为零或小于零；或到达任一序列的末端。BLAST 算法参数 W、T 和 X 决定了比对的灵敏度和速度。BLAST 程序使用默认值 :字段长度 (W) 为 11，BLOSUM62 评分矩阵（参见 Henikoff 和 Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-10919) 比对值 (B) 为 50，期望值 (E) 为 10，M ＝ 5，N ＝ 4 且两条链比较。

[0112] BLAST 算法执行两个序列之间的相似性的统计分析；参见例如，Karlin 和 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787。由 BLAST 算法提供的相似性的一个量度是最小总和概率 (P(N))，它提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间随机出现匹配的概率的指标。例如，若一个序列和另一个序列相比较时最小总和概率小于约 1、优选小于约 0.1、更优选小于约 0.01 和最优选小于约 0.001，则认为第一个序列与第二个序列类似。

[0113] 同源物可与相关多核苷酸序列存在少于 3、5、10、15、20 或更多个突变（每一突变

可以是置换、缺失或插入）的差异。这些突变可以在同源物的至少 30、例如至少 40、60 或 100 或更多个连续核苷酸的区域中测量。

[0114] 在一个实施方案中，由于遗传密码的冗余，变体序列可能不同于在序列表中给出的具体序列。DNA 代码具有 4 种基本核酸残基 (A、T、C 和 G)，并使用它们来“拼写”3 字母密码子，所述密码子代表在生物体的基因中编码的蛋白的氨基酸。沿着 DNA 分子的密码子的线性序列被翻译成由那些基因编码的蛋白中的氨基酸的线性序列。所述代码是高度简并的，61 种密码子编码 20 种天然氨基酸，且 3 种密码子代表“终止”信号。因而，大多数氨基酸由超过一种密码子编码——实际上，几种氨基酸由 4 种或更多种不同的密码子编码。本发明的变体多核苷酸因此可以编码与本发明的另一种多核苷酸编码的相同的多肽序列，但是可以具有不同的核酸序列(由于使用不同的密码子来编码相同的氨基酸)。

[0115] 可以如下制备根据本发明的多核苷酸“片段”：通过截短，例如通过从多核苷酸的一端或两端去除一个或多个核苷酸。以此方式，可以从多核苷酸的 3’ 和 / 或 5’ 末端去除多达 10、多达 20、多达 30、多达 40、多达 50、多达 75、多达 100、多达 200 或更多个氨基酸。通过一个或多个内部缺失，也可以产生片段。这样的片段可以源自 SEQ ID NO: 2、4、5 或 7 的序列，或可以源自本文所述的变体多核苷酸。优选地，这样的片段的长度是 30 至 300 个残基，例如 30-300、30-200、30-100、100-200 或 200-300 个残基。或者，本发明的片段可以是更长的序列，例如包含本发明的全长多核苷酸的至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90%。

[0116] 本发明的抗体因而可以从多核苷酸生产或以多核苷酸的形式递送，所述多核苷酸编码且能表达它。在所述抗体包含 2 个或更多个链的情况下，本发明的多核苷酸可以编码一个或多个抗体链。例如，本发明的多核苷酸可以编码抗体轻链、抗体重链或二者。可以提供 2 种多核苷酸，其中之一编码抗体轻链，另一种编码对应的抗体重链。这样的多核苷酸或多核苷酸对可以一起表达，从而生产本发明的抗体。

[0117] 根据本领域众所周知的方法，可以合成本发明的多核苷酸，所述方法例如描述在 Sambrook 等人 (1989, Molecular Cloning - a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press) 中。

[0118] 本发明的核酸分子可以以表达盒的形式提供，所述表达盒包括可操作地连接到插入的序列上的控制序列，因而允许本发明的抗体在体内表达。这些表达盒又通常提供在载体（例如，质粒或重组病毒载体）内。这样的表达盒可直接施用给宿主受试者。或者，可以将包含本发明的多核苷酸的载体施用给宿主受试者。优选地，使用遗传载体，制备和 / 或施用多核苷酸。合适的载体可以是能够携带足够量的遗传信息并允许表达本发明多肽的任意载体。

[0119] 本发明因而包括包含这样的多核苷酸序列的表达载体。在分子生物学领域中常规地构建这样的表达载体，且可以例如包括使用质粒 DNA 和适当的起始子、启动子、增强子和其它元件，例如聚腺苷酸化信号(其可能是必要的，且以正确的方向放置，以允许表达本发明的肽)。其它合适的载体是本领域技术人员显而易见的。作为这方面的其它实例，参见 Sambrook 等人。

[0120] 本发明也包括已经修饰成表达本发明抗体的细胞。这样的细胞包括瞬时的或优选稳定的高等真核细胞系(诸如哺乳动物细胞或昆虫细胞)、低等真核细胞(诸如酵母)或原核

细胞(诸如细菌细胞)。可以通过插入编码本发明抗体的载体或表达盒而修饰的细胞的特定实例包括哺乳动物 HEK293T、CHO、HeLa 和 COS 细胞。优选地,选择的细胞系是这样的细胞系,其不仅是稳定的,而且允许多肽的成熟糖基化和细胞表面表达。

[0121] 可以使用常规方法培养本发明的这种细胞系以生产本发明抗体的,或可以治疗地或预防地用于给受试者递送本发明的抗体。或者,本发明的多核苷酸、表达盒或载体可以离体地施用给来自受试者的细胞,然后使细胞返回受试者体内。

[0122] 在另一个方面,本发明提供了组合物和制剂,其包含本发明的分子,诸如本文所述的抗体、多核苷酸、载体和细胞。例如,本发明提供了药物组合物,其包含与药学上可接受的载体一起配制的一种或多种本发明的分子,诸如一种或多种本发明的抗体。

[0123] 本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理上相容的任意和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,载体适合肠胃外(例如静脉内、肌肉内或皮下)施用(例如,通过注射或输注)。取决于施用途径,所述抗体可以用材料包衣,以保护抗体免于酸和可能使抗体失活或变性的其它自然条件的作用。

[0124] 优选的药学上可接受的载体包括水性载体或稀释剂。可以用于本发明的药物组合物中的合适的水性载体的实例包括水、缓冲的水和盐水。其它载体的实例包括乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和其合适的混合物、植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。可以维持适当的流动性,例如,通过使用包衣材料(诸如卵磷脂),通过维持所需的粒度(在分散体的情况下),和通过使用表面活性剂。在许多情况下,优选地在组合物中包含等渗剂,例如,糖类、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。

[0125] 本发明的药物组合物也可以包括药学上可接受的抗氧化剂。这些组合物还可以含有佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。可以如下防止微生物的存在:通过如上的消毒程序,和通过包括不同的抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸等。还希望在组合物中包括等渗剂,诸如糖类、氯化钠等。此外,通过包括延迟吸收的试剂(诸如单硬脂酸铝和明胶),可以造成可注射药物形式的延长吸收。

[0126] 治疗组合物在生产和保存条件下通常必须是无菌的和稳定的。可以将组合物配制成溶液剂、微乳剂、脂质体或适合高药物浓度的其他有序结构。

[0127] 可以如下制备无菌注射溶液:通过将活性剂(例如抗体)以所需的量在合适的溶剂中与上面列举的一种成分或成分的组合掺和(根据需要),接着微滤除菌。通常,如下制备分散体:通过将活性剂掺入无菌载体中,所述载体含有基础分散介质和所需的来自上面列举的那些的其它成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干),其产生活性剂加上来自其之前的无菌过滤溶液的任何额外的所需成分的粉末。

[0128] 本发明的药物组合物可以包含额外的活性成分以及本发明的抗体。如上所述,本发明的组合物可以包含一种或多种本发明的抗体。它们还可以包含额外的治疗剂或预防剂。例如,在本发明的药物组合物预期用于治疗出血障碍的情况下,它可以额外地包含一种或多种预期会减轻出血障碍症状的药剂。例如,所述组合物可以包含一种或多种凝固因子。所述组合物可以包含一种或多种预期会改善患者状况的其它组分。例如,在所述组合物预期用于治疗遭受不希望的出血的患者(诸如正在接受手术的患者或遭受创伤的患者)的情况下,所述组合物可以包含一种或多种止痛剂、麻醉剂、免疫抑制剂或抗炎剂。

[0129] 包含本发明的抗体或其它组合物以及使用说明书的试剂盒也在本发明的范围内。所述试剂盒可以另外含有一种或多种额外的药剂，诸如上面讨论的额外的治疗剂或预防剂。

[0130] 本发明的抗体、其它分子和组合物具有许多体外和体内治疗效应，包括治疗和预防凝固相关障碍。例如，这些抗体和组合物可以在体外或离体地施用给培养的细胞，或施用给人受试者(例如，在体内)，以预防或治疗多种障碍。

[0131] 具体地，本发明提供了用于治疗出血障碍或用于促进血液凝固的方法，所述方法包括：给有此需要的患者施用有效量的本发明的抗体或其它分子或组合物。例如，这样的方法可以用于治疗凝固因子缺乏诸如血友病 A、血友病 B、因子 XI 缺乏、因子 VII 缺乏、血小板减少症或冯威里氏病。这样的方法可以用于治疗伴有凝固因子抑制剂存在的病症。这样的方法可以用于治疗过量出血。本发明的抗体和组合物可以用于在手术或抗凝治疗之前、过程中或之后或在创伤之后治疗患者。本文所述的抗体和组合物可以用于任一种这样的治疗中，或可以用于药物的生产中，所述药物用于任一种这样的治疗。

[0132] 本发明的抗体和组合物可以施用用于预防性 / 防止性和 / 或治疗性处理。

[0133] 在治疗性应用中，以足以治愈、减轻或部分地阻止病症或其一种或多种症状的量，将抗体或组合物施用给已经遭受上述障碍或病症的受试者。这样的治疗性处理可以导致疾病症状严重性的降低或无症状时期的频率或持续时间的增加。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效量”。例如，在治疗是用于不希望的出血的情况下，可以将治疗定义为出血量的减少或完全停止出血的适当凝固。

[0134] 在预防性或阻止性应用中，以足以预防或减轻病症或其一种或多种症状的后作用的量，将抗体或组合物施用给处于上述障碍或病症危险中的受试者。足以实现该目的的量被定义为“预防有效量”。例如，在治疗是防止不希望的出血的情况下，可以将预防效果定义为出血的防止，或与在没有调节剂存在下所看到的结果相比出血时间或量减少。

[0135] 每种目的的有效量取决于疾病或损伤的严重性以及受试者的体重和一般状况。

[0136] 本文使用的术语“受试者”包括任意的人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如，哺乳动物和非哺乳动物，诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、奶牛、鸡、两栖动物和爬行动物等。

[0137] 使用本领域已知的多种方法中的一种或多种，通过一种或多种施用途径，可以施用本发明的抗体或组合物。如技术人员会理解的，施用途径和 / 或方式随所希望的结果而异。本发明抗体或组合物的优选施用途径包括静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内、皮下、脊柱或其它肠胃外施用途径，例如通过注射或输注。本文使用的短语“肠胃外施用”是指除了肠和局部施用以外的施用方式，通常通过注射。或者，通过非肠胃外途径(诸如局部、表皮或粘膜施用途径)，可以施用本发明的抗体或组合物。

[0138] 本发明抗体的合适剂量可以由熟练的医学从业人员确定。本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平可以改变，从而得到有效地实现对于特定患者、组合物和施用方式而言所希望的治疗应答、而对该患者无毒性的活性成分的量。所选的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括：使用的特定抗体的活性，施用途径，施用时间，抗体的排泄速率，治疗持续时间，与所用的具体组分组合使用的其它药物、化合物和 / 或物质，被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、一般健康和以前的医疗史，和医学领域中公知的类似因

素。

[0139] 本发明抗体的合适剂量可以是例如对于要治疗的患者体重在从约 0.1μg/kg 至约 100mg/kg 的范围内。例如，合适的剂量可以是从约 1μg/kg 至约 10mg/kg 体重 / 天或从约 10 g/kg 至约 5 mg/kg 体重 / 天。

[0140] 可以调整剂量方案，以提供最佳的目标应答（例如，治疗应答）。例如，可以施用单次大剂量（bolus），可以随时间施用几个分份剂量，或者可以根据治疗情况的紧迫性成比例地减小或增加剂量。特别有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物，以容易施用和剂量统一。本文使用的剂量单位形式表示适合作为待治疗受试者的单元剂量的物理上分散的单位；每个单位含有与所需的药学载体相组合的预定量的活性化合物，所述量经计算会产生希望的治疗效果。

[0141] 可以在单次剂量中或在多次剂量中施用抗体。多次剂量可以通过相同或不同的途径施用，并施用到相同或不同的位置。或者，抗体可以作为持续释放制剂来施用，在该情况下，需要更低的施用频率。剂量和频率可以随抗体在患者中的半衰期和希望的治疗持续时间而异。施用的剂量和频率也可以随治疗是预防性的还是治疗性的而异。在预防性应用中，可以在长时间段内在相对低频的间隔施用相对较低的剂量。在治疗性应用中，可以施用相对较高的剂量，例如直到患者显示出疾病症状的部分或彻底改善。

[0142] 如上所述，本发明的抗体可以与一种或多种其它治疗剂共同施用。其它药剂可以是增强调节剂的作用的药剂。其它药剂可以是起增强血液凝固作用的药剂，诸如凝血因子。具体地，本发明的调节剂可以与因子 VII 或因子 VIIa 共同施用。其它药剂可以意图治疗患者的其它症状或病症。例如，其它药剂可以是止痛剂、麻醉剂、免疫抑制剂或抗炎剂。

[0143] 可以以许多不同的方式实现 2 种或更多种药剂的联合施用。在一个实施方案中，所述抗体和其它药剂可以在单一组合物中一起施用。在另一个实施方案中，所述抗体和其它药剂可以在分开的组合物中施用，作为联合治疗的一部分。例如，所述调节剂可以在其它药剂之前、之后或同时施用。

[0144] 下面的实施例进一步例证了本发明，所述实施例不应当解释为进一步限制。在本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容都明确地通过引用并入本文。

实施例

[0145] 实施例 1 - 针对 TFPI 的单克隆抗体的生产和表征

概要

生产了针对组织因子途径抑制剂 (TFPI) 的单克隆抗体。对具有希望的结合特异性的单克隆抗体进行鉴定、克隆和测序。发现该抗体在体内会显著减少表皮出血时间，但是不导致血小板数目的显著下降。

[0146] 方法和结果

根据生产商的说明书，使用所有试剂盒。缩写：HC：重链；LC：轻链；VH：可变结构域 - 重链；VL：可变结构域 - 轻链；PCR：聚合酶链式反应。

[0147] *免疫和融合*

使用全长 TFPI 和仅含有前 2 个 Kunitz 结构域的截短形式 TFPIB161B，免疫小鼠。将

RBF 小鼠用于免疫和生产小鼠单克隆抗体。在小鼠后背进行皮下注射。将 20μg 蛋白与完全弗氏佐剂混合，用于第一次注射。在以后的免疫中，不完全弗氏佐剂与相同浓度的抗原一起使用。在最后一次免疫后 10 天，针对 TFPI 特异性的抗体，通过 ELISA 筛选来自小鼠的眼血。通过静脉内注射，用 10 μg TFPI 强化具有正血清滴度的小鼠，并在 3 天后处死。无菌地取出脾，并分散成单细胞悬浮液。通过 PEG- 方法或通过电融合，进行脾细胞和骨髓瘤细胞的融合。

[0148] *结合测定： ELISA*

用抗 - 小鼠 IgG 包被免疫平板。将来自杂交瘤细胞的培养上清液加入平板，洗涤后，加入可溶的生物素化的人 TFPI 或 TFPIB161B，以测试特异性结合。

[0149] *中和测定： FXa 测定和 TF/FVIIa/FXa 测定*

FXa 抑制测定： 用含有抗 TFPI 单克隆抗体的来自杂交瘤细胞的培养上清液与引起 FXa 的 90% 抑制的固定浓度的 TFPI 预温育，并加入 FXa + FXa- 特异性的显色底物。该测定研究了 TFPI 与 FXa （K2 结构域）的结合。

[0150] FVIIa/TF/FXa 抑制测定： 1） 温育含有抗 TFPI 单克隆抗体的来自杂交瘤细胞的培养上清液和固定的 TFPI （FVIIa/TF 的 90% 抑制）；2） 温育 TFPI + FVIIa + TF + FXa；3） 加入 FX （FX>>FXa），随后用 FXa 显色底物温育。

[0151] *稀释凝血酶原时间 (dPT)*

稀释凝血酶原 (PT) 分析：人血浆与稀释的人促凝血酶原激酶 （TF 来源）的组合。在加入递增的蛋白 A 纯化的 TFPI 单克隆抗体浓度以后，测量血浆中的凝固时间，以研究凝固时间的剂量依赖性的减小。FVIIa （25 nM） 是阳性对照，且必须缩短该凝固时间。

[0152] *结合相互作用分析*

通过在 Biacore 3000 中的表面等离子体共振，得到结合相互作用分析。用固定化的小鼠抗 -IgG，捕获固定浓度的有关的单克隆抗体。测试了不同浓度的 TFPI。假定 TFPI 和目标抗体的 1:1 相互作用，测定结合常数 ($k_{开}$、$k_{关}$、K_D)。

[0153] *血栓弹力描记术*

记录全血中的血块形成和纤维蛋白溶解的动力学。通过用中和抗 -FVIII IgG 预温育血液，诱导血友病 A 样病症。

[0154] *体内研究*

通过静脉内施用 2000 RBU/kg 的单克隆抗 -FVIII- 抗体，使兔暂时患血友病。10 分钟后，兔接受 12000 U/kg 的抗 -TFPI- 抗体 (3F18; 1.93 mg/kg)。在抗 -FVIII- 抗体施用后 45 分钟，诱导表皮出血。

[0155] 3F18 抗体造成表皮出血时间的显著减少，与 10 mg/kg rFVIIa 的作用相当（图 1）。3F18 抗体的施用不会导致血小板数目的显著下降 （图 5）。

[0156] *抗体克隆和测序*

从杂交瘤 TFPI-3F18A4B1 （在本文中缩写为 3F18） 克隆抗 -TFPI 抗体的鼠重链和轻链序列。将总 RNA （使用来自 Qiagen 的 RNeasy-Mini 试剂盒，从杂交瘤细胞提取）用作 cDNA 合成的模板。使用来自 Clontech 的 SMART™ RACE cDNA 扩增试剂盒，在 5'-RACE 反应中合成 cDNA。随后使用 Phusion Hot Star 聚合酶 (Finnzymes)，并使用包含在 SMART™ RACE 试剂盒中的通用引物混合物 (UPM) 作为正向引物，通过 PCR 进行 HC 和 LC 序列的靶物扩增。

使用具有下述序列的反向引物进行 HC（VH 结构域）扩增：5’-CCCTTGACCAGGCATCCCAG-3’（引物 #129）。使用具有下述序列的反向引物进行 LC 扩增：5’-GCTCTAGACTAACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTG-3’（引物 #69）。

[0157] 通过凝胶电泳分离出 PCR 产物，使用来自 GE Healthcare Bio-Sciences 的 GFX PCR DNA 和凝胶带纯化试剂盒（Gel Band Purification Kit）进行提取，并使用 Zero Blunt TOPO PCR 克隆试剂盒和来自 Invitrogen 的化学感受态 TOP10 大肠杆菌进行克隆，用于测序。使用来自 Applied Biosystems 的 AmpliTaq Gold Mas-ter Mix 和 M13uni/M13rev 引物，对选择的菌落进行菌落 PCR。使用 ExoSAP-IT 酶混合物（usb），进行菌落 PCR 净化。使用 M13uni(-21)/M13rev(-29) 或 T3/T7 测序引物，在德国 Martinsried 的 MWG Biotech 进行测序。使用 VectorNTI 程序，分析和注释序列。

[0158] 从杂交瘤 TFPI-3F18A4B1 中，鉴定出单个独特的鼠 κ 型 LC 和单个独特的鼠 HC 亚类 IgG1。VH 和 VL 序列如图 2 所示，不包括先导肽序列。

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 抗体

<130> 7925

<140>
<141>

<160> 9

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1
<211> 276
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> 结构域
<222> (26)..(76)
<223> Kunitz 结构域 1

<220>
<221> 结构域
<222> (97)..(147)
<223> Kunitz 结构域 2

<220>
<221> 结构域
<222> (188)..(238)
<223> Kunitz 结构域 3

<400> 1

```
Asp Ser Glu Glu Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu
1               5                  10                  15
```

Pro Pro Leu Lys Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp
20 25 30

Gly Pro Cys Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr
35 40 45

Arg Gln Cys Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn
50 55 60

Arg Phe Glu Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn
65 70 75 80

Ala Asn Arg Ile Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe
85 90 95

Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg
100 105 110

Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly
115 120 125

Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys
130 135 140

Asn Ile Cys Glu Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly
145 150 155 160

Thr Gln Leu Asn Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys
165 170 175

Val Pro Ser Leu Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro
180 185 190

Ala Asp Arg Gly Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn
195 200 205

Ser Val Ile Gly Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly
210 215 220

Asn Glu Asn Asn Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys
225 230 235 240

Lys Gly Phe Ile Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys
245 250 255

Arg Lys Arg Lys Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe
260 265 270

Val Lys Asn Met
275

<210> 2
<211> 339
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(339)

<400> 2
gat gtt gtg atg acc cag act cca ctc act ttg tcg gtt acc att gga 48
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

caa cca gct tcc atc tct tgc aag tca agt cag agc ctc tta gat agt 96
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

gat gga aaa acc tat tta aat tgg tta tta cag agg cca ggc gag tct 144
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Glu Ser
35 40 45

cca aag ctc ctt atc tat ctg gtg tct aaa ctg gac tct gga gtc cct 192
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc 240
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat tac tgc tta caa ggt 288
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln Gly
85 90 95

aca cat ttt cct cac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa 336
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

cgg 339
Arg

<210> 3
<211> 113
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 结构域
<222> (24)..(39)
<223> CDR

<220>
<221> 结构域
<222> (55)..(61)
<223> CDR

<220>
<221> 结构域
<222> (94)..(102)
<223> CDR

<400> 3

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Glu Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 4
<211> 339
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 4

ccgttttatt tccagcttgg tccccctcc gaacgtgtga ggaaaatgtg taccttgtaa 60
gcagtaataa actcccaaat cctcagcctc cactctgctg attttcagtg tgaaatctgt 120
ccctgatcca ctgccagtga acctgtcagg gactccagag tccagtttag acaccagata 180
gataaggagc tttggagact cgcctggcct ctgtaataac caatttaaat aggtttttcc 240
atcactatct aagaggctct gacttgactt gcaagagatg gaagctggtt gtccaatggt 300
aaccgacaaa gtgagtggag tctgggtcat cacaacatc 339

<210> 5
<211> 354
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(354)

<400> 5

```
gaa gtg aag ctg gta gag tct ggg gga ggc ttg gtg aag cct gga ggg        48
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1               5                  10                  15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aac tat        96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

gcc ctg tct tgg gtt cgc cag act cca gac aag agg ctg gag tgg gtc       144
Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

gca tcc att agt agt ggt ggt gcc acc tac tat cca gac agt gtg gag       192
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ala Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
    50                  55                  60

ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aat gtc agg aac atc ctg tac ctg       240
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80

caa atg agc agt ctg cag tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt aca       288
Gln Met Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr
                85                  90                  95

aga gga gcc tac ggc tcg gac tac ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc       336
Arg Gly Ala Tyr Gly Ser Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
```

act ctc aca gtc tcc tca 354
Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 结构域
<222> (31)..(35)
<223> CDR

<220>
<221> 结构域
<222> (50)..(65)
<223> CDR

<220>
<221> 结构域
<222> (98)..(107)
<223> CDR

<400> 6
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys 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 Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Arg Asn Ile Leu Tyr Leu

65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 354
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 7
tgaggagact gtgagagtgg tgccttggcc ccagtagtca aagtagtccg agccgtaggc 60
tcctcttgta cagtaataca tggccgtgtc ctcagactgc agactgctca tttgcaggta 120
caggatgttc ctgacattat ctctggagat ggtgaatcgg ccctccacac tgtctggata 180
gtaggtggca ccaccactac taatggatgc gacccactcc agcctcttgt ctggagtctg 240
gcgaacccaa gacagggcat agttactgaa agtgaatcca gaggctgcac aggagagtct 300
cagggaccct ccaggcttca ccaagcctcc cccagactct accagcttca cttc 354

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工

<220>
<223> 引物

<400> 8
cccttgacca ggcatcccag 20

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工

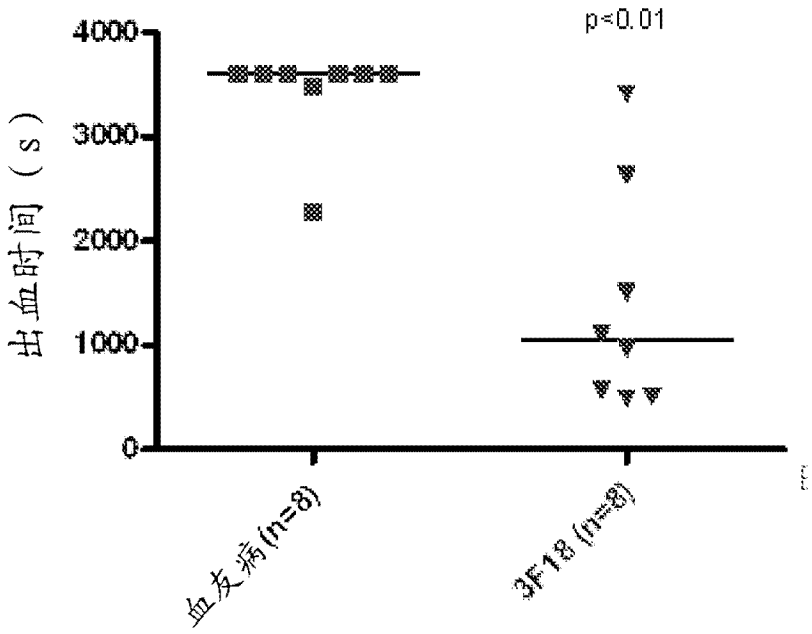
<220>

<223> 引物

<400> 9

gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

A


出血时间（s）
4000
3000
2000
1000
0
p<0.01
血友病(n=8)
3F18 (n=8)

B

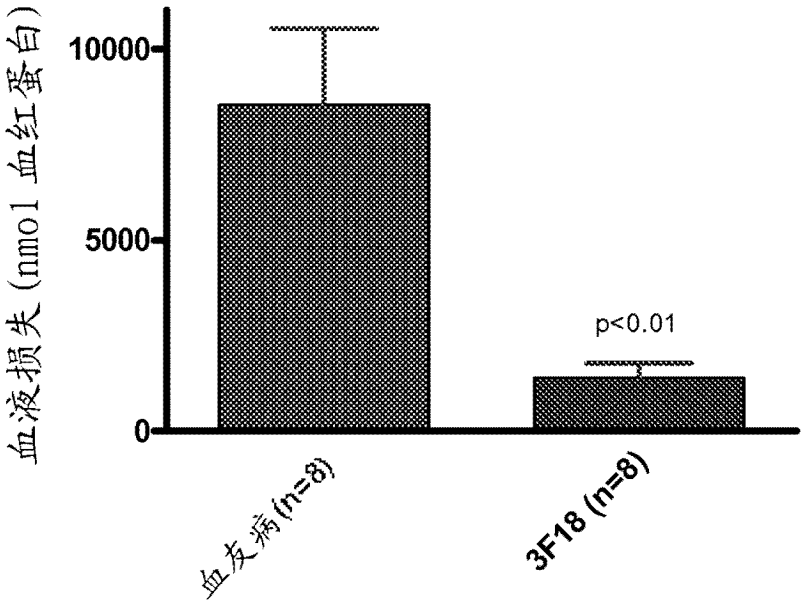

血液损失（nmol 血红蛋白）
10000
5000
0
p<0.01
血友病(n=8)
3F18 (n=8)

图 1

A

TFPI-3F18A4B1 VL

```
      D  V  V  M    T  Q  T    P  L  T    L  S  V  T    I  G  Q  ·
1     GATGTTGTGA TGACCCAGAC TCCACTCACT TTGTCGGTTA CCATTGGACA
      CTACAACACT ACTGGGTCTG AGGTGAGTGA AACAGCCAAT GGTAACCTGT

      ·P  A  S    I  S  C  K    S  S  Q    S  L  L    D  S  D  G  ·
51    ACCAGCTTCC ATCTCTTGCA AGTCAAGTCA GAGCCTCTTA GATAGTGATG
      TGGTCGAAGG TAGAGAACGT TCAGTTCAGT CTCGGAGAAT CTATCACTAC

      · K  T  Y    L  N  W    L  L  Q  R    P  G  E    S  P  K
101   GAAAAACCTA TTTAAATTGG TTATTACAGA GGCCAGGCGA GTCTCCAAAG
      CTTTTTGGAT AAATTTAACC AATAATGTCT CCGGTCCGCT CAGAGGTTTC

      L  L  I  Y    L  V  S    K  L  D    S  G  V  P    D  R  F  ·
151   CTCCTTATCT ATCTGGTGTC TAAACTGGAC TCTGGAGTCC CTGACAGGTT
      GAGGAATAGA TAGACCACAG ATTTGACCTG AGACCTCAGG GACTGTCCAA

      ·T  G  S    G  S  G  T    D  F  T    L  K  I    S  R  V  E  ·
201   CACTGGCAGT GGATCAGGGA CAGATTTCAC ACTGAAAATC AGCAGAGTGG
      GTGACCGTCA CCTAGTCCCT GTCTAAAGTG TGACTTTTAG TCGTCTCACC

      ·A  E  D    L  G  V    Y  Y  C  L    Q  G  T    H  F  P
251   AGGCTGAGGA TTTGGGAGTT TATTACTGCT TACAAGGTAC ACATTTTCCT
      TCCGACTCCT AAACCCTCAA ATAATGACGA ATGTTCCATG TGTAAAAGGA

      H  T  F  G    G  G  T    K  L  E    I  K  R
301   CACACGTTCG GAGGGGGGAC CAAGCTGGAA ATAAAACGG
      GTGTGCAAGC CTCCCCCCTG GTTCGACCTT TATTTTGCC
```

B

TFPI-3F18A4B1 VH (核苷酸和翻译的序列):

```
      E  V  K  L    V  E  S    G  G  G    L  V  K  P    G  G  S  ·
1     GAAGTGAAGC TGGTAGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTGAAGC CTGGAGGGTC
      CTTCACTTCG ACCATCTCAG ACCCCCTCCG AACCACTTCG GACCTCCCAG

      ·L  R  L    S  C  A  A    S  G  F    T  F  S    N  Y  A  L  ·
51    CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACTTTCAGT AACTATGCCC
      GGACTCTGAG AGGACACGTC GGAGACCTAA GTGAAAGTCA TTGATACGGG

      · S  W  V    R  Q  T    P  D  K  R    L  E  W    V  A  S
101   TGTCTTGGGT TCGCCAGACT CCAGACAAGA GGCTGGAGTG GGTCGCATCC
      ACAGAACCCA AGCGGTCTGA GGTCTGTTCT CCGACCTCAC CCAGCGTAGG

      I  S  S  G    G  A  T    Y  Y  P    D  S  V  E    G  R  F  ·
151   ATTAGTAGTG GTGGTGCCAC CTACTATCCA GACAGTGTGG AGGGCCGATT
      TAATCATCAC CACCACGGTG GATGATAGGT CTGTCACACC TCCCGGCTAA

      ·T  I  S    R  D  N  V    R  N  I    L  Y  L    Q  M  S  S  ·
201   CACCATCTCC AGAGATAATG TCAGGAACAT CCTGTACCTG CAAATGAGCA
      GTGGTAGAGG TCTCTATTAC AGTCCTTGTA GGACATGGAC GTTTACTCGT

      · L  Q  S    E  D  T    A  M  Y  Y    C  T  R    G  A  Y
251   GTCTGCAGTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG AGGAGCCTAC
      CAGACGTCAG ACTCCTGTGC CGGTACATAA TGACATGTTC TCCTCGGATG

      G  S  D  Y    F  D  Y    W  G  Q    G  T  T  L    T  V  S  ·
301   GGCTCGGACT ACTTTGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACTC TCACAGTCTC
      CCGAGCCTGA TGAAACTGAT GACCCCGGTT CCGTGGTGAG AGTGTCAGAG

      ·S
351   CTCA
      GAGT
```

图 2

A

```
         1         2                3         4         5         6
1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890
DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDS-DGKTYLNWLLQRPGESPKLLIYLVSKLDSGVPD

         7         8         9         10
123456789012345678901234567890123456789012345678
RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCLQGTHFP--HTFGGGTKLEIKR
```

B

```
         1         2         3         4         5         6
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012
EVKLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYALS--WVRQTPDKRLEWVASIS---SGGATYYP

         7         8         9         10                  11
123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012
DSVEGRFTISRDNVRNILYLQMSSLQSEDTAMYYCTRGAYGSDYF---------DYWGQGTTLTVSS
```

图 3

```
1          11         21         31         41         51
DSEEDEEHTI ITDTELPPLK LMHSFCAFKA DDGPCKAIMK RFFFNIFTRQ CEEFIYGGCE

61         71         81         91         101        111
GNQNRFESLE ECKKMCTRDN ANRIIKTTLQ QEKPDFCFLE EDPGICRGYI TRYFYNNQTK

121        131        141        151        161        171
QCERFKYGGC LGNMNNFETL EECKNICEDG PNGFQVDNYG TQLNAVNNSL TPQSTKVPSL

181        191        201        211        221        231
FEFHGPSWCL TPADRGLCRA NENRFYYNSV IGKCRPFKYS GCGGNENNFT SKQECLRACK

241        251        261        271
KGFIQRISKG GLIKTKRKRK KQRVKIAYEE IFVKNM
```

图 4

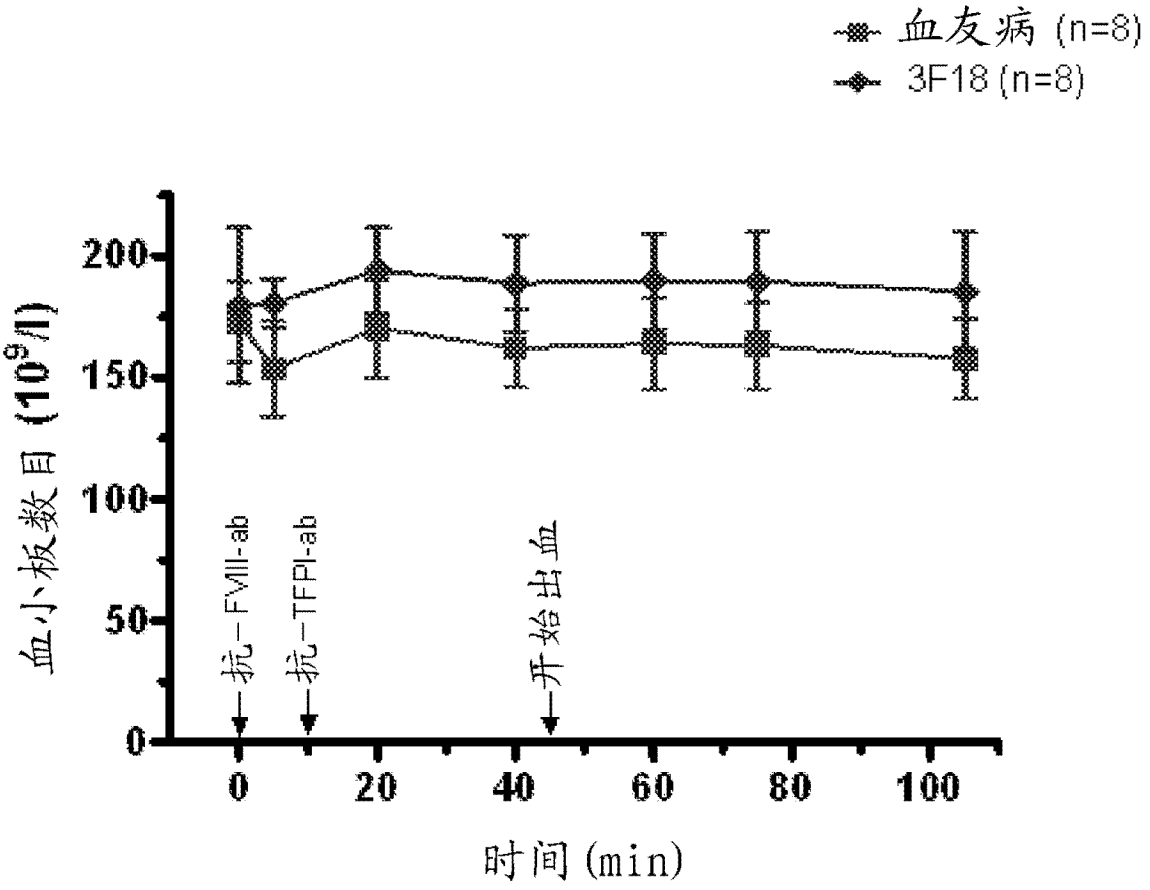

血友病 (n=8)
3F18 (n=8)
血小板数目 (10^9/l)
200
150
100
50
0
抗-FVIII-ab
抗-TFPI-ab
开始出血
0
20
40
60
80
100
时间 (min)

图 5