



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103476459 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 25

(21) 申请号 201280015713. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 03. 27

A61P 39/02 (2006. 01)

C07K 16/44 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/469, 207 2011. 03. 30 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 09. 27

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2012/055397 2012. 03. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02012/130834 EN 2012. 10. 04

(71) 申请人 勃林格殷格翰国际有限公司

地址 德国殷格翰

(72) 发明人 J. 范莱恩 K. 卡纳达 R. 卡朋汉弗

N. 奥埃尔 T. 利岑布格尔

C. R. 萨科 S. 辛格 A. K. 沃特曼

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张平元

权利要求书4页 说明书45页

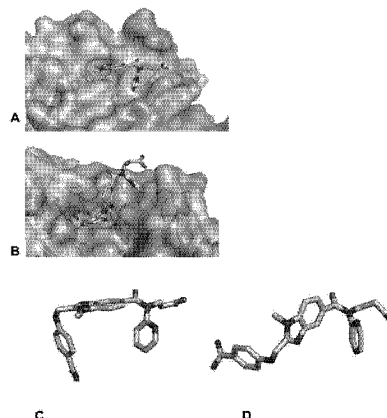
序列表50页 附图8页

(54) 发明名称

抗凝血剂解毒剂

(57) 摘要

本发明涉及针对抗凝血剂、特别是针对达比加群的抗体分子, 以及所述抗体分子作为此类抗凝血剂的解毒剂的用途。



1. 一种针对达比加群的抗体分子,其包含具有选自 SEQ ID NO:1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61 及 67 的 CDR1、选自 SEQ ID NO:2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62 及 68 的 CDR2 及选自 SEQ ID NO:3、9、15、21、27、33、39、45、51、57 及 63 的 CDR3 的重链可变域,以及具有选自 SEQ ID NO:4、10、16、22、28、34、40、46、52、58 及 64 的 CDR1、选自 SEQ ID NO:5、11、17、23、29、35、41、47、53、59 及 65 的 CDR2 及选自 SEQ ID NO:6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66 及 69 的 CDR3 的轻链可变域。

2. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:1 的 CDR1、SEQ ID NO:2 的 CDR2 及 SEQ ID NO:3 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:4 的 CDR1、SEQ ID NO:5 的 CDR2 及 SEQ ID NO:6 的 CDR3 的轻链可变域。

3. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:7 的 CDR1、SEQ ID NO:8 的 CDR2 及 SEQ ID NO:9 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:10 的 CDR1、SEQ ID NO:11 的 CDR2 及 SEQ ID NO:12 的 CDR3 的轻链可变域。

4. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2 及 SEQ ID NO:15 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:16 的 CDR1、SEQ ID NO:17 的 CDR2 及 SEQ ID NO:18 的 CDR3 的轻链可变域。

5. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:19 的 CDR1、SEQ ID NO:20 的 CDR2 及 SEQ ID NO:21 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:22 的 CDR1、SEQ ID NO:23 的 CDR2 及 SEQ ID NO:24 的 CDR3 的轻链可变域。

6. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:25 的 CDR1、SEQ ID NO:26 的 CDR2 及 SEQ ID NO:27 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:28 的 CDR1、SEQ ID NO:29 的 CDR2 及 SEQ ID NO:30 的 CDR3 的轻链可变域。

7. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:31 的 CDR1、SEQ ID NO:32 的 CDR2 及 SEQ ID NO:33 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:34 的 CDR1、SEQ ID NO:35 的 CDR2 及 SEQ ID NO:36 的 CDR3 的轻链可变域。

8. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:37 的 CDR1、SEQ ID NO:38 的 CDR2 及 SEQ ID NO:39 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:40 的 CDR1、SEQ ID NO:41 的 CDR2 及 SEQ ID NO:42 的 CDR3 的轻链可变域。

9. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:43 的 CDR1、SEQ ID NO:44 的 CDR2 及 SEQ ID NO:45 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:46 的 CDR1、SEQ ID NO:47 的 CDR2 及 SEQ ID NO:48 的 CDR3 的轻链可变域。

10. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:49 的 CDR1、SEQ ID NO:50 的 CDR2 及 SEQ ID NO:51 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:52 的 CDR1、SEQ ID NO:53 的 CDR2 及 SEQ ID NO:54 的 CDR3 的轻链可变域。

11. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:55 的 CDR1、SEQ ID NO:56 的 CDR2 及 SEQ ID NO:57 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:58 的 CDR1、SEQ ID NO:59 的 CDR2 及 SEQ ID NO:60 的 CDR3 的轻链可变域。

12. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:61 的 CDR1、SEQ ID NO:62 的 CDR2 及 SEQ ID NO:63 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:64 的 CDR1、SEQ ID NO:65 的 CDR2 及 SEQ ID NO:66 的 CDR3 的轻链可变域。

13. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含具有 SEQ ID NO:67 的 CDR1、SEQ ID NO:68 的 CDR2 及 SEQ ID NO:9 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:64 的 CDR1、SEQ ID NO:65 的 CDR2 及 SEQ ID NO:69 的 CDR3 的轻链可变域。

14. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:70 的重链可变域及 SEQ ID NO:71 的轻链可变域。

15. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:72 的重链可变域及 SEQ ID NO:73 的轻链可变域。

16. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:74 的重链可变域及 SEQ ID NO:75 的轻链可变域。

17. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:76 的重链可变域及 SEQ ID NO:77 的轻链可变域。

18. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:78 的重链可变域及 SEQ ID NO:79 的轻链可变域。

19. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:80 的重链可变域及 SEQ ID NO:81 的轻链可变域。

20. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:82 的重链可变域及 SEQ ID NO:83 的轻链可变域。

21. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:84 的重链可变域及 SEQ ID NO:85 的轻链可变域。

22. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:86 的重链可变域及 SEQ ID NO:87 的轻链可变域。

23. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:88 的重链可变域及 SEQ ID NO:89 的轻链可变域。

24. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:90 的重链可变域及 SEQ ID NO:91 的轻链可变域。

25. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:92 的重链可变域及 SEQ ID NO:93 的轻链可变域。

26. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:92 的重链可变域及 SEQ ID NO:94 的轻链可变域。

27. 如权利要求 1 至 26 中任一项的抗体分子,其中该轻链可变域融合于 SEQ ID NO:97 的恒定域。

28. 如权利要求 1 至 25 中任一项的抗体分子,其中该重链可变域融合于 SEQ ID NO:98 的恒定域。

29. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:95 的重链及 SEQ ID NO:96 的轻链。

30. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQ ID NO:100 的轻链。

31. 如权利要求 1 的抗体分子,其包含 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQ ID NO:101 的轻链。

32. 如前述任一项权利要求的抗体分子,其为多克隆抗体;单克隆抗体;人抗体;人源化抗体;嵌合抗体;抗体的片段,特别是 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 片段;单链抗体,特别是单链可变片段(scFv);小模块免疫药物(SMIP);域抗体;纳米抗体;双价抗体;或经设计的锚蛋

白重复蛋白 (DARPin)。

33. 如前述任一项权利要求的抗体分子,其用于医药中。

34. 如前述任一项权利要求的抗体分子,其用于治疗或预防抗凝血疗法的副作用及/或用于逆转抗凝血剂的过度给药。

35. 如权利要求 34 的抗体分子,其中该副作用为出血事件。

36. 一种治疗或预防抗凝血疗法的副作用或抗凝血疗法中的过度给药事件的方法,其包括向有此需要的患者给予有效量的前述任一项权利要求的抗体分子。

37. 一种制备如前述任一项权利要求的抗体分子的方法,其包括

(a). 提供宿主细胞,其包含一或多个编码与表达调控序列功能相关的抗体分子的核酸,

(b). 培养该宿主细胞,及

(c). 自该细胞培养物回收该抗体分子。

38. 试剂盒,其包含如权利要求 1 至 32 中任一项的抗体或其药物组合物。

39. 试剂盒,其包含:

(a) 如权利要求 1 至 32 中任一项的抗体或其药物组合物;

(b) 容器;及

(c) 标签。

40. 试剂盒,其包含如权利要求 1 至 32 中任一项的抗体,以及达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐。

41. 一种在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中中和或部分中和达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的方法,其包括给予权利要求 1-32 中任一项的抗体或其药物组合物。

42. 一种在患者中中和或部分中和达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的方法,该方法包括以下步骤:

(a) 确认患者正在接受达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗,且确认该患者服用的量;

(b) 在进行凝固或凝血试验或分析之前,用权利要求 1 至 32 中任一项的抗体中和达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸,其中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸会干扰该试验结果或分析结果的精确读数;

(c) 使用来自患者的样品进行该凝固或凝血试验或分析,以确定达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸不存在的情况下血块形成的水平;和

(d) 调节达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐给药患者的量,以在患者中达到血块形成和分解之间的适当平衡。

43. 在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中降低达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的血浆浓度的方法,其包括给予逆转剂的步骤,该逆转剂中和患者中达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性。

44. 一种在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中逆转达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的抗凝血作用的方法,其中该患者有被认为威胁生命的或导致血流动力学损伤的大出血,或其中该患者需要紧急医疗程

序,该方法包括给予逆转剂的步骤,该逆转剂可中和患者中达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性。

45. 一种在由于凝血功能损伤或创伤而正在经受出血或有出血危险的患者中逆转或降低达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的方法,其包括以下步骤:

(a) 测定患者中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸存在的量;

(b) 给予有效量的药物以逆转或降低该患者中测定的达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性;

(c) 监测该患者的凝血酶凝固时间以确保达到达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的逆转或降低。

46. 权利要求 43 至 45 任一项的方法,其中所述逆转剂为针对达比加群的抗体分子。

47. 中和达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸活性的逆转剂,其用于正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中,其中该患者有被认为威胁生命的或导致血流动力学损伤的大出血,或其中该患者需要紧急医疗程序。

48. 权利要求 47 的逆转剂,其为针对达比加群的抗体分子。

抗凝血剂解毒剂

技术领域

[0001] 本发明涉及医药领域,尤其是抗凝血疗法的领域。

现有技术

[0002] 抗凝血剂为预防血液凝固的物质;即,抗凝血剂可以使血液停止凝固。抗凝血剂广泛用作治疗人血栓性疾病的药物,例如在易感者中预防原发性及继发性深静脉血栓形成、肺栓塞、心肌梗塞及中风。

[0003] 一类重要的口服抗凝血剂通过拮抗维生素 K 的作用而起作用,例如包括华法林在内的香豆素类。第二类化合物通过辅因子间接抑制凝血,例如抗凝血酶 III 或肝素辅因子 II。此包括数种低分子量的肝素产物,其通过抗凝血酶 III 主要催化抑制 Xa 因子(以及针对凝血酶的程度较小)(贝米肝素(bemiparin)、舍托肝素(certoparin)、达替肝素(dalteparin)、依诺肝素(enoxaparin)、那屈肝素(nadroparin)、帕肝素(panaparin)、瑞肝素(reviparin)、亭扎肝素(tinzaparin)、小链寡糖(磺达肝素(fondaparinux)、艾卓肝素(idraparinux))通过抗凝血酶 III 仅抑制 Xa 因子。类肝素(达那肝素(danaparoid)、舒洛地特(sulodexide)、硫酸皮肤素(dermatan sulfate))通过两种辅因子起作用,且抑制 Xa 因子及凝血酶两者。第三类则为凝血的直接抑制剂。直接 Xa 因子抑制剂包括阿哌沙班(apixaban)、伊度沙班(edoxaban)、奥米沙班(otamixaban)、利伐沙班(rivaroxaban),且直接凝血酶抑制剂包括二价水蛭素(比伐卢定(bivalirudin)、来匹卢定(lepirudin)、地西卢定(desirudin))以及单价化合物阿加曲班(argatroban)及达比加群(dabigatran)。

[0004] 由于血液凝固为停止出血的生物机制,因此抗凝血疗法的副作用是可能发生不期望的出血事件。因此需要提供一种能够阻止所述抗凝血剂相关的出血事件发生的解毒剂(antidote)(Zikria 及 Ansell, Current Opinion in Hematology 2009, 16(5):347-356)。一种实现此目标的方法为在给药抗凝血剂后中和患者体内所存在的抗凝血剂化合物活性。

[0005] 目前可使用的抗凝血剂解毒剂为鱼精蛋白(用于中和肝素)及维生素 K(用于中和类似华法林的维生素 K 拮抗剂)。对于罹患严重创伤及严重出血且接受低分子量肝素治疗的患者而言,新鲜冷冻血浆及重组因子 VIIa 也可作为非特异性解毒剂使用(Lauritzen B. 等人, Blood, 2005, 607A-608A)。也有报导指出鱼精蛋白片段(美国专利第 6,624,141 号)及小合成肽(美国专利第 6,200,955 号)作为肝素或低分子量肝素解毒剂;且凝血酶突变蛋白(美国专利第 6,060,300 号)可用作凝血酶抑制剂的解毒剂。已有报导指出凝血酶原中间体及衍生物可用作水蛭素及合成凝血酶抑制剂解毒剂(美国专利第 5,817,309 号及第 6,086,871 号)。对于 Xa 因子直接抑制剂而言,已有报导指出失活 Xa 因子类似物可用作解毒剂(WO2009042962)。此外,重组 VIIa 因子已经用于逆转抗凝血酶 III 依赖性 Xa 因子之间接抑制剂(例如磺达肝素及艾卓肝素)的效应(Bijsterveld NR 等人, Circulation, 2002, 106:2550-2554;Bijsterveld NR 等人, British J. of Haematology, 2004(124):653-658)。有关抗凝血剂逆转的方法的综述提供于 Schulman 及 Bijsterveld, Transfusion Medicine Reviews 2007:21(1), 37-48 中。

[0006] 国际专利申请案 W02011089183 公开可结合及中和达比加群活性的抗体。

[0007] 对于抗凝血疗法提供改良的解毒剂存在需求,且具体地,为针对类似达比加群的直接凝血酶抑制剂提供解毒剂,该特异性解毒剂至今尚无人公开。

[0008] 发明概述

[0009] 在一个方面中,本发明涉及一种能够中和抗凝血剂的活性的抗体分子。

[0010] 在另一方面中,该抗体分子针对抗凝血剂具有结合特异性。

[0011] 在另一方面中,该抗凝血剂为一种直接凝血酶抑制剂、Xa 因子抑制剂或维生素 K 拮抗剂。

[0012] 在另一方面中,该抗凝血剂为达比加群 (dabigatran)、阿加曲班 (argatroban)、美拉加群 (melagatran)、希美加群 (ximelagatran)、水蛭素 (hirudin)、比伐卢定 (bivalirudin)、来匹卢定 (lepirudin)、地西卢定 (desirudin)、阿哌沙班 (apixaban)、奥米沙班 (otamixaban)、利伐沙班 (rivaroxaban)、去纤维蛋白多核苷酸 (defibrotide)、雷马曲班 (ramatroban)、抗凝血酶 III 或 Drotrecogin α 。

[0013] 在另一方面中,本发明涉及一种针对达比加群、达比加群酯 (dabigatran exetilate) 及 / 或达比加群的 O- 酰基葡萄糖苷酸的抗体分子。

[0014] 在另一方面中,本发明涉及一种针对达比加群、达比加群酯和 / 或达比加群的 O- 酰基葡萄糖苷酸的抗体分子,其对于人而言具有降低的免疫原性。

[0015] 在另一方面中,本发明涉及一种针对达比加群、达比加群酯和 / 或达比加群的 O- 酰基葡萄糖苷酸的抗体分子,其具有改良的理化性质,尤其是在水性溶剂中具有改良的溶解度。

[0016] 在另一方面中,本发明涉及一种针对达比加群、达比加群酯和 / 或达比加群的 O- 酰基葡萄糖苷酸的抗体分子,其在宿主细胞中具有改良的生产能力,尤其是造成改良的产物收率。

[0017] 在另一方面中,该抗体分子为多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、抗体的片段,尤其为 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 片段、单链抗体,尤其为单链可变片段 (scFv)、域抗体、纳米抗体、双价抗体 (diabody) 或 DARPin。

[0018] 在另一方面中,本发明涉及一种如上所述的抗体分子,其用于医药中。

[0019] 在另一方面中,本发明涉及一种如上所述的抗体分子,其用于治疗或预防抗凝血疗法所产生的副作用。

[0020] 在另一方面中,该副作用为出血事件。

[0021] 在另一方面中,本发明涉及一种治疗或预防抗凝血疗法所产生的副作用的方法,该方法包括将有效量的如上所述抗体分子给药至有此需要的患者。

[0022] 在另一方面中,本发明涉及包含所述抗体分子以及容器和标签的试剂盒。

附图说明

[0023] 图 1:利用凝血酶凝血时间测试,观察到凝血时间会随着达比加群浓度增加而增长。200nM 的浓度会造成凝血时间比基线增加约 5 倍,且该浓度用于第一组及第二组实验中。最后一组实验中采用 500nM 的浓度 (超治疗浓度)。

[0024] 图 2:四种针对达比加群的不同抗体 (A 至 D) 均可使人血浆中达比加群所延长的

凝血时间中和。人血浆中的基线凝血时间为 10.9 秒,当使 200nM 达比加群与血浆预先培养时,凝血时间延长至 51 秒。将各抗体添加至经 200nM 达比加群预先培养的血浆中,并再培养 5 分钟。随后,通过添加凝血酶,开始凝血酶凝血时间。各抗体会以不同程度逆转达比加群的凝血时间。浓度最高的溶液会造成抗凝血活性的最大逆转。

[0025] 图 3:将浓度递增的多克隆抗体(抗体 D)添加至已与 200nM 达比加群预先培养的人血浆中,测量其作用。基线凝血时间为 11 秒,添加达比加群延长凝血时间至 63.7 秒。随后,测定递增浓度的抗体对逆转达比加群所延长凝血酶凝血时间的作用。最低浓度将凝血酶凝血时间降低至 43.9 秒。较高的浓度将凝血酶凝血时间完全降至基线水平,并造成达比加群的抗凝血作用的完全中和。添加非特异性兔多克隆抗体(方块)对逆转达比加群的抗凝血作用无影响。

[0026] 图 4:将浓度递增的多克隆抗体(抗体 D)添加至已与 500nM 达比加群预先培养的人血浆中,测量其影响。基线凝血时间为 10.9 秒,添加该较高浓度达比加群时,延长凝血时间至 111.7 秒(增加约 10 倍)。抗体的 1:2 稀释液或原液逆转达比加群所延长凝血酶凝血时间的效应与浓度具有相关性。最高浓度也会使凝血酶凝血时间完全逆转至基线水平,且甚至使超治疗浓度的达比加群的抗凝血作用完全中和。

[0027] 图 5:小鼠单克隆抗体(克隆 22)逆转人血浆及人全血中达比加群的抗凝血作用。将浓度递增的小鼠单克隆抗体添加至已与 30nM 达比加群预先培养的人血浆或全血中。通过添加 1.5 至 2U/ml 的凝血酶开始该测试,并测量凝血时间。将存在及不存在该化合物下的凝血时间差异定义为 100% 达比加群活性。该抗体以剂量依赖性方式抑制达比加群-介导的凝血时间延长。

[0028] 图 6:自克隆 22 抗体产生的小鼠 Fab 逆转人血浆中达比加群的抗凝血作用。将浓度递增的小鼠 Fab 添加至已与 7nM 达比加群预先培养的人血浆中。也测试完整抗体,作为阳性对照组。通过添加 0.4U/ml 的凝血酶开始该测试,并测量凝血时间。将达比加群介导的凝血时间增加的完全阻断定义为 100% 抑制。该 Fab 以剂量依赖性方式抑制人血浆中达比加群所诱发的凝血时间延长。

[0029] 图 7:小鼠单克隆抗体(克隆 22)逆转人血浆中的达比加群酰基葡萄糖苷酸的抗凝血作用。将浓度递增的小鼠抗体添加至已与 7nM 达比加群酰基葡萄糖苷酸或达比加群预先培养的人血浆中。通过添加 0.4U/ml 的凝血酶开始该测试,并测量凝血时间。将该化合物介导的凝血时间增加的完全阻断定义为 100% 抑制。该抗体以剂量依赖性方式抑制人血浆中达比加群酰基葡萄糖苷酸所诱发的凝血时间延长。

[0030] 图 8:所选嵌合抗体在凝血酶凝血时间测试中抑制达比加群活性。添加递增浓度的抗体至已与 7nM 达比加群一起预培育的人类血浆中。完整抗体亦作为阳性对照进行测试。由添加 0.4U/mL 凝血酶开始分析并且测量凝血时间。将达比加群介导的凝血时间增加完全阻断定义为 100% 抑制。抗体以剂量依赖性方式抑制人类血浆中由达比加群诱发的凝血时间延长。

[0031] 图 9:Fab VH5c/Vk18(SEQ ID NO:99 及 SEQ ID NO:100) 及 VH5c/Vk21(SEQ ID NO:99 及 SEQ ID NO:101) 在凝血酶凝血时间血浆分析中抑制达比加群活性。如上所述进行分析。

[0032] 图 10:Fab VH5c/Vk18(SEQ ID NO:99 及 SEQ ID NO:100) 及 VH5c/Vk21(SEQ ID

NO:99 及 SEQ ID NO:101) 在血浆和全血凝血酶凝血时间测试中抑制达比加群活性。如上所述进行分析。

[0033] 图 11:Fab- 达比加群复合物的晶体结构。A:Fab18/15(W02011089183) 与达比加群的复合物的晶体结构。B:Fab VH5c/Vk18(SEQ ID NO:99 及 SEQ ID NO:100) 与达比加群的复合物的晶体结构。C:在含有 Fab18/15 的晶体结构中所见的达比加群的构型。D:在具有 VH5c/Vk18 的晶体结构中所见的达比加群的伸长构型。

[0034] 图 12:所计算的包含 CDR(左侧)或完整 Fv 区(右侧)的 (A)Fab18/15、(B)Fab VH5c/Vk18 及 (C)Fab VH5c/Vk18 的空间聚集趋势 (SAP)。

[0035] 图 13:用相应 Fab 表达构建体转染的 CHO 细胞在分批补料运行之下得到 (A) Fab18/15(B)Fab VH5c/Vk18 和 (C)Fab VH5c/Vk21 的效价。

[0036] 发明详述

[0037] 在一个方面中,本发明涉及一种能够中和抗凝血剂的活性的抗体分子。

[0038] 抗体(也称为免疫球蛋白,缩写为 Ig)为发现于脊椎动物血液或其他体液的 γ 球蛋白,且可通过免疫系统用以识别及中和外来物体,例如细菌及病毒。所述抗体通常为由各具有两个大重链及两个小轻链的基本结构单元所组成,以形成(例如)具有 1 个单元的单体、具有 2 个单元的二聚体或具有 5 个单元的五聚体。抗体可通过非共价键相互作用而结合至称为抗原的其他分子或结构。此结合是特异性的,也就是抗体会以高亲和力方式仅结合至特定结构。被抗体所识别的抗原的独特部分称为抗原表位或抗原决定基。结合至该抗原表位的抗体部分有时称为互补位,其位于该抗体的所谓的可变域或可变区(Fv)中。该可变域包括三个被骨架区(FR)隔开的所谓的互补决定区(CDR)。

[0039] 在本发明上下文中,所提及的 CDR 是根据 Chothia 的定义(Chothia 及 Lesk, J. Mol. Biol. 1987, 196:901-917)以及 Kabat(E. A. Kabat, T. T. Wu, H. Bilofsky, M. Reid-Miller 及 H. Perry, Sequence of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health, Bethesda(1983))。

[0040] 本领域已经进一步开发出抗体,且使所述抗体成为医学及技术中具有多功能的工具。因此,在本发明上下文中,术语“抗体分子”或“抗体”(本文作为同义词使用)并不只包括自然界中所发现的抗体(该抗体包括例如两条轻链及两条重链,或仅包括两条重链(如在骆驼物种中)),也包括所有包含至少一个具有抗原结合特异性的互补位及具有与免疫球蛋白可变域类似结构的分子。

[0041] 因此,本发明的抗体分子可为多克隆抗体、单克隆抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、抗体的片段,尤其为 Fv、Fab、Fab' 或 $F(ab')_2$ 片段、单链抗体,尤其为单链可变片段(scFv)、小模块免疫药物(SMIP)、域抗体、纳米抗体、双价抗体。

[0042] 多克隆抗体是指具有不同氨基酸序列的抗体分子的集合,且可通过本领域公知的方法,从接受抗原免疫的脊椎动物的血液中获得。

[0043] 单克隆抗体(mAb 或 moAb)为氨基酸序列相同的单一特异性抗体,单克隆抗体可通过杂交瘤技术,从被称为杂交瘤的杂交细胞株制备产生的,该称为杂交瘤的杂交细胞是指可产生特异性抗体的 B 细胞与骨髓瘤(B 细胞癌)细胞融合的克隆(Kohler G, Milstein C, Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 1975; 256:495-7)。或者,单克隆抗体可通过在宿主细胞中的重组

表达法制备 (Norderhaug L、Olafsen T、Michaelson TE、Sandlie I. (1997 年 5 月), “Versatile vectors for transient and stable expression of recombinant antibody molecules in mammalian cells”, J Immunol Methods 204(1):77-87; 参见下文)。

[0044] 对人的应用而言, 往往需要降低源自其他物种 (如小鼠) 的抗体的免疫原性。这可通过构建嵌合抗体, 或通过称为“人源化”的方法来实现。在本文中, “嵌合抗体”应理解成将包含衍生自一种物种 (例如小鼠) 的序列部分 (例如可变域) 融合至衍生自不同物种 (例如人) 的序列部分 (例如恒定域) 的抗体。“人源化抗体”为一种包括源自非人物种可变域的抗体, 其中某些氨基酸发生突变, 使该可变域整体序列更类似接近于人可变域的序列。抗体的嵌合化及人源化的方法也是本领域公知的 (Billetta R、Lobuglio AF, “Chimeric antibodies”. Int Rev Immunol. 1993; 10(2-3):165-76; Riechmann L、Clark M、Waldmann H、Winter G (1988), “Reshaping human antibodies for therapy”, Nature: 332:323)。

[0045] 此外, 已经开发基于衍生自人基因组序列的产生抗体的技术, 例如通过噬菌体展示技术或使用转基因动物 (W090/05144; D. Marks、H. R. Hoogenboom、T. P. Bonnert、J. McCafferty、A. D. Griffiths 及 G. Winter (1991), “By-passing immunisation. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage.” J. Mol. Biol., 222, 581-597; Knappik 等人, J. Mol. Biol. 296:57-86, 2000; S. Carmen 及 L. Jermutus, “Concepts in antibody phage display”, Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2002(2):189-203; Lonberg N、Huszar D, “Human antibodies from transgenic mice”, Int Rev Immunol. 1995; 13(1):65-93; Brüggemann M、Taussig MJ, “Production of human antibody repertoires in transgenic mice”, Curr Opin Biotechnol. 1997 年 8 月, 8(4):455-8)。所述抗体为本发明上下文中的“人抗体”。

[0046] 本发明的抗体分子也包括保持抗原结合特性的免疫球蛋白片段, 如 Fab、Fab' 或 F(ab')₂ 片段。通过免疫球蛋白的断裂 (例如通过蛋白消化) 或通过重组表达所述片段可获得所述片段。例如通过常规技术, 例如使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶 (W094/29348) 或内切蛋白酶 Lys-C (Kleemann 等人, Anal. Chem. 80, 2001-2009, 2008) 可实现免疫球蛋白消化作用。以木瓜蛋白酶或 Lys-C 消化抗体通常会生成两个相同的称为 Fab 片段的抗原结合片段 (每一片段具有单一的抗原结合位点) 及残留的 Fc 片段。经胃蛋白酶处理则会生成 F(ab')₂。通过宿主细胞中重组表达制备 Fab 分子的方法详细说明于下文中。

[0047] 已开发出多种技术以将免疫球蛋白可变域或衍生自所述可变域分子置于不同的分子背景内。根据本发明, 这些也应视为“抗体分子”。一般而言, 这些抗体分子在尺寸上小于免疫球蛋白, 且包括单一氨基酸链或由数条氨基酸链组成。例如单链可变片段 (scFv) 为免疫球蛋白重链及轻链的可变区的融合体, 利用短接头 (通常为丝氨酸 (S) 及甘氨酸 (G)) 连在一起 (W088/01649; W091/17271; Huston 等人, International Reviews of Immunology, 第 10 卷, 1993, 195-217)。“单域抗体”或“纳米抗体”在单一的 Ig 样域中具有抗原结合位点 (W094/04678; W003/050531; Ward 等人, Nature. 1989 年 10 月 12 日; 341(6242):544-6; Revets 等人, Expert Opin Biol Ther. 5(1):111-24, 2005)。可将一或多个具有针对相同或不同抗原的结合特异性单域抗体连在一起。双价抗体为由两条氨基酸链组成的二价抗体分子, 其包含两个可变域 (W094/13804; Holliger 等人, Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 年 7 月 15 日; 90(14):6444-8)。抗体样分子的其他实例为免疫球蛋白超

家族抗体 (IgSF ;Srinivasan 及 Roeske, Current Protein Pept. Sci. 2005, 6(2) :185-96)。有一种不同概念产生所谓的小模块免疫药物 (SMIP), 其包括连接至单链铰链的 Fv 域及缺乏恒定域 CH1 的效应子结构域 (W002/056910)。

[0048] 在另一方面中, 本发明的抗体分子甚至可能与免疫球蛋白可变域仅具有远距结构相关性, 或根本没有所述相关性, 只要其具有相当于免疫球蛋白可变域的特定的结合特异性及亲和力即可。所述非免疫球蛋白“抗体模拟物”(有时称为“支架蛋白”)可能基于 A 蛋白、载脂蛋白、纤维结合蛋白域、锚蛋白通用序列重复域及硫氧还蛋白的基因 (Skerra, Current Opinion in Biotechnology 2007, 18(4) :295-304)。本发明上下文中的优选实施方案为经设计的锚蛋白重复蛋白 (DARPin's ;Steiner 等人, J Mol Biol. 2008 年 8 月 24 日 ;382(5) :1211-27 ;Stumpp MT、Amstutz P, Curr Opin Drug Discov Devel. 2007 年 3 月 ;10(2) :153-9)。

[0049] 可将抗体分子融合(成为融合蛋白)或另外连接(通过共价键或非共价键)至对该抗体分子的特性具有所需影响的其他分子实体。例如可能需要改善抗体分子的药代动力学性质、例如体液(如血液)中的稳定性, 特别是在单链抗体或域抗体的情况下。已在此方面开发诸多技术, 尤其为延长所述抗体分子在循环中的半衰期, 如聚乙二醇化 (W098/25971 ;W098/48837 ;W02004081026) ;将抗体分子融合或共价连接至对血清蛋白(如白蛋白)具有亲和力的另一抗体分子 (W02004041865 ;W02004003019) ;或使抗体分子表达为具有全部或部分血清蛋白(如白蛋白或转铁蛋白)的融合蛋白 (W001/79258)。

[0050] 在另一方面中, 所述抗体分子对抗凝血剂具有结合特异性。“结合特异性”指抗体分子对该抗凝血剂的结合亲和力显著高于对结构上无关的分子的结合亲和力。

[0051] 亲和力为抗体分子上的单一抗原结合位点与单一抗原表位之间的相互作用。其以缔合常数 $K_A = k_{\text{ass}}/k_{\text{diss}}$ 或解离常数 $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ 表示。

[0052] 在本发明的一方面中, 如通过表面等离子共振分析法 (Malmqvist M., “Surface plasmon resonance for detection and measurement of antibody-antigen affinity and kinetics.”, Curr Opin Immunol. 1993Apr;5(2):282-6) 所测定, 该抗体与抗凝血剂的结合亲和性的 KD 值范围为 0.1pM 至 100 μ M, 优选为 1pM 至 100 μ M, 优选为 1pM 至 1 μ M。也可使用动态排除分析 (KinExA) 技术, 测量抗体亲和性 (Darling, R. J. 及 Brault P-A., “Kinetic exclusion assay technology ;Characterization of Molecular Interactions.”, ASSAY and Drug Development Technologies. 2004 年 12 月, 2(6) : 647-657)。

[0053] 可通过称为亲和性成熟的方法来增强抗体分子的结合亲和性 (Marks 等人, 1992, Biotechnology 10:779-783 ;Barbas, 等人, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813 ;Shier 等人, 1995, Gene 169:147-155)。因此, 本发明也包括亲和性成熟的抗体。

[0054] 在本发明另一方面中, 该抗体分子能够中和抗凝血剂的活性。即, 在与该抗体分子结合之后, 该抗凝血剂即无法发挥其抗凝血活性, 或此活性程度已显著下降。优选地, 当针对所讨论的抗凝血剂采用适当的活性分析, 特别是采用对凝血酶敏感的凝血分析, 如蛇静脉酶 (ecarin) 凝血时间或凝血酶凝血时间测定 (H. Bounameaux, Marbet GA, Lammle B, 等人, “Monitoring of heparin treatment. Comparison of thrombin

time, activated partial thromboplastin time, and plasma heparin concentration, and analysis of the behaviour of antithrombin III”, American Journal of Clinical Pathology 1980 74(1):68-72), 抗体结合后的抗凝血活性会下降至少 2 倍、5 倍、10 倍或 100 倍。

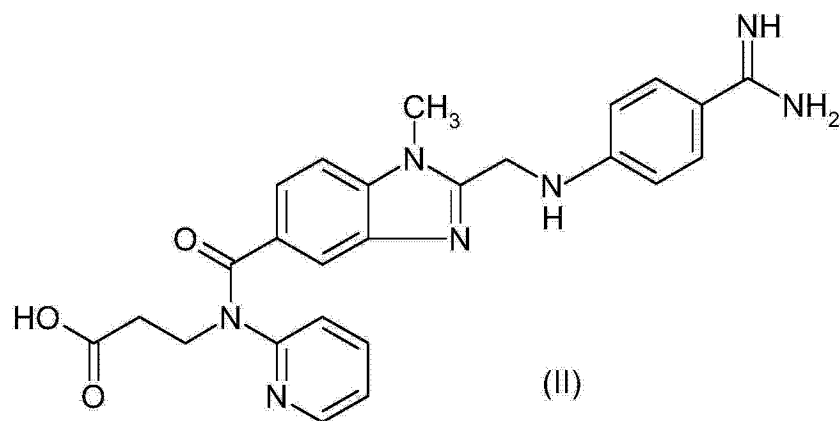
[0055] 为了制备本发明的抗体分子, 本领域技术人员可自多种本领域公知的方法中选择 (Norderhaug 等人, J Immunol Methods 1997, 204(1):77-87; Kipriyanow 及 Le Gall, Molecular Biotechnology 26:39-60, 2004; Shukla 等人, 2007, J. Chromatography B, 848(1):28-39)。

[0056] 抗凝血剂为本领域公知的, 如上文所述。在本发明另一方面中, 该抗凝血剂为直接凝血酶抑制剂、Xa 因子抑制剂或维生素 K 拮抗剂。维生素 K 拮抗剂的实施例为包括华法林在内的香豆素类。Xa 因子的间接主要抑制剂的实例为通过抗凝血酶 III 的活化产生作用的肝素类物质, 其包括数种低分子量的肝素产物 (贝米肝素 (bemiparin)、舍托肝素 (certoparin)、达替肝素 (dalteparin)、依诺肝素 (enoxaparin)、那屈肝素 (nadroparin)、帕肝素 (parnaparin)、瑞肝素 (reviparin)、亭扎肝素 (tinzaparin))、某些寡糖 (磺达肝素 (fondaparinux)、艾卓肝素 (idraparinux))、类肝素 (达那肝素 (danaparoid)、舒洛地特 (sulodexide)、硫酸皮肤素 (dermatan sulfate)), 及直接 Xa 因子抑制剂 (阿哌沙班 (apixaban)、奥米沙班 (otamixaban)、利伐沙班 (rivaroxaban))。凝血酶抑制剂的实施例包括二价水蛭素 (比伐卢定 (bivalirudin)、来匹卢定 (lepirudin)、地西卢定 (desirudin))、及单价化合物阿加曲班 (argatroban) 及达比加群 (dabigatran)。

[0057] 因此, 在另一方面中, 该抗凝血剂为达比加群、阿加曲班、美拉加群、希美加群、水蛭素、比伐卢定、来匹卢定、地西卢定、阿哌沙班、伊度沙班、奥米沙班、利伐沙班、去纤维蛋白多核苷酸、雷马曲班、抗凝血酶 III 或 Drotrecogin α 。

[0058] 本发明上下文中优选的抗凝血剂为达比加群 (CAS 211914-51-1, N-[2-(4-甲基苯基氨基甲基)-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-基羰基]-N-(2-吡啶基)- β -丙氨酸), 其具有化学式 (II):

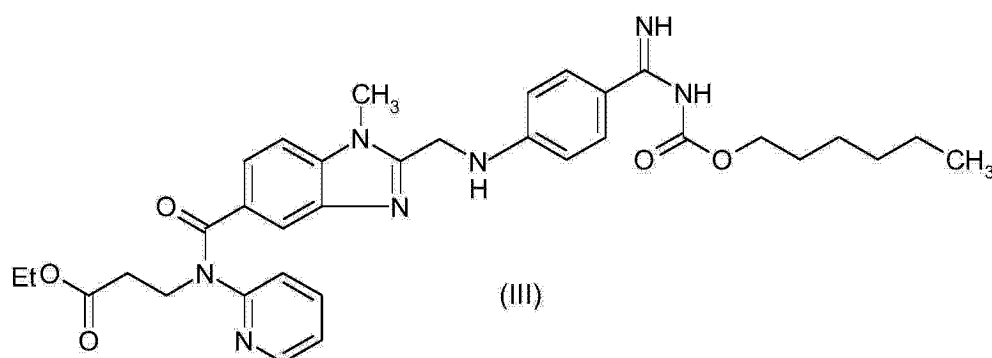
[0059]



[0060] 达比加群为 W098/37075 (其公开了具有凝血酶抑制作用及延长凝血酶时间的作用的化合物) 所公开, 其名称为 1-甲基-2-[N-(4-甲基苯基)-氨基甲基]-苯并咪唑-5-基-甲酸-N-(2-吡啶基)-N-(2-羟基羰基乙基)-酰胺。也可参见 Haeu1 等人, J Med Chem 2002, 45(9):1757-66。

[0061] 达比加群以式 (III) 的前药提供：

[0062]



[0063] 该式 (III) 化合物 (称为达比加群酯 (dabigatran etexilate), CAS211915-06-9 ; 3-[(2-[[4-(己基氧基羰基氨基-亚胺基-甲基)-苯基氨基]-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基)-吡啶-2-基-氨基]-丙酸乙酯) 进入人体后即转化为活性化合物 (II)。达比加群酯的一种优选的多晶型物为甲磺酸达比加群酯。

[0064] 达比加群主要适应症为手术后预防深静脉血栓形成、治疗经确诊的深静脉血栓形成及预防罹患心房纤维性颤动患者中风 (Eriksson 等人, Lancet2007, 370(9591) :949-56 ;Schulman S 等人, N Engl J Med2009, 361(24) :2342-52 ;Connolly S 等人, N Engl J Med2009, 361(12) :1139-51 ;Wallentin 等人, Lancet2010, 376(9745) :975-983)。

[0065] 在人体内,羧酸酯部分基团的葡萄糖苷酸化为达比加群的主要人体代谢途径 (Ebner 等人, Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9) :1567-75)。其结果是形成了 1-O-酰基葡萄糖苷酸 (β 端基差向异构体)。该 1-O-酰基葡萄糖苷酸除了少数水解为苷元外,也可在水溶液中发生非酶性酰基转移,导致形成 2-O-、3-O- 及 4-O- 酰基葡萄糖苷酸。使用纯化的 1-O-酰基葡萄糖苷酸及其异构性重排产物的实验显示,其使活化部分促凝血酶原激酶时间延长的效力与达比加群相当。

[0066] 在本发明另一方面中,该抗体分子结合达比加群及达比加群酯。

[0067] 在本发明另一方面中,该抗体分子结合达比加群及达比加群的 0-酰基葡萄糖苷酸,特别是达比加群的 1-O-酰基葡萄糖苷酸。

[0068] 在本发明另一方面中,该抗体分子还结合达比加群的 2-O-酰基葡萄糖苷酸、3-O-酰基葡萄糖苷酸及 4-O-酰基葡萄糖苷酸。

[0069] 在本发明另一方面中,该抗体分子能够中和达比加群及达比加群的 0-酰基葡萄糖苷酸的活性,特别是达比加群的 1-O-酰基葡萄糖苷酸的活性。

[0070] 在下文中,除非另外指示,否则提及 SEQ ID No. 是指表 1 的序列。

[0071] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有选自 SEQ ID NO:1、7、13、19、25、31、37、43、49、55、61 及 67 的 CDR1、选自 SEQ ID NO:2、8、14、20、26、32、38、44、50、56、62 及 68 的 CDR2 及选自 SEQ ID NO:3、9、15、21、27、33、39、45、51、57 及 63 的 CDR3 的重链可变域,以及具有选自 SEQ ID NO:4、10、16、22、28、34、40、46、52、58 及 64 的 CDR1、选自 SEQ ID NO:5、11、17、23、29、35、41、47、53、59 及 65 的 CDR2 及选自 SEQ ID NO:6、12、18、24、30、36、42、48、54、60、66 及 69 的 CDR3 的轻链可变域。

[0072] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有

SEQ ID NO:1 的 CDR1、SEQ ID NO:2 的 CDR2 及 SEQ ID NO:3 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:4 的 CDR1、SEQ ID NO:5 的 CDR2 及 SEQ ID NO:6 的 CDR3 的轻链可变域。

[0073] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:7 的 CDR1、SEQ ID NO:8 的 CDR2 及 SEQ ID NO:9 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:10 的 CDR1、SEQ ID NO:11 的 CDR2 及 SEQ ID NO:12 的 CDR3 的轻链可变域。

[0074] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:13 的 CDR1、SEQ ID NO:14 的 CDR2 及 SEQ ID NO:15 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:16 的 CDR1、SEQ ID NO:17 的 CDR2 及 SEQ ID NO:18 的 CDR3 的轻链可变域。

[0075] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:19 的 CDR1、SEQ ID NO:20 的 CDR2 及 SEQ ID NO:21 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:22 的 CDR1、SEQ ID NO:23 的 CDR2 及 SEQ ID NO:24 的 CDR3 的轻链可变域。

[0076] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:25 的 CDR1、SEQ ID NO:26 的 CDR2 及 SEQ ID NO:27 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:28 的 CDR1、SEQ ID NO:29 的 CDR2 及 SEQ ID NO:30 的 CDR3 的轻链可变域。

[0077] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:31 的 CDR1、SEQ ID NO:32 的 CDR2 及 SEQ ID NO:33 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:34 的 CDR1、SEQ ID NO:35 的 CDR2 及 SEQ ID NO:36 的 CDR3 的轻链可变域。

[0078] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:37 的 CDR1、SEQ ID NO:38 的 CDR2 及 SEQ ID NO:39 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:40 的 CDR1、SEQ ID NO:41 的 CDR2 及 SEQ ID NO:42 的 CDR3 的轻链可变域。

[0079] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:43 的 CDR1、SEQ ID NO:44 的 CDR2 及 SEQ ID NO:45 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:46 的 CDR1、SEQ ID NO:47 的 CDR2 及 SEQ ID NO:48 的 CDR3 的轻链可变域。

[0080] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:49 的 CDR1、SEQ ID NO:50 的 CDR2 及 SEQ ID NO:51 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:52 的 CDR1、SEQ ID NO:53 的 CDR2 及 SEQ ID NO:54 的 CDR3 的轻链可变域。

[0081] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:55 的 CDR1、SEQ ID NO:56 的 CDR2 及 SEQ ID NO:57 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:58 的 CDR1、SEQ ID NO:59 的 CDR2 及 SEQ ID NO:60 的 CDR3 的轻链可变域。

[0082] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:61 的 CDR1、SEQ ID NO:62 的 CDR2 及 SEQ ID NO:63 的 CDR3 的重链可变域,以

及具有 SEQ ID NO:64 的 CDR1、SEQ ID NO:65 的 CDR2 及 SEQ ID NO:66 的 CDR3 的轻链可变域。

[0083] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子对达比加群具有结合特异性且包含具有 SEQ ID NO:67 的 CDR1、SEQ ID NO:68 的 CDR2 及 SEQ ID NO:9 的 CDR3 的重链可变域,以及具有 SEQ ID NO:64 的 CDR1、SEQ ID NO:65 的 CDR2 及 SEQ ID NO:69 的 CDR3 的轻链可变域。

[0084] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:70 的重链可变域及 SEQ ID NO:71 的轻链可变域。

[0085] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:72 的重链可变域及 SEQ ID NO:73 的轻链可变域。

[0086] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:74 的重链可变域及 SEQ ID NO:75 的轻链可变域。

[0087] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:76 的重链可变域及 SEQ ID NO:77 的轻链可变域。

[0088] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:78 的重链可变域及 SEQ ID NO:79 的轻链可变域。

[0089] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:80 的重链可变域及 SEQ ID NO:81 的轻链可变域。

[0090] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:82 的重链可变域及 SEQ ID NO:83 的轻链可变域。

[0091] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:84 的重链可变域及 SEQ ID NO:85 的轻链可变域。

[0092] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:86 的重链可变域及 SEQ ID NO:87 的轻链可变域。

[0093] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:88 的重链可变域及 SEQ ID NO:89 的轻链可变域。

[0094] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:90 的重链可变域及 SEQ ID NO:91 的轻链可变域。

[0095] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:92 的重链可变域及 SEQ ID NO:93 的轻链可变域。

[0096] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:92 的重链可变域及 SEQ ID NO:94 的轻链可变域。

[0097] 在本发明的另一方面中,任一上述轻链可变域融合于 SEQ ID NO:97 的恒定域。

[0098] 在本发明的另一方面中,任一上述重链可变域融合于 SEQ ID NO:98 的恒定域。

[0099] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:95 的重链及 SEQ ID NO:96 的轻链。

[0100] 在某些方面中,本发明涉及于水性介质中的溶解性较高且聚集趋势较低的针对达比加群的抗体。

[0101] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子为 scFv 分子。在此格式中,本文公开的可

变域可以以适当接头肽彼此融合。构建体可自 N 端至 C 端按以下顺序包含这些元件：(重链可变域)-(接头肽)-(轻链可变域)、或(轻链可变域)-(接头肽)-(重链可变域)。

[0102] 使可编码 sFv 构建体的核酸在宿主细胞(如,大肠杆菌、毕赤酵母菌或哺乳动物细胞系,例如 CHO 或 NS0)中重组表达以产生功能性 scFv 分子的方法是本领域公知的(参见例如:Rippmann 等人, *Applied and Environmental Microbiology* 1998, 64(12):4862-4869; Yamawaki 等人, *J. Biosci. Bioeng.* 2007, 104(5):403-407; Sonoda 等人, *Protein Expr. Purif.* 2010, 70(2):248-253)。

[0103] 具体地,可如下制备本发明的 scFv 抗体分子。在可诱导的启动子的控制下,于不同的大肠杆菌菌株(如 W3110、TG1、BL21、BL21(DE3)、HMS174、HMS174(DE3)、MM294)中表达该构建体。该启动子可选自 lacUV5、tac、T7、trp、trc、T5、araB。培养基优选完全符合 Wilms 等人, 2001 (Wilms 等人, *Biotechnology and Bioengineering* 2001, 73(2):95-103)、DeLisa 等人, 1999 (DeLisa 等人, *Biotechnology and Bioengineering* 1999, 65(1):54-64) 所限定或为其等效物。然而,在批次培养基和/或补料培养基中补充氨基酸(例如异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸及缬氨酸)或复合培养基组分(例如大豆蛋白胨或酵母提取物)可是有利的。以补料-分批模式进行发酵工艺。条件:温度 20 至 40℃、pH 5.5 至 7.5、DO 保持在 20% 以上。消耗初始碳源之后,用如上所述的补料培养基(或等效物)补充该培养物。当发酵器中的细胞干重达到 40 至 100g/L 时,用对应于所使用的启动子系统(例如 IPTG、乳糖、阿拉伯糖)的适当诱导物诱导该培养物。可通过将各诱导物长时间分别补充入发酵器中(以脉冲式全诱导或部分诱导的方式,或其组合方式)来进行该诱导。生产阶段应持续至少 4 小时。通过在转筒离心机、管状转筒离心机或多盘式离心机(disk stack centrifuge)中离心,回收所述细胞,舍弃培养物上清液。

[0104] 将大肠杆菌细胞块重新混悬于 4- 至 8- 倍量的溶胞缓冲液(磷酸盐或 Tris 缓冲液, pH7 至 8.5)中。优选通过高压使溶解细胞均质化,接着于转筒、管状转筒或多盘式离心机中离心回收细胞集结块。用 20mM Tris、150mM NaCl、5mM EDTA、2M 尿素、0.5% Triton X-100, pH8.0 洗涤含有 scFv 包涵体的细胞块 2 至 3 次,接着使用 20mM Tris、150mM NaCl、5mM EDTA, pH8.0 进行两步骤的洗涤。最终,通过转筒、管状转筒或多盘式离心机离心,回收 scFv 包涵体。

[0105] 可在含有促溶剂(如 6M 胍-HCl 或 8 至 10mM 尿素)的 100mM 甘氨酸/NaOH、5mM EDTA、20mM 二硫苏糖醇、pH9.5 至 10.5 溶液中溶解 scFv 包涵体。在培养 30 至 60 分钟之后,将溶液离心,并回收含有目标蛋白的上清液,用于随后的重折叠(refolding)。优选以分批补料模式,通过在重折叠缓冲液中将该蛋白溶液以 1:10 至 1:50 稀释至 0.1 至 0.5mg/ml 的最终蛋白浓度,来进行重折叠。重折叠缓冲液可含有 50 至 100mM Tris 和/或 50 至 100mM 甘氨酸、50 至 150mM NaCl、1 至 3M 尿素、0.5 至 1M 精氨酸、2 至 6mM 的氧化还原系统,例如半胱氨酸/胱氨酸或氧化/还原谷胱甘肽, pH9.5 至 10.5。在 4℃ 培养 24 至 72 小时之后,任选使用 0.22 μm 过滤器过滤重折叠溶液,稀释并将 pH 调至 pH7.0 至 8.0。通过结合模式的阳离子交换色谱(例如 Toyopearl GigaCap S-650M、SP 琼脂糖凝胶 FF 或 S HyperCel™)在 pH7.0 至 8.5 下,分离蛋白。通过线性递增的 NaCl 梯度,进行洗脱。合并含有目标蛋白的级份,且随后在以非结合模式的阴离子交换柱(例如 Toyopearl GigaCap Q-650M、Q- 琼脂糖凝胶 FF、Q HyperCel™)上分离,接着进行阳离子交换纯化步骤(例如 SP Sepharose HP)。

合并目标蛋白纯度至少 90% 的级份,且通过透析或分子排阻色谱法在 PBS 中调配。通过还原性 SDS-PAGE,分析所制备的 scFv 分子的同质性及产物品质,其中该可在约 26kDa 处的单一主要条带中检测到该 scFv。该 scFv 的其他特征分析法包括质谱、RP-HPLC 及 SE-HPLC。

[0106] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子为 Fab 分子。在该格式中,以上公开的可变域可各自融合于免疫球蛋白恒定域,优选人类来源的免疫球蛋白恒定域。因此,重链可变域可融合于 CH₁ 域(所谓 Fd 片段),且轻链可变域可融合于 CL 域。

[0107] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQID NO:100 的轻链。优选地,抗体分子为 Fab 分子。

[0108] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子包含 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQID NO:101 的轻链。优选地,抗体分子为 Fab 分子。

[0109] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子为由 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQID NO:100 的轻链组成的 Fab 分子。

[0110] 在本发明的另一方面中,所述抗体分子为由 SEQ ID NO:99 的重链及 SEQID NO:101 的轻链组成的 Fab 分子。

[0111] 可使用编码 Fab 构建体的核酸,以在宿主细胞(如,大肠杆菌、毕赤酵母菌或哺乳动物细胞系(例如 CHO 或 NS0))中表达所述重链及轻链。本领域已知可使所述链的适当地折叠、缔合及二硫键合至包括 Fd 片段及轻链的功能性 Fab 分子的方法(Burtet 等人, J. Biochem. 2007, 142(6), 665-669; Ning 等人, Biochem. Mol. Biol. 2005, 38: 204-299; Quintero-Hernandez 等人, Mol. Immunol. 2007, 44: 1307-1315; Willems 等人, J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci. 2003; 786: 161-176)。

[0112] 具体地,可如下于 CHO 细胞中制备本发明 Fab 分子。根据制备商的说明书,使用 Lipofectamine™ 及 Plus™ 试剂(Invitrogen),用编码该 Fab 分子的重链及轻链的表达构建体转染在不含血清的培养基的混悬液中生长的 CHO-DG44 细胞(Urlaub G.、Kas E.、Carothers, A. M.、及 Chasin, L. A. (1983). Deletion of the diploid dihydrofolate reductase locus from cultured mammalian cells. Cell 33, 405-412)。48 小时后,在含有 200 μg/ml 的抗生素 G418 且不含次黄嘌呤及胸腺嘧啶的培养基中筛选出所述细胞,以产生经稳定转染的细胞群。随后,以递增浓度(至多 100 或 400nM)添加甲氨蝶呤(MTX)至培养基,使所述稳定转染物进行基因扩增。所述细胞一旦适应,则进行 10 至 11 天的分批补料发酵,以制备 Fab 蛋白物质。

[0113] 于化学上受限制的不含血清的培养基中,培养 CHO-DG44 细胞及其稳定转染体的混悬液培养物。每隔 2 至 3 天,分别以 3×10^5 至 2×10^5 细胞/mL 的接种密度传代培养原种培养物。细胞于 5%CO₂、37℃ 及 120rpm 下的 Multitron HT 培养器(Infors)中的摇瓶中生长。对于补料分批实验而言,在不含抗生素或 MTX 的 BI- 专用生产培养基中,将细胞以 3×10^5 细胞/mL 接种至摇瓶中。在 37℃ 及 5%CO₂(随后,随着细胞数增加,其降至 2%)下,以 120rpm 搅拌所述培养物。每日测定包括细胞数、存活率、pH、葡萄糖及乳酸浓度的培养参数,且根据需要,使用碳酸盐将 pH 调整至 pH7.0。每隔 24 小时,添加 BI- 专用补料溶液。在不同时间点,自上清液取样,通过 ELISA 测定 Fab 产物浓度。10 至 11 天后,通过离心收集该细胞培养液,并转移至纯化实验室。

[0114] 通过色谱及过滤法,自所述补料-分批培养物的上清液纯化 Fab 分子。采用亲和

色谱法（例如蛋白 G 或蛋白 L）作为主要捕获步骤。或者，结合亲和性及结合容量低的情况下，通过利用该分子的 pI 的阳离子交换色谱（CEX），来捕获该 Fab。通过其他正交纯化步骤，移除宿主细胞蛋白及杂质，例如 DNA 或病毒。

[0115] 通过电泳法（例如 SDS-PAGE）分析所制备的 Fab 分子的同质性及产物品质，其中 SDS-PAGE 可在约 50kDa 处检测到 Fab，其为单一主要条带。该 Fab 产物的其他特征分析法包括质谱、等电点聚焦及分子排阻色谱。随后，通过 BIAcore 分析法分析结合活性。

[0116] 通过夹心酶联免疫吸附分析（ELISA），定量分析所述细胞培养物上清液中的 Fab 或全长 IgG 分子。可使用对抗人 γ -Fc 片段（Jackson Immuno Research Laboratories）及人 κ 轻链（过氧化物酶-共轭，Sigma）所产生的抗体检测该全长 IgG。通过山羊多克隆抗人 IgG（H 及 L，Novus）固定该 Fab 片段，并通过对抗人 IgG 所产生的绵羊多克隆抗体（过氧化物酶-共轭，该结合位点）检测。

[0117] 也可通过酶裂解自全长抗体分子产生 Fab 分子。此方法的优点为可应用稳健且高效的发酵及纯化的平台工艺，该工艺适于在所需产物品质下扩大规模及提高产率。对于纯化而言，可采用重组 A 蛋白树脂的亲亲和色谱法作为主要捕获步骤，其通常产生高纯度。

[0118] 为此目的，将编码 Fab 序列的重链融合至人 IgG 抗体分子的 Fc 区域。随后，使用脂质转染法，将所得的表达构建体转染至在不含血清的培养基中悬浮生长的 CHO-DG44 细胞中。48 小时之后，在含有 200 μ g/ml 的抗生素 G418 且不含次黄嘌呤及胸腺嘧啶的培养基中筛选所述细胞，以产生经稳定转染的细胞群。随后，以递增浓度（至多 100 或 400nM）添加甲氨蝶呤（MTX）至培养基中，使所述稳定转染物进行基因扩增。所述细胞一旦适应，即进行 10 至 11 天的补料分批发酵，以制备 IgG 蛋白质。

[0119] 使用重组蛋白 A-亲和色谱法，自该培养物上清液纯化该 IgG 蛋白。为了获得所需的中和 Fab 片段，在木瓜蛋白酶的存在下培养该全长 IgG，所述木瓜蛋白酶在铰链区内裂解 IgG，因而释放两个 Fab 片段及 Fc-部分。

[0120] 通过亲和色谱法（例如蛋白 G 或蛋白 L）分离 Fab 分子。或者，结合亲和性及结合容量低的情况下，通过利用该分子的 pI 的阳离子交换色谱（CEX）来捕获 Fab。通过其他正交纯化步骤移除宿主细胞蛋白及杂质，例如木瓜蛋白酶、DNA 或病毒。

[0121] 在本发明的另一方面中，该抗体分子为如本文所述的抗体分子的氨基酸序列变体。

[0122] 可通过引入适当的核苷酸改变抗体 DNA，或通过肽合成，来制备抗体的氨基酸序列变体。所述变体包括例如删除和 / 或插入和 / 或取代本文实施例的抗体的氨基酸序列内的残基。可进行删除、插入及取代的任何组合，以形成最终构建体，条件是该最终构建体具有所需特性。氨基酸变化也可改变该人源化或变体抗体的翻译后加工，如改变糖基化位点的数量或位置。

[0123] 鉴定抗体的某些残基或区域为突变优选位置的适用方法为称为“丙氨酸扫描突变”，如 Cunningham 及 Wells 所述（Science, 244 :1081-1085(1989)）。此处，由中性或带负电荷的氨基酸（通常为丙氨酸）来识别（例如带电残基，如 arg、asp、his、lys、及 glu）并置换目标残基的残基或基团，以影响所述氨基酸与抗原的相互作用。随后，通过在取代位点处或为其进一步引入或引入其他变体，来纯化那些对所述取代官能展现敏感度的氨基酸位置。因此，虽然预定引入氨基酸序列变体的位点，但是无需预定突变本身的性质。例如为了

分析在指定位点的突变的性能,在该目标密码子或区域进行丙氨酸扫描或随机突变,并针对所需活性筛选所表达的抗体变体。

[0124] 氨基酸序列插入法包括长度范围为自一个残基至含有 100 个或更多残基的多肽的氨基-和/或羧基-末端融合体,及单个或多个氨基酸残基的序列内插入体。末端插入体的实施例包括与抗原表位标签融合的抗体。抗体分子的其他插入变体包括与酶或多肽的抗体的 N-或 C-末端的融合体,其延长该抗体的血清半衰期。

[0125] 另一类型的变体为氨基酸取代变体。这些变体已移除该抗体分子中至少一个氨基酸残基,并将一个不同的残基插入该位置。取代突变基因最受关注的位点包括高可变区,但是也包括 FR 变化。保守性取代基示于以下表中,标题为“优选取代基”。如果所述取代造成生物活性的变化进而带来更实质性的变化,则可引入这些称为“示例性取代基”的取代基或如下参考氨基酸类别的取代基,并筛选产物。

[0126]

原始残基	示例性取代基	优选取代基
Ala (A)	val、leu、ile	val
Arg (R)	lys、gln、asn	lys
Asn (N)	gln、his、asp、lys、arg	gln
Asp (D)	glu、asn	glu
Cys (C)	ser、ala	ser
Gln (Q)	asn、glu	asn
Glu (E)	asp、gln	asp
Gly (G)	ala	ala
His (H)	arg、asn、gln、lys	arg
Ile (I)	leu、val、met、ala、phe、正亮氨酸	leu
Leu (L)	ile、正亮氨酸、val、met、ala、phe	ile
Lys (K)	arg、gln、asn	arg
Met (M)	leu、phe、ile	leu
Phe (F)	tyr、leu、val、ile、ala	tyr
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr、phe	tyr
Tyr (Y)	phe、trp、thr、ser	phe
Val (V)	leu、ile、met、phe、ala、正亮氨酸	leu

[0127] 在蛋白化学中,通常认为:在保持下列各项特性下,通过选择具有显著不同效用的取代法,来实现抗体的生物学特性:(a) 取代区域中的多肽骨架的结构,例如呈片型或螺旋构象,(b) 在目标位点的分子的电荷或疏水性,或(c) 侧链的体积。基于共同的侧链性质将天然存在的残基分为以下几组:

[0128] (1) 疏水性:正亮氨酸、met、ala、val、leu、ile;

[0129] (2) 中性亲水性:cys、ser、thr;

[0130] (3) 酸性:asp、glu;

[0131] (4) 碱性:asn、gin、his、lys、arg;

[0132] (5) 影响链定向的残基:gly、pro;及

[0133] (6) 芳香性:trp、tyr、phe。

[0134] 非保守性取代将会使所述类型中的一成员改变成另一类型。

[0135] 任何不参与保持该人源化或变体抗体的适当构象的半胱氨酸残基也可经取代(一般经丝氨酸取代),以提高该分子的氧化稳定性、避免异常交联,或为细胞毒性或细胞生长抑制性化合物提供确定的共轭点。反之,可使该抗体增加半胱氨酸键以提高其稳定性(尤其是当该抗体为抗体片段(如Fv片段)时)。

[0136] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一或多个高可变区残基。一般而言,用于进一步开发所筛选得到的变体将比产生其的亲本抗体具有改善的生物特性。产生所述取代变体的一个便利方法就是使用噬菌体展示法的亲和性成熟。简而言之,使数个高可变区位点(例如6至7个位点)突变,以在各位点产生所有可能的氨基取代。因此所产生的抗体变体会以单价方式,由丝状噬菌体颗粒展示为与各颗粒内包装的M13的基因III产物的融合体。随后,针对其生物活性(例如结合亲和性),筛选所述噬菌体展示的变体。为了识别用于修饰的候选高可变区位点,可进行丙氨酸扫描突变,以识别主要负责抗原结合的高可变区残基。或者,或此外,可能宜分析该抗原-抗体复合物的晶体结构,以识别该抗体与人达比加群之间的接触点。根据本文所述的技术,所述接触残基及邻近残基为候选的取代基。一旦产生所述变体,则使一组变体接受如本文所述的筛选,且可在一或多个相关分析法中筛选具有卓越特性的抗体,用于进一步研发。

[0137] 另一类抗体的氨基酸变体改变该抗体的初始糖基化模式。“改变”指删除一或多个该抗体中出现的碳水化合物部分,和/或添加一或多个该抗体中不存在的糖基化位点。

[0138] 在某些实施方案中,需要改良本发明的抗体,以添加糖基化位点。抗体的糖基化通常为N-连接或O-连接。N-连接是指该碳水化合物部分附接在天冬酰胺残基的侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸及天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X为除脯氨酸以外的任何氨基酸)为碳水化合物部分经酶促附接天冬酰胺侧链的识别序列。因此,多肽中出现其中任一种三肽序列即产生可能的糖基化位点。O-连接的糖基化是指由糖类N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖、木糖中之一附接羟基氨基酸(最常使用丝氨酸或苏氨酸,但是也可使用5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸)。因此,为了使既定蛋白(例如抗体)糖基化,将该蛋白的氨基酸序列经工程改造为含有一或多个上述三肽序列(对于N-连接的糖基化位点)。也可通过添加或取代一或多个丝氨酸或苏氨酸残基来改变原抗体的序列(对于O-连接的糖基化位点)。

[0139] 通过各种本领域已知的方法制备编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。所述方法包括(但不限于)自天然来源中分离(若天然存在氨基酸序列变体时)或通过如本文所

述的抗体分子的先前制备的变体或非变体型的寡核苷酸介导的突变（或定点突变）、PCR 突变，及序列盒诱变法制备。如上所述，本发明的抗体分子的抗原为抗凝血剂。使用该抗原，通过使动物免疫化或通过如噬菌体展示方法自序列库筛选抗体序列，以产生抗体分子。

[0140] 动物的免疫化方案为本领域公知。为了获得适当的免疫反应，可能需要将该抗原与佐剂（如，磷酸铝、氢氧化铝、角鲨烯或弗氏完全 / 不完全佐剂）组合。

[0141] 本发明上下文中的抗原（如达比加群）大多数为相当小的有机分子，有时在给药给动物后，其无法刺激抗体形成。因此，可能需要将该抗原附接至大分子（如半抗原）上。

[0142] 在另一方面中，本发明涉及一种如上所述的抗体分子，其用于医药中。

[0143] 在另一方面中，本发明涉及一种药物组合物，其包括如上所述的抗体分子和药物载体。

[0144] 为了用于治疗，将抗体分子包括至适于促进对动物或人给药的药物组合物中。可通过将该抗体分子与生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂混合，以冻干或其他干制剂或水溶液或水性或非水性混悬液的形式，来制备该抗体分子的典型制剂。载体、赋形剂、修饰剂或稳定剂在其使用剂量及浓度应无毒性。它们包括缓冲液系统，如磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐及其他无机或有机酸及其盐；抗氧化剂，包括抗坏血酸及甲硫氨酸；防腐剂，如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯己双胺、苯扎氯铵、苄索氯铵、苯酚、丁基醇或苄基醇、对羟基苯甲酸烷基酯（如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯）、邻苯二酚、间苯二酚、环己醇、3-戊醇及间甲酚；蛋白，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯酮或聚乙二醇（PEG）；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、双糖、寡糖或多糖及其他糖类，包括葡萄糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖、糊精或葡聚糖；螯合剂，如 EDTA；糖醇，如甘露糖醇或山梨糖醇；形成盐的抗衡离子（counter-ion），如钠；金属络合物（例如 Zn-蛋白络合物）；和 / 或离子或非离子表面活性剂，如 TWEEN™（聚山梨醇酯）、PLURONICS™ 或脂肪酸酯类、脂肪酸醚类或糖酯类。该抗体制剂中也可含有有机溶剂，如乙醇或异丙醇。该赋形剂也可具有改变释放性或改变吸收性的功能。

[0145] 在一方面中，该药物组合物包含所述抗体分子浓度为 10 至 20mg/ml 的水性缓冲溶液，或由此溶液制成的冻干物。

[0146] 优选的施用模式为肠胃外施用，通过输注或注射（静脉内、肌肉、皮下、腹膜内、皮内），但是也可采用其他施用模式，如通过吸入、透皮、鼻内、口含、口服。

[0147] 在另一方面中，本发明涉及一种如上所述的抗体分子，其用于治疗或预防抗凝血疗法的副作用，尤其是出血事件。

[0148] 在另一方面中，本发明涉及如上所述的抗体分子在药物制备中的用途，所述药物用于治疗或预防本文所述的疾病或病症，特别是抗凝血疗法的副作用。

[0149] 在另一方面中，本发明涉及一种如上所述的抗体分子，其用于逆转抗凝血剂的过量，特别是达比加群或达比加群酯的过量。

[0150] 在另一方面中，本发明涉及一种如上所述的抗体分子，其用作抗凝血剂的解毒剂，特别是达比加群或达比加群酯的解毒剂。

[0151] 在另一方面中，本发明涉及一种治疗或预防抗凝血疗法的副作用的方法，其包括向有此需要的患者给药有效量的如上所述的抗体分子。

[0152] 在另一方面中，本发明涉及一种治疗抗凝血疗法过量事件的方法，其包括向有此

需要的患者给药有效量的如上所述的抗体分子。

[0153] 在另一方面中,本发明涉及用于在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中降低达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的血浆浓度的方法,其包括给予逆转剂的步骤,该逆转剂可中和患者中达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性。

[0154] 在另一方面中,本发明涉及中和达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸活性的逆转剂,其用于正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中,其中该患者有被认为威胁生命的或导致血流动力学损伤的大出血,或其中该患者需要紧急医疗程序。

[0155] 在另一方面中,本发明涉及一种在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中降低达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的血浆浓度的方法,其中该患者有被认为威胁生命的或导致血流动力学损伤的大出血,或其中该患者需要紧急医疗程序,该方法包括给予逆转剂的步骤,该逆转剂可中和患者中达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性。

[0156] 在另一方面中,本发明涉及一种在正在用达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者中逆转达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的抗凝血作用的方法,其中该患者有被认为威胁生命的或导致血流动力学损伤的大出血,或其中该患者需要紧急医疗程序,该方法包括给予逆转剂的步骤,该逆转剂可中和患者中达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性。

[0157] 在一项优选实施方案中,该逆转剂为一种针对达比加群的抗体分子,其能中和达比加群、达比加群酯和 / 或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的抗凝血活性。在另一项优选实施方案中,该逆转剂为本文所述的针对达比加群的抗体分子。

[0158] 优选地,血浆中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的浓度高于 0nM 但少于 1000 μ M,且其中该用于中和达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的逆转剂以达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸相对于逆转剂的化学计算量存在。

[0159] 在另一方面中,血浆中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的浓度高于 0nM 但少于 1000 μ M,且其中该用于中和达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的逆转剂以达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸与逆转剂的摩尔比为 1:1 至 1:100 存在。

[0160] 在另一方面中,血浆中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的浓度为 30nM 至 1000 μ M,且其中该用于中和达比加群或 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的逆转剂以达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸与逆转剂的在 30nM 至 1000 μ M 之间的某一比例存在。

[0161] 在另一方面中,本发明涉及一种在由于凝血功能损伤或创伤而正在经受出血或有出血危险的患者中逆转或降低达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的方法,其包括以下步骤:

[0162] (a) 测定患者中达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸存在的量;

[0163] (b) 给予有效量的药物以逆转或降低该患者中测定的达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性;

[0164] (c) 监测该患者的凝血酶凝固时间以确保达到达比加群或达比加群的 1-0- 酰基葡萄糖苷酸的活性的逆转或降低。

[0165] 在一优选方面中,达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸活性的逆转为 100%。在另一优选方面中,达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸活性的降低是指患者中达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸的活性降低 10% 至 99%。

[0166] 所需给药抗体的“治疗有效量”为预防、减轻或治疗抗凝血疗法的副作用所需的最小量,具体为可有效止血的最小量。这可使用化学计量的抗体分子达成。

[0167] 例如达比加群以推荐剂量给药时,可达到 200nM 的血浆浓度。当使用分子量为约 50kD 的单价抗体分子时,例如使用当静脉推注时,可在约 1mg/kg 的剂量下达到中和。在另一实施方案中,施用于人患者的 Fab 分子的剂量可为每次施用 50 至 1000mg,例如 100、200、500、750 或 1000mg。根据情况(例如达比加群已经过量地给药于患者),给药甚至更高的剂量是合适的,例如每次施用 1250、1500、1750 或 2000mg。合适的剂量可根据所给药的抗凝血剂的类型及剂量、自给药后所经历的时间、该抗原分子的性质、该患者的病症及其他因素而不同。本领域的技术人员已知确定治疗上有效且安全剂量的方法。

[0168] 在另一方面中,本发明涉及一种抗体分子,其对达比加群和 / 或达比加群酯具有结合亲和性。优选地,如例如通过表面等离子共振分析 (Malmqvist M., “Surface Plasmon resonance for detection and measurement of antibodyantigen affinity and kinetics.” Curr Opin Immunol. 1993Apr;5(2):282-6) 或动态排除分析 (KinExA) 技术 (Darling, R. J. 及 Brault P-A., “Kinetic exclusion assay technology : Characterization of Molecular Interactions.” ASSAY and Drug Development Technologies. 2004 年 12 月 2(6) :647-657) 所测定,该抗体分子与达比加群和 / 或达比加群酯结合的亲和性的 K_D 值范围为 0.1pM 至 100 μ M,优选 1pM 至 100 μ M,更优选为 1pM 至 1 μ M。

[0169] 本发明的抗体分子也可用于分析及诊断操作,例如以确定样品(如血浆、血清或其他体液)中的抗原浓度。例如该抗原分子可用于酶联免疫吸附分析法 (ELISA),如实施例中所述。因此,在另一方面中,本发明涉及包含如本文所述的抗体分子的分析及诊断试剂盒,及各自的分析及诊断方法。

[0170] 在另一方面中,本发明涉及一种制备如前述技术方案中任一项的抗体分子的方法,其包括:

[0171] a. 提供一种宿主细胞,其包含一或多个编码与表达调控序列功能相关的抗体分子的核酸,

[0172] b. 培养该宿主细胞,及

[0173] c. 自该细胞培养物回收该抗体分子。

[0174] 本发明还涉及一种含有用于中和口服抗凝血剂的物质(特别是直接凝血酶抑制剂)的制品和试剂盒。所述制品包括具有标签的容器。合适的容器包括例如瓶、小瓶及试管。所述容器可由多种材料制成,例如玻璃、金属、塑料或其组合。所述容器中装有药物组合物,该药物组合物包含本文所述的抗体或达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐。药物组合物中的活性物质是具体的抗体或达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐。抗体容器上的标签指出该药物组合物用于在体内中和或部分中和达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐。

[0175] 本发明的试剂盒包括一各或多个上文所述的容器。其还可包括作为商品所需以及

使用者可能需要的其他物质,包括其他缓冲液、稀释剂、填充剂、针、注射器以及带有使用说明书的包装。

[0176] 在本发明的一个实施方案中,该试剂盒包括本文所述的任一抗体或其药物组合物。例如,该试剂盒可包括(1) 本文所述的任一抗体或其药物组合物、(2) 容器和(3) 标签。

[0177] 在另一实施方案中,该试剂盒包括本文所述的任一抗体或其药物组合物,以及达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐。达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐的形式可为固体、液体或凝胶的形式。在一个优选的实施方案中,所述达比加群酯的药学上可接受的盐为甲磺酸盐。在另一优选的实施方案中,达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐每剂量单位的规格为约 50mg 至约 400mg、约 75mg 至约 300mg、约 75mg 至 150mg 或约 110mg 至约 150mg,以每天一次(QD)或每天两次(BID)给药。例如,该试剂盒可包括:(1) 本文所述的任一抗体或其药物组合物,(2) 达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐的药物组合物,(3) 容器和(4) 标签。

[0178] 在另一实施方案中,该试剂盒包括:(1) 第一药物组合物,其包含达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐,(2) 第二药物组合物,其包含本文所述的任一抗体或其组合物,(3) 指示将所述第一和第二药物组合物分别给药于患者的说明书,其中所述第一和第二药物组合物包含于分别的容器中,且将所述第二药物组合物给药于需要中和或部分中和达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸的患者。

[0179] 本发明还为正在接受达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗的患者提供中和或部分中和达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸的诊断方法,该方法包括给药本文所述的任一抗体、其组合物或其药物组合物。具体地,本发明提供了在患者中中和或部分中和达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸的方法,该方法包括以下步骤:(a) 确认患者正在接受达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐治疗,且确认该患者服用的量;(b) 在进行凝固或凝血试验或分析之前,用本文所述的任一抗体或其组合物中和达比加群或其 1-O- 酰基葡萄糖苷酸,其中达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸会干扰该试验结果或分析结果的精确读数;(c) 使用来自患者的样品进行该凝固或凝血试验或分析,以确定达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸不存在的情况下血块形成的水平;和(d) 调节达比加群、达比加群酯、达比加群的前药或其药学上可接受的盐给药患者的量,以在患者中达到血块形成和分解之间的适当平衡。抗体与达比加群或达比加群的 1-O- 酰基葡萄糖苷酸的摩尔比介于 0.1 至 100 之间,优选介于 0.1 至 10 之间。试验结果或分析结果的精确读数可为纤维蛋白原水平、活化蛋白 C 抵抗或相关测试的精确读数。

实施例

[0180] I. 多克隆抗达比加群抗体的制备

[0181] 为了制备多克隆抗达比加群抗体,用两种不同的半抗原以半抗原与载体蛋白(BSA) 的不同的摩尔输入比来制备 3 种不同的免疫原。

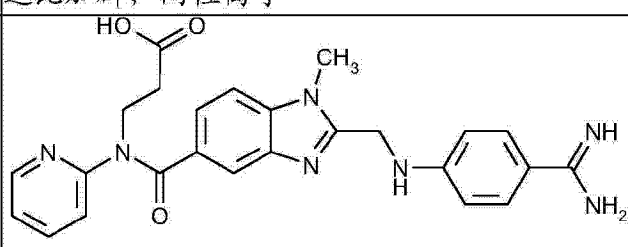
[0182] 为了筛选,制备辣根过氧化物酶(HRP) 缀合物,并进行酶-免疫吸附分析法(ELISA)。

[0183] 通过在蛋白 A 琼脂糖凝胶 FF 上的亲和色谱法,进一步纯化多克隆抗体。

[0184] 1. 材料及方法

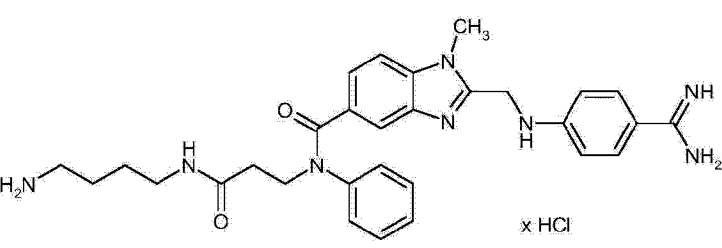
[0185] 测试化合物(达比加群)

[0186]

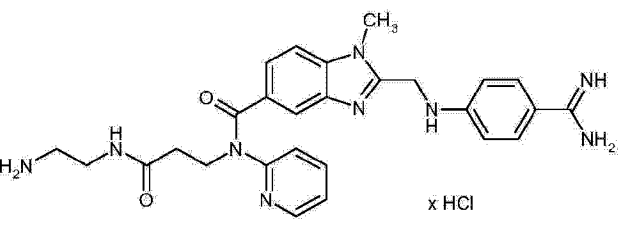
代码	达比加群, 两性离子
结构式:	 $C_{25}H_{25}N_7O_3$ 分子量: 471.5 g/mol

[0187] 1.1 用于合成免疫原及示踪物的半抗原

[0188]

代码:	半抗原 1
配体的结构式:	 $C_{30}H_{36}N_8O_2 \cdot HCl$ 分子量: 577.13 g/mol

[0189]

代码:	半抗原 2
配体的结构式:	 $C_{27}H_{31}N_9O_2 \cdot HCl$ 分子量: 550.07 g/mol

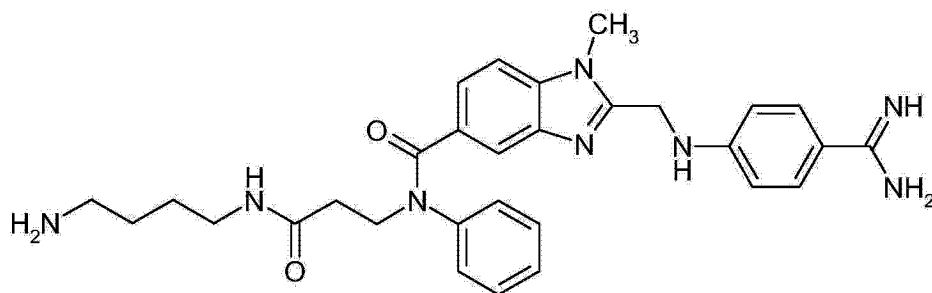
[0190] 1.2 半抗原的合成

[0191] 如下合成所述半抗原(半抗原 1 及半抗原 2):

[0192] 半抗原 1:2-[(4-甲脒基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸

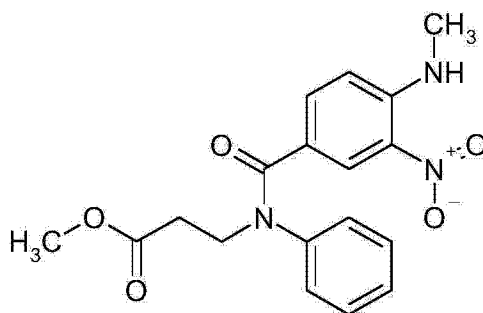
[2-(4-氨基-丁基氨基甲酰基)-乙基]-苯基-酰胺

[0193]



[0194] 1a3-[4-甲基氨基-3-硝基-苯甲酰基]-苯基-氨基]-丙酸甲酯

[0195]



[0196] 在室温,在搅拌下将三乙胺 (50.2mmol) 滴加至 4-甲基氨基-3-硝基-苯甲酰氯 (23.3mmol) 及 3-苯基-氨基-丙酸甲酯 (23.3mmol) 在 80mL 无水四氢呋喃 (THF) 中的溶液中。三小时后,将该反应混合物蒸发至干,用水研磨残余固体,并通过过滤分离该固体产物。

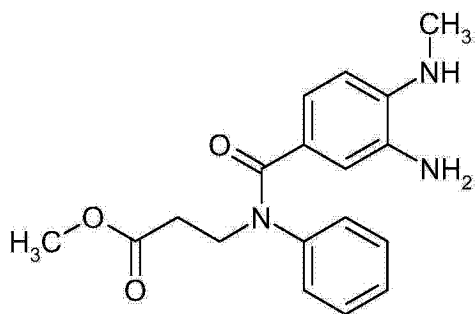
[0197] 产率:99%

[0198] $C_{18}H_{19}N_3O_5$ (357.36)

[0199] TLC(硅胶;二氯甲烷/乙醇 19:1): $R_f=0.48$

[0200] 1b3-[3-氨基-4-甲基氨基-苯甲酰基]-苯基-氨基]-丙酸甲酯

[0201]



[0202] 在室温,于乙醇中,使用 Pd(10%, Pd/C) 作为催化剂进行氢化反应,还原产物 1a 的硝基。

[0203] 产率:99%

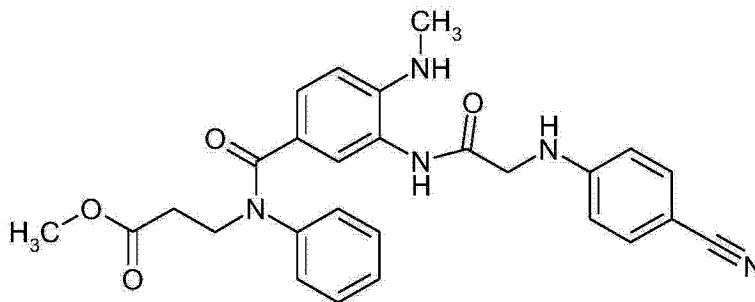
[0204] $C_{18}H_{21}N_3O_3$ (327.38)

[0205] TLC(硅胶;二氯甲烷/乙醇 9:1): $R_f=0.23$

[0206] 质谱 (ESI): $[M+H]^+=328$

[0207] 1c3-({3-[2-(4- 氰基 - 苯基氨基)- 乙酰基氨基]-4- 甲基氨基 - 苯甲酰基 }- 苯基 - 氨基)- 丙酸甲酯

[0208]



[0209] 在室温, 使 1b 产物 (23.2mmol) 及 N-(4- 氰基 - 苯基) - 甘氨酸 (23.2mmol) 与 CDI (23.2mmol) 于无水 THF 中偶合。反应完成后, 将该混合物蒸发至干, 且未再进一步纯化即使用该粗产物。

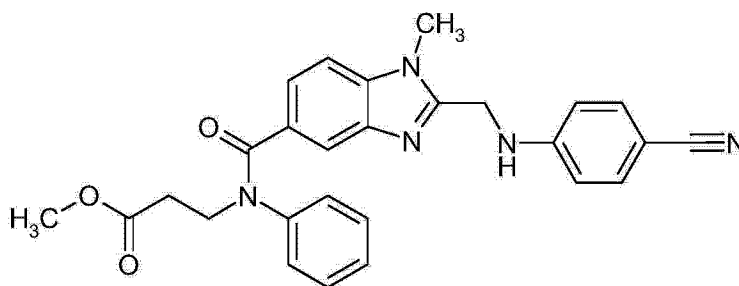
[0210] 产率 :97%

[0211] $C_{27}H_{27}N_5O_4$ (485.54)

[0212] 质谱 (ESI) : $[M+H]^+ = 486$

[0213] 1d3-({2-[(4- 氰基 - 苯基氨基)- 甲基]-1- 甲基 -1H- 苯并咪唑 -5- 羰基 }- 苯基 - 氨基)- 丙酸甲酯

[0214]



[0215] 将 1c 产物 (22.6mmol) 在 100mL 浓乙酸中的溶液加热至回流, 持续 1 小时。随后, 将该溶液蒸发至干, 用水研磨残余固体, 并在搅拌下, 将 pH 调整至约 8 至 9。通过乙酸乙酯萃取分离该粗产物, 并经硅胶色谱法 (洗脱液 : 二氯甲烷 / 乙醇 1:1) 纯化。

[0216] 产率 :58%

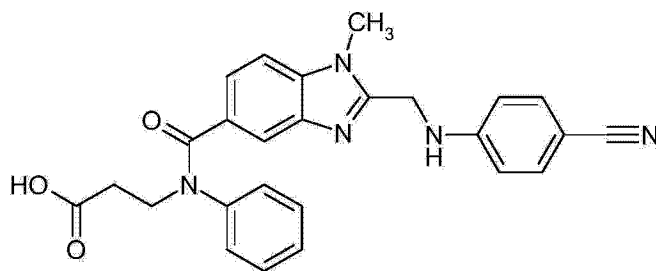
[0217] $C_{27}H_{25}N_5O_3$ (467.52)

[0218] TLC (硅胶 ; 二氯甲烷 / 乙醇 9:1) : $R_f = 0.71$

[0219] 质谱 (ESI) : $[M+H]^+ = 468$

[0220] 1e3-({2-[(4- 氰基 - 苯基氨基)- 甲基]-1- 甲基 -1H- 苯并咪唑 -5- 羰基 }- 苯基 - 氨基)- 丙酸

[0221]



[0222] 将氢氧化钠 (20.0mmol) 添加至 1d 产物 (13.0mmol) 在 100mL 甲醇中的溶液中。在 40℃, 搅拌该混合物 2.5 小时, 且随后蒸发至干。用 100mL 水搅拌残余固体, 并用浓乙酸将 pH 调整至约 6。通过过滤分离所沉淀的产物, 用水洗涤, 并在 60℃ 干燥。

[0223] 产率 :88%

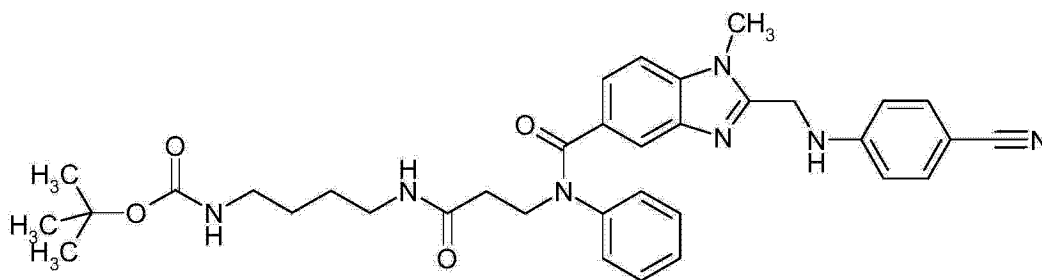
[0224] $C_{26}H_{23}N_5O_3$ (453.49)

[0225] TLC(硅胶;二氯甲烷/乙醇 9:1) : R_f =0.33

[0226] 质谱 (ESI) : $[M+H]^+$ =454

[0227] 1f {4-[3-({2-[(4-氰基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-苯基-氨基)-丙酰基氨基]-丁基}-氨基甲酸叔丁酯

[0228]



[0229] 在室温, 搅拌 1e 产物 (5.23mmol)、2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲基脒四氟硼酸盐 (TBTU, 5.23mmol) 及 N-甲基-吗啉 (5.23mmol) 在 20mL DMF 中的溶液 30 分钟。随后, 添加 (4-氨基-丁基)-氨基甲酸叔丁酯 (5.23mmol), 并在室温再搅拌该混合物 24 小时。随后, 用水 (100mL) 稀释该混合物, 并通过乙酸乙酯萃取分离该产物。

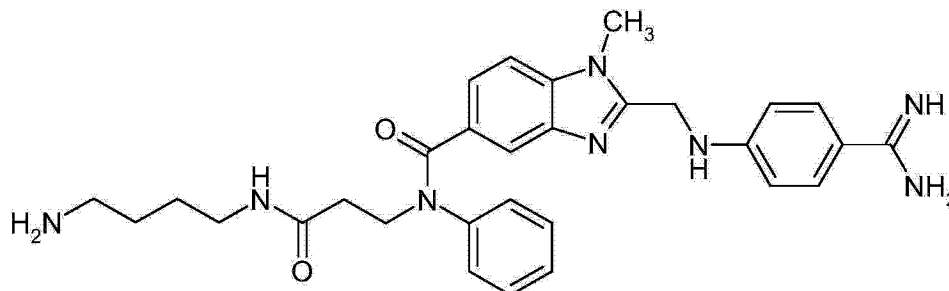
[0230] 产率 :92%

[0231] $C_{35}H_{41}N_7O_4$ (623.75)

[0232] TLC(硅胶;二氯甲烷/乙醇 9:1) : R_f =0.51

[0233] 1g2-{[4-(甲脒基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸[2-(4-氨基-丁基氨基甲酰基)-乙基]-苯基-酰胺}

[0234]



[0235] 将 1f 产物 (4.81mmol) 溶于 HCl 的饱和乙醇溶液 (250mL) 中,并在室温搅拌该混合物过夜,且随后在 30℃ 蒸发至干。将残余的粗物质溶于 200mL 无水乙醇中,随后添加碳酸铵 (48.1mmol),并在室温搅拌该混合物过夜。蒸发该溶剂之后,用约 5mL 乙醇研磨残余粗物质,过滤分离未溶解的物质,且在 30℃ 蒸发该溶剂。随后,将该产物溶于 30mL 水中,并用约 2g 木炭搅拌该溶液,过滤并蒸发至干。

[0236] 产率:90%

[0237] $C_{30}H_{36}N_8O_2$ (540.67)

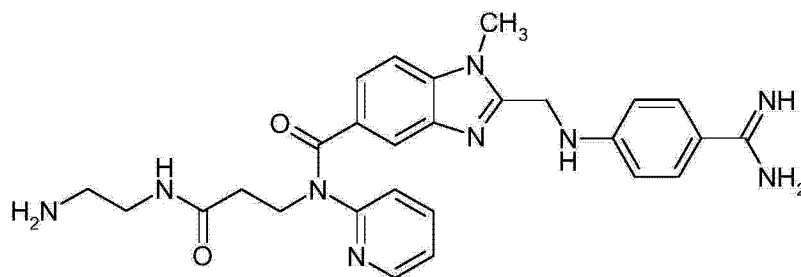
[0238] TLC(反相 RP-8;甲醇/5%NaCl 水溶液 9:1): $R_f=0.79$

[0239] 质谱 (ESI): $[M+H]^+=541$

[0240] $[M+Cl]^- = 575/7$

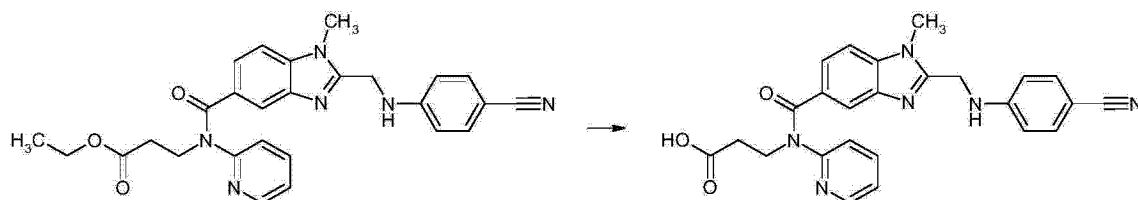
[0241] 半抗原 2:2-[(4-甲脒基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-甲酸
[2-(2-氨基-乙基氨基甲酰基)-乙基]-吡啶-2-基-酰胺

[0242]



[0243] 2a3-({2-[(4-氰基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-吡啶-2-基-氨基)-丙酸

[0244]



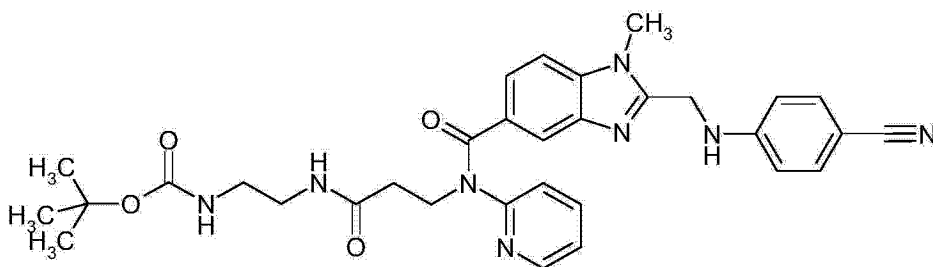
[0245] 将 3-({2-[(4-氰基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-吡啶-2-基-氨基)-丙酸乙酯 (41.4mmol) 添加至氢氧化钠 (50.0mmol) 在 500mL 乙醇及 50mL 水中的溶液中。在室温,搅拌该混合物 3 小时,随后蒸馏出约 350mL 乙醇,添加约 100mL 水,并将 pH 调整至 6。随后,添加乙醚 (50mL),并搅拌该混合物过夜。通过过滤分离该产物,且无需进一步而纯化使用。

[0246] 产率:78%

[0247] $C_{25}H_{22}N_6O_3$ (454.48)

[0248] 2b{2-[3-({2-[(4-氰基-苯基氨基)-甲基]-1-甲基-1H-苯并咪唑-5-羰基}-吡啶-2-基-氨基)-丙酰基氨基]-乙基}-氨基甲酸叔丁酯

[0249]



[0250] 在室温, 搅拌 2a 产物 (2.20mmol)、2-(1H- 苯并三唑 -1- 基)-1, 1, 3, 3- 四甲基脒鎓四氟硼酸盐 (TBTU, 2.20mmol) 及 N- 甲基 - 吗啉 (2.20mmol) 在无水的四氢呋喃 (100mL) 中的溶液 15 分钟。随后, 添加 (2- 氨基 - 乙基)- 氨基甲酸叔丁酯 (2.20mmol), 并在室温再搅拌该混合物 24 小时。用 40mL 水稀释该混合物, 通过乙酸乙酯萃取, 分离该产物, 并通过色谱法 (硅胶 ; 二氯甲烷 / 甲醇 15:1) 纯化。

[0251] 产率 : 61%

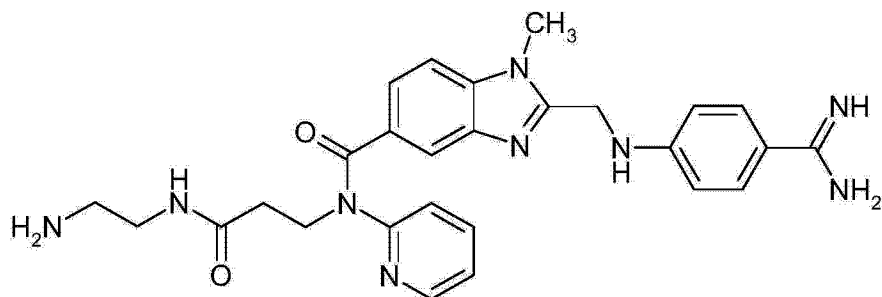
[0252] $C_{32}H_{36}N_8O_4$ (596.68)

[0253] 质谱 (ESI) : $[M+H]^+ = 597$

[0254] $[M+H]^- = 595$

[0255] 2c2-[(4- 甲脒基 - 苯基氨基)- 甲基]-1- 甲基 -1H- 苯并咪唑 -5- 甲酸 [2-(2- 氨基 - 乙基氨基甲酰基)- 乙基]- 吡啶 -2- 基 - 酰胺

[0256]



[0257] 将 2b 产物 (1.34mmol) 添加至 HCl 在无水的乙醇 (30mL) 中的饱和溶液中。在室温搅拌该溶液 5 小时, 随后在 30°C 蒸发至干。添加乙醇 (30mL) 及碳酸铵 (13.0mmol), 并在室温搅拌该混合物过夜。随后, 蒸发该溶剂, 残留物使用约 4mL 二氯甲烷 / 甲醇 (30:1) 的混合物研磨 5 次, 过滤并蒸发, 以自无机盐中分离该产物。

[0258] 产率 : 27%

[0259] $C_{27}H_{31}N_9O_2$ (513.61)

[0260] 质谱 (ESI) : $[M+Cl]^- = 548/50$

[0261] $[M+HCl+Cl]^- = 584/6$

[0262] $[M+H]^+ = 514$

[0263] 2. 化学品

[0264] 2.1 用于试剂合成的化学品

[0265]

名称	规格	供应商	目录号
1,4-苯醌		Fluka	12309
牛血清白蛋白 (BSA)		Serva	11920
1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑)		Fluka	21861
柠檬酸	分析级	Riedel-De Haën	33114
N,N-二甲基甲酰胺(DMF)	用于合成	Merck	822275
乙醇	分析级	Baker	8006
弗氏佐剂(CFA)	完全	Sigma	F-5881
弗氏佐剂(IFA)	不完全	Sigma	F-5506
甘油	纯	Merck	104093
辣根过氧化物酶 HRP	25000 U / 100 mg	Boehringer Mannheim	108090
H ₂ SO ₄	分析级	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	分析级	Merck	4873
NaHCO ₃	分析级	Merck	106329
Na ₂ CO ₃	分析级	Merck	106392
(NH ₄) ₂ SO ₄	分析级	Merck	101217
邻苯二胺	30 mg 片剂	Sigma	P8412
过硼酸钠	纯	Riedel-De Haën	11621
百里酚	纯	Merck	8167

[0266] 2.2 用于 ELISA 的化学品

[0267]

名称	规格	供应商	目录号
柠檬酸	分析级	Riedel-De Haën	33114
H ₂ SO ₄	分析级	Riedel-De Haën	30743
KH ₂ PO ₄	分析级	Merck	4873
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	分析级	Merck	6580
NaCl	分析级	Merck	6404
NaOH	分析级	Merck	6498
邻苯二胺	30 mg 片剂	Sigma	P8412
过硼酸钠	纯	Riedel-De Haën	11621
Tween 20	纯	Serva	37470

[0268] 2.3 用于 ELISA 的缓冲液

[0269]

名称	成分	用途
缓冲液 1 稳定性:	0.05 M Na_2HPO_4 / KH_2PO_4 0.15 M NaCl , pH = 7.4 在约+4°C, 4 周	涂布
缓冲液 2 稳定性:	如缓冲液 1, 含 5 g/l BSA 在约+4°C, 10 天	分析缓冲液
缓冲液 3 稳定性:	如缓冲液 1, 含 5 g/l BSA 和 0.1 g/L 硫柳汞 4 周 在约+4°C	微量培养板阻断; 储存
缓冲液 4 稳定性:	0.1 M 柠檬酸, 用 NaOH 调整至 pH 5.0, 6.5 mmol/L 过硼酸钠 柠檬酸: 在约+4°C, 6 个月 含过硼酸盐: 10 天 在约+4°C	邻苯二胺的底物缓冲液
洗涤溶液 稳定性:	水, 0.5 g/L Tween 20 在常温, 10 天	微量培养板洗涤
停止试剂 稳定性:	2.25 M H_2SO_4 在常温, 5 年	中止邻苯二胺颜色变化

[0270] 使用来自 Elgastat Maxima-HPLC 超纯水处理系统的水, 制备缓冲溶液。

[0271] 3. 免疫原的合成

[0272] 为了刺激兔的免疫系统以制备针对达比加群的多克隆抗体, 使用 1, 4- 苯醌或 1, 1'- 羰基 - 二 - (1, 2, 4- 三唑) 作为偶合剂, 使所述半抗原 (半抗原 1 及半抗原 2) 与载体蛋白牛血清白蛋白 (BSA) 偶合, 来合成三种免疫原 (批号 GL256、GL258 及 GL262)。

[0273] 合成 GL256 时, 使用 1, 4- 苯醌作为具有两个反应性位点的同型双官能性 (homobifunctional) 化合物。首先, 在酸性 pH 下, 仅在该两个位点中的一处与氨基反应, 且在碱性 pH 下, 另一位点在最低聚合度下反应。

[0274] 使用 1, 1'- 羰基 - 二 - (1, 2, 4- 三唑) 作为偶合剂, 以半抗原对载体蛋白的不同的输入比合成 GL258 及 GL262。

[0275] 3. 1GL256 的合成

[0276] 向 $0.75 \mu\text{mol}$ BSA 在 8.5mL 0.1M KH_2PO_4 - 缓冲液 (pH=4.5) 中的溶液中, 添加 0.416mmol 1, 4- 苯醌 (于 1.5mL 乙醇中), 在室温及黑暗下培养 1.5 小时。随后, 使该溶液通过经 0.15M NaCl 平衡的 sephadex G25 柱, 以除去过量的 1, 4- 苯醌 (最终体积 12.5mL)。

[0277] 在搅拌下, 将 2.5mL ($0.15 \mu\text{mol}$) 纯化的 BSA- 溶液缓慢添加至 $525 \mu\text{mol}$ 半抗原半抗原 1 溶于 2mL 0.1M $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ - 缓冲液 (pH=8.5) 中的溶液中。在添加该 BSA 溶液期间, 将 pH 调整至约 8.0。该半抗原与该载体蛋白的摩尔输入比为 3500:1。

[0278] 在室温培养过夜之后, 由该免疫原相对于 1 升蒸馏水透析 6 次。薄层色谱法显示, 没有未结合的半抗原的斑点残留于该半抗原 - 载体缀合物中。

[0279] 取该免疫原分装冷冻储存在 -20°C 。通过 UV 吸收光谱在 302nm 处测定, 该免疫原上清液中的 BSA 经半抗原取代的程度为约 1:18。最终溶液中的免疫原含量为 0.75mg GL256/ mL 。

[0280] 3. 2GL258 的合成

[0281] 在室温,制备 158 μ Mol 半抗原 2 在 6.3mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中的溶液。添加 158 μ Mol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑),并先在 10°C 培养 4 小时,且随后在室温培养 30 分钟。用薄层色谱法检查该化学反应,且为约 20-25%。

[0282] 随后,将 0.75 μ Mol BSA 溶于 2mL 0.13M NaHCO_3 溶液中,并在搅拌下滴加 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将 pH 调整至约 8.3。随后,在搅拌下将该半抗原溶液 (6.3mL) 及 4mL 0.13M NaHCO_3 溶液滴加至该 BSA 溶液中,且将 pH 调整至 8.4。针对该免疫原 GL258 而言,该半抗原与该载体蛋白的摩尔输入比为 210:1。

[0283] 在室温及搅拌下培养过夜之后,由该免疫原相对于 1 升蒸馏水透析 6 次。薄层色谱法显示,没有未结合半抗原的斑点残留于该半抗原-载体缀合物中。

[0284] 该免疫原分装冷冻储存在 -20°C。通过 UV 吸收光谱在 302nm 处测定,该免疫原上清液中的 BSA 经半抗原取代的程度为约 1:5。最终溶液中的免疫原含量为 0.28mg GL258/mL。

[0285] 3.3GL262 的合成

[0286] 在室温,制备 225 μ Mol 半抗原 2 在 8.75mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中的溶液。添加 225 μ Mol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑),并在 10°C 培养 4 小时。用薄层色谱法检查该化学反应,且为约 20 至 25%。

[0287] 随后,将 0.49 μ Mol BSA 溶于 2mL 0.13M NaHCO_3 溶液中,并在搅拌下滴加 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将 pH 调整至约 8.2。随后,在搅拌下,将该半抗原溶液 (8.75mL) 及 6mL 0.13M NaHCO_3 溶液滴加至该 BSA 溶液中,且将 pH 调整至 8.3。针对该免疫原 GL262 而言,该半抗原与该载体蛋白的摩尔输入比为 460:1。

[0288] 在室温及搅拌下培养过夜之后,由该免疫原相对于 1 升蒸馏水透析 6 次。薄层色谱法显示,没有未结合半抗原的斑点残留于该半抗原-载体缀合物中。

[0289] 该免疫原分装冷冻储存在 -20°C。通过 UV 吸收光谱在 302nm 处测定,该免疫原上清液中的 BSA 经半抗原取代的程度为约 1:32。最终溶液中的免疫原含量为 0.71mg GL262/mL。

[0290] 4. 缀合物的合成

[0291] 4.1GL261 的合成

[0292] 在室温制备 37.4 μ Mol 半抗原 2 在 1.5mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中的溶液。添加 37.5 μ Mol 1,1'-羰基-二-(1,2,4-三唑),且先在 10°C 培养 4 小时,随后在室温培养 30 分钟。用薄层色谱法检查该化学反应,且为约 20 至 25%。

[0293] 随后,将 1.125 μ Mol 辣根过氧化物酶 (HRP) 溶于 0.4mL 0.13M NaHCO_3 溶液中,并在搅拌下滴加 0.267mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。将 pH 调整至约 8.2。随后,在搅拌下,将该半抗原溶液 (22.5 μ Mol) 及 0.57mL 0.13M NaHCO_3 溶液滴加至该 HRP 溶液中,且将 pH 调整至 8.4。针对该 HRP 缀合物 GL261 而言,该半抗原与该 HRP 的摩尔输入比为 20:1。

[0294] 在室温及搅拌下培养过夜之后,通过凝胶色谱法将该 HRP 缀合物自有机溶剂及过量的半抗原中分离。使该溶液通过经 0.1M 磷酸盐缓冲液 pH7.0 平衡的 sephadex G25 柱。

[0295] 在最终浓度的半抗原-HRP 缀合物 (示踪物, 5.64mg/mL) 中加上 BSA (其形成约 10mg/mL 的浓度)、等体积的甘油 (以避免冻结) 及百里酚晶体 (以避免细菌生长)。将该示踪物溶液标为批号 GL261 并分装储存于 -20°C。

[0296] 通过 UV 光谱在 302nm 处测定, HRP 经半抗原取代的程度为约 1:0.2。

[0297] 使用邻苯二胺 (OPD) 作为底物及使用天然 HRP 作为参考物质, 于 BSA- 阻断的微量培养板中测量该示踪物的比活性。在黑暗中培养经稀释的 HRP 标准品或该半抗原-HRP 缀合物与底物溶液的混合物 30 分钟, 用硫酸终止反应, 并在 490nm 处测量吸光度。残留活性为天然 HRP 的 94%, 且该缀合物制剂在甘油中的比活性为 611U/mL。

[0298] 示踪物规格总结:

[0299]

类型:	半抗原 2-辣根过氧化物酶 (批号 GL 261)
蛋白含量:	5.64 mg/mL
比活性:	108 U/mg, 611 U/ml, (底物愈创木酚(Guajacol)和 H ₂ O ₂ , 25°C)
储存:	在约-20°C
操作稀释度:	1:40000

[0300] 5. 免疫化及抗体的制备

[0301] 5.1 兔的免疫化

[0302] 用 100 μg 免疫原 GL256、GL258 及 GL262 在 0.5mL0.9%NaCl 溶液及 0.5mL 弗氏完全佐剂 (CFA) 中的乳液, 使 12 只 3 个月大的雌性金吉拉兔 (Chinchilla Rabbit) 免疫。在下一个个月进行数次追加免疫化。针对第三次免疫化, 使用 0.5mL 弗氏不完全佐剂 (IFA)。每次都在四个皮下位点及四个肌肉位点处进行免疫化。

[0303] A 组 - 免疫原 GL256

[0304]

兔 1 #50

兔 2 #51

兔 3 #52

兔 4 #53

[0305] B 组 - 免疫原 GL258

[0306]

兔 5 #54

兔 6 #55

兔 7 #56

兔 8 #57

[0307] C 组 - 免疫原 GL262

[0308]

兔 9 #46

兔 10 #47

兔 11 #48

兔 12 #49

[0309] 免疫化方案：

[0310]

第 1 天	第一次免疫化，每只动物使用含于 CFA 中的 100 µg 免疫原/mL
第 29 天	第二次免疫化，每只动物使用含于 CFA 中的 100 µg 免疫原/mL
第 57 天	第三次免疫化，每只动物使用含于 IFA 中的 100 µg 免疫原/mL 由于使用免疫原 GL256 及 GL258，兔的健康状态可能变得更差 兔 7 #56 未处理
第 67 天	第一次抽血(2 mL/动物)
第 81 天	第四次免疫化，每只动物使用含于 CFA 中的 100 µg 免疫原/mL
第 91 天	第二次抽血(25 mL/动物)
第 112 天	第五次免疫化，每只动物使用含于 CFA 中的 100 µg 免疫原/mL
第 122 天	错置动物编号，第三次最后抽血(放血)*

[0311] *1 至 12 号兔在第 5 次免疫化后 10 天完全放血。

[0312] 在使用甲苯噻嗪 (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Germany) 及盐酸氯胺酮 (Ketavet®, Parke-Davis, Freiburg, Germany) 的麻醉下，自颈动脉进行放血。

[0313] 5.2 兔血清的分析

[0314] 血清通过将凝固的兔血离心而制备。通过硫酸铵沉淀法并通过 SephadexG25 柱的脱盐，获得蛋白级分。

[0315] 通过标准 ELISA 操作，在该兔血清所分离的各蛋白级分中筛选抗达比加群效价。

[0316] 筛选 -ELISA：

[0317]

步骤	操作
----	----

- | | |
|---|--|
| A | 在常温，在缓冲液 1 中，使来自每次抽血的蛋白级分吸附在微量培养板(100 μ L/孔; 1, 2 或 4 μ g/mL)上过夜。
洗涤微量板 4 次，每次 450 μ L
用 250 μ L 缓冲液 3 阻断至少 1 小时 |
| B | 洗涤微量板 4 次，每次 450 μ L |
| C | 将以下物质添加至微量培养板的各孔中(一式三份):
+ 50 μ L 缓冲液 2
+ 50 μ L 含于缓冲液 2 中的校准标准品
+ 25 μ L 达比加群-辣根过氧化物酶(HRP)缀合物 GL 261(示踪物)(1/40000) |
| D | 用胶粘箔密封微量板，所有微量板的样品在常温完成分配，在振荡器中培养 4 小时 |
| E | 洗涤微量板 4 次，每次 450 μ L |
| F | 将 100 μ L 邻苯二胺 HCl, 2.7 mg/ml (含于 11 mL 缓冲液 4 中的一片 30 mg 片剂)添加至微量培养板的各孔中
在常温，黑暗中培养 30 分钟 |
| G | 将 100 μ L H ₂ SO ₄ (2.25 M)添加至微量培养板的各孔中摇晃 5 分钟 |
| H | 读取吸光度; 测定波长: 490 nm, 参照波长: 650 nm |
-

[0318] 5.3 于兔血清中检测抗达比加群抗体

[0319] 最后三栏 :针对达比加群的值

[0320] 第 2 次抽血

[0321]

兔子	免疫原	涂布浓度 [$\mu\text{g/ml}$]	浓度		
			[Mol]	[Ext]	[%]
1 #50	GL256	2	0	1.812	100%
			2.E-12	1.574	87%
			2.E-11	0.461	25%
			2.E-10	0.059	3%
2 #51	GL256	1	0	2.193	100%
			2.E-12	2.086	95%
			2.E-11	1.515	69%
			2.E-10	0.207	9%
3 #52	GL256	2	0	1.513	100%
			2.E-12	1.419	94%
			2.E-11	0.728	48%
			2.E-10	0.107	7%
4 #53	GL256	2	0	1.474	100%
			2.E-12	1.388	94%
			2.E-11	0.848	58%
			2.E-10	0.142	10%
5 #54	GL258	1	0	2.114	100%
			2.E-12	1.892	89%
			2.E-11	0.646	31%
			2.E-10	0.159	8%
6 #55	GL258	1	0	1.295	100%
			2.E-12	0.937	72%
			2.E-11	0.265	20%
			2.E-10	0.140	11%
7 #56	GL258	2	0	1.611	100%
			2.E-12	1.372	85%
			2.E-11	0.424	26%
			2.E-10	0.145	9%
8 #46	GL258	1	0	1.640	100%
			2.E-12	1.290	79%
			2.E-11	0.425	26%
			2.E-10	0.196	12%
9 #47	GL262	2	0	1.854	100%
			2.E-12	1.534	83%
			2.E-11	0.530	29%
			2.E-10	0.254	14%
10 #48	GL262	2	0	1.458	100%
			2.E-12	1.142	78%
			2.E-11	0.300	21%
			2.E-10	0.131	9%
11 #49	GL262	4	0	1.646	100%
			2.E-12	1.393	85%
			2.E-11	0.460	28%
			2.E-10	0.257	16%
12 #50	GL262	2	0	1.605	100%
			2.E-12	1.400	87%
			2.E-11	0.389	24%
			2.E-10	0.109	7%

[0322] 最后抽血

[0323]

兔子	免疫原	涂布浓度 [$\mu\text{g/ml}$]	浓度 [Mol]	[Ext]	[%]
1	?	1	0	1.589	100%
			2.E-12	1.442	91%
			2.E-11	0.491	31%
			2.E-10	0.130	8%
2	?	1	0	1.375	100%
			2.E-12	1.041	76%
			2.E-11	0.293	21%
			2.E-10	0.101	7%
3	?	1	0	1.400	100%
			2.E-12	1.081	77%
			2.E-11	0.288	21%
			2.E-10	0.097	7%
4	?	1	0	1.183	100%
			2.E-12	0.882	75%
			2.E-11	0.396	33%
			2.E-10	0.183	15%
5	?	1	0	1.335	100%
			2.E-12	1.066	80%
			2.E-11	0.183	14%
			2.E-10	0.057	4%
6	?	1	0	1.214	100%
			2.E-12	0.976	80%
			2.E-11	0.250	21%
			2.E-10	0.123	10%
7	?	2	0	1.822	100%
			2.E-12	1.702	93%
			2.E-11	0.661	36%
			2.E-10	0.189	10%
8	?	2	0	1.234	100%
			2.E-12	1.085	88%
			2.E-11	0.671	54%
			2.E-10	0.147	12%
9	?	1	0	1.911	100%
			2.E-12	1.862	97%
			2.E-11	0.980	51%
			2.E-10	0.292	15%
10	?	1	0	1.933	100%
			2.E-12	1.891	98%
			2.E-11	1.055	55%
			2.E-10	0.076	4%
11	?	1	0	1.874	100%
			2.E-12	1.817	97%
			2.E-11	1.539	82%
			2.E-10	0.181	10%
12	?	2	0	1.599	100%
			2.E-12	1.425	89%
			2.E-11	0.475	30%
			2.E-10	0.050	3%

[0324] 自第2次抽血筛选所有兔的蛋白级分之后,显然,兔5号(#54)与优选的半抗原(半抗原2)具有抗达比加群抗体的最高效价。此外,仅使用低浓度的分析物(达比加群)即可置换抗体结合位点的示踪物。

[0325] 在最后的第3次抽血的筛选中,因为缺少关于所用免疫原的信息,所以使用低浓度的分析物(达比加群)置换抗体结合位点的示踪物用作主要决定标准。因此,兔2、3及

5 号用于进一步纯化。

[0326] 5.4 多克隆抗体的纯化

[0327] 兔 5 号 (#54) 第 2 次抽血及兔 2、3 及 5 号第 3 次抽血 (最后一次抽血) 的抗血清使用硫酸铵沉淀。在 10℃, 以 4500U/ 分钟离心该沉淀 30 分钟, 自该溶液分离, 并再溶于 Tris 缓冲液中。重复此操作。通过在蛋白 A 琼脂糖凝胶 FF 上的亲和色谱法进一步纯化。该柱缓冲液为 0.01M Tris pH=7.5, 且使用 0.1M 甘氨酸 pH=3.0 洗脱。合并含有兔 IgG 的级分。通过在 280nm 的 UV 光谱, 测定蛋白浓度。

[0328] 抗体规格总结:

[0329]

免疫原:	半抗原 2-BSA (批号 GL258)
兔:	5 号 (#54) 血清 (第二次抽血)
蛋白含量:	1.85 mg/mL
储存:	在约 -20℃

[0330]

免疫原:	半抗原 1-BSA (GL256) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL258) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL262)
兔:	收集的 2 号血清 (最后一次抽血)
蛋白含量:	3.9 mg/mL
储存:	在约 -20℃

[0331]

免疫原:	半抗原 1-BSA (GL256) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL258) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL262)
兔:	3 号血清 (最后一次抽血)
蛋白含量:	9.96 mg/mL
储存:	在约 -20℃

[0332]

免疫原:	半抗原 1-BSA (GL256) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL258) 或 半抗原 2-BSA (批号 GL262)
兔:	5 号血清 (最后一次抽血)
蛋白含量:	5.72 mg/mL
储存:	在约 -20℃

[0333] II. 达比加群的中和

[0334] 进行两个系列的实验, 以显示所述抗体于活体外针对达比加群抗凝血活性的效果。从实验室中得到这四种多克隆抗体, 并在人血浆中进一步测试。该测试为功能测试 (凝血酶凝血时间)。

[0335] 测试描述:

[0336] 简言之,抽取全血至 3.13% 柠檬酸钠中,获得人血浆。随后离心,获得不含血小板的血浆,并转移至单独的试管中并冷冻,直至在测试当天需要时。在测试当天,使血浆在 37℃ 解冻。

[0337] 凝血酶凝血时间测试操作如下。首先,将凝血酶在所提供的缓冲液 (Dade Behring 测试试剂盒) 中稀释至制备商规格 (3IU/ml 凝血酶),并预热至 37℃。在制成后 2 小时以内使用。所有测试均在市售的 CL4 凝血机 (Behnk Electronics, Norderstadt, Germany) 上进行。用吸管吸取 50 μ L 血浆加至所提供具有磁力搅拌子的测光管中,并在 CL4 机器中已预热至 37℃ 的孔中搅拌 2 分钟。此时,添加 100 μ L 凝血酶溶液,并由该 CL4 自动记录血浆样品凝固所需的时间。在添加凝血酶及开始测量之前,先在所提供的测光管中的血浆中将达比加群预先培养 5 分钟。如果抗体也进行测试 (至多 50 μ L 原液),则在开始凝固之前,需另外在 37℃ 培养 5 分钟 (即,与达比加群一共培养 10 分钟,与抗体一共培养 5 分钟,且随后用凝血酶启动凝血)。

[0338] 首先,通过将浓度递增的达比加群添加至人血浆中并测量在添加凝血酶之后的凝血时间,制成达比加群标准曲线 (图 1)。随着达比加群的浓度增加,该凝血酶凝血时间呈现依赖于浓度的增加。

[0339] 对于第一组中和实验而言,将临床相关浓度的 200nM 达比加群添加至所有血浆样品中用于中和。所有 4 种抗体制剂均能使含有达比加群的血浆的凝血时间缩短 (图 2)。中和的程度与各抗体制剂中的蛋白浓度相关。随后,将具有最高浓度 (D) 的抗体溶液连续稀释,并在独立的另一组实验中测试其中和 200nM 达比加群抗凝血活性的能力。在图 3 中可看到,随着抗体浓度增加,达比加群引起的抗凝血活性呈现依赖于浓度的抑制。此外,当将非特异性兔多克隆抗体 (蓝色方块) 添加至含有达比加群的血浆中时,其没有中和抗凝血活性的能力。其对浓度依赖的变化及无法中和非特异性抗体的结果表示该抗体特异性地针对达比加群逆转抗凝血作用。

[0340] 然而,这些浓度的达比加群是临床相关的,且使用更高浓度可能发生出血或过量。因此,也在图 1 中标准曲线的最高达比加群浓度 (500nM) 测试抗体抑制抗凝血活性的能力。图 4 示例性说明了抗体 D 也可抑制高浓度的达比加群。

[0341] III. 单克隆抗 - 达比加群抗体的制备和表征

[0342] 1. 单克隆抗 - 达比加群抗体及 Fab 的制备

[0343] 使用与载体蛋白 (如血蓝蛋白及免疫球蛋白) 缀合的半抗原 1 (参见实施例 1.1) 使小鼠免疫化,并产生杂交瘤 (根据标准操作)。使自该培养物上清液纯化的单克隆抗体结合至达比加群 - 蛋白缀合物,且该结合可与溶液中的达比加群竞争结合,其半数最大抑制浓度在 1 至 10nM 范围内。通过木瓜蛋白酶裂解所述单克隆抗体,随后通过蛋白 A 除去 Fc 域,产生 Fab。

[0344] 使用标准方法,克隆所述小鼠抗体的重链及轻链的可变区并测序。序列通过所述抗体的蛋白谱分析及 N-末端测序来确证。产生编码嵌合抗体的 DNA 构建体,该嵌合抗体包含特异性小鼠可变区及人 IgG 恒定区,且该蛋白于 HEK293 细胞中表达并纯化。

[0345] 为降低潜在免疫原性,通过上述标准方法使小鼠单克隆抗体克隆 35E6 及 27A9 的序列人源化。通过于哺乳动物细胞 (例如 HEK293 ;CHO 细胞) 中短暂转染来产生人源化 Fab 且依次通过用苯甲脒琼脂糖进行亲和层析及尺寸排阻层析进行纯化。

[0346] 2. 表征单克隆抗达比加群抗体及 Fab

[0347] 9 个单克隆抗体克隆 DBG22(克隆 22)、35E6、45B9、48E1、49F8、6A7F1、2F1E5、3B4E7、1F6G8、2D2E3 及 27A9 的可变域的序列描述于表 1 中。SEQ ID NO:67、68、69、92、93、94、99、100 及 101 表示最优化及 / 或人源化的序列。Fab 化合物 VH5C/VK18 包含 HCVH5C(SEQ ID NO:99) 作为重链及 LCVK18(SEQ ID NO:100) 作为轻链。Fab 化合物 VH5C/VK21 包含 HCVH5C(SEQ ID NO:99) 作为重链及 LCVK21(SEQ ID NO:101) 作为轻链。因此, VH5C/VK18 与 VH5C/VK21 两者均包含具有 SEQ ID NO:67 的 CDR1、SEQ ID NO:68 的 CDR2 及 SEQ ID NO:9 的 CDR3 的重链可变域, 以及 SEQ ID NO:64 的 CDR1、SEQ ID NO:65 的 CDR2 及 SEQ ID NO:69 的 CDR3 的轻链可变域。两种 Fab 共有 SEQ ID NO:92 的重链可变区 (VH5C)。VH5C/VK18 包含 SEQ ID NO:93 的轻链可变区 (VK18), 且 VH5C/VK21 包含 SEQ ID NO:94 的轻链可变区 (VK21)。

[0348] 在表 1 中, 字母“CDR”表示互补决定区, “VH”表示重链可变区, “VK”表示 κ 轻链可变区, “CL”表示轻链恒定区, 且“CH”表示重链恒定区, “LC”表示抗体分子的轻链, 且“HC”表示抗体分子的重链。举例而言, “VHCDR1DBG22”表示克隆 DBG22 的重链可变域的第一 CDR(CDR1), 且“DBG22VH”表示克隆 DBG22 的重链可变区。

[0349] 表 1

[0350]

SEQ ID NO	名称	序列
1	VHCDR1 DBG22	GFSLTSYIVD
2	VHCDR2 DBG22	VIWAGGSTNYNSALRS
3	VHCDR3 DBG22	AAYYSYNYDGFAY
4	VKCDR1 DBG22	KSSQSLLYTNGKTYLY

[0351]

5	VKCDR2 DBG22	LVSKLDS
6	VKCDR3 DBG22	LQSTHFPHT
7	VHCDR1 35E6	GYTFTNYWMH
8	VHCDR2 35E6	ETNPRNGGTNYNEKFKR
9	VHCDR3 35E6	GTSGYDYFDY
10	VKCDR1 35E6	RSSQTIVHSNGNTYLE
11	VKCDR2 35E6	KVSNRFS
12	VKCDR3 35E6	FQASHFPYT
13	VHCDR1 45B9	GVSLFTYDVD
14	VHCDR2 45B9	VMWSGGTTNYSALKS
15	VHCDR3 45B9	DRWSPGGFAY
16	VKCDR1 45B9	QSSQSLLYTNGKTYLH
17	VKCDR2 45B9	LVSKLDS
18	VKCDR3 45B9	LQSTHFPHT
19	VHCDR1 48E1	GFSLTSYDVD
20	VHCDR2 48E1	VIWAGGSTNYSALKS
21	VHCDR3 48E1	DRWSPGGFAY
22	VKCDR1 48E1	KSSQSLLYTNGKTYLI
23	VKCDR2 48E1	LVSKLDS
24	VKCDR3 48E1	LQTTHFPHT
25	VHCDR1 49F8	GFSLSTYGVD
26	VHCDR2 49F8	LIWAGGSTTYSAFKS
27	VHCDR3 49F8	ERSGDSPFGY
28	VKCDR1 49F8	KSSQSLLYTNGKTYLN

[0352]

29	VKCDR2 49F8	LVSKLDS
30	VKCDR3 49F8	LQNSHFPHT
31	VHCDR1 6A7F1	GFTFSTYGMS
32	VHCDR2 6A7F1	SVTRGGNTYYPSM
33	VHCDR3 6A7F1	DYSGWYFDV
34	VKCDR1 6A7F1	RSSQSIVHSNGDTFLE
35	VKCDR2 6A7F1	KVSNRFS
36	VKCDR3 6A7F1	FQGSRIPYT
37	VHCDR1 2F1E5	GFTLTNYGMN
38	VHCDR2 2F1E5	WINTYTGEPTYADDFKG
39	VHCDR3 2F1E5	SAGTDYFDY
40	VKCDR1 2F1E5	RASESVDSYGNSFMH
41	VKCDR2 2F1E5	LASNLES
42	VKCDR3 2F1E5	QQNNEDPWT
43	VHCDR1 3B4E7	GYTFTYYTIH
44	VHCDR2 3B4E7	YINPASSYTNYIQKFKD
45	VHCDR3 3B4E7	GANWDYFDY
46	VKCDR1 3B4E7	RSSQNIIQSNGNTYLE
47	VKCDR2 3B4E7	KVSNRFS
48	VKCDR3 3B4E7	FQGSHVPYT
49	VHCDR1 1F6G8	GYTFTSYTIH
50	VHCDR2 1F6G8	YINPSSGYTYIQNFKD
51	VHCDR3 1F6G8	GANWDYFDY
52	VKCDR1 1F6G8	RSSQNIVQTNGNTYLE
53	VKCDR2 1F6G8	KVSSRFS

[0353]

54	VKCDR3 1F6G8	FQGSHPVFT
55	VHCDR1 2D2E3	GYTFTHSGMN
56	VHCDR2 2D2E3	WINTNTGEPTYAEFNGR
57	VHCDR3 2D2E3	SWWTDYFDY
58	VKCDR1 2D2F8	RSSQSIVHSNGNTYLE
59	VKCDR2 2D2E3	KVSNRFS
60	VKCDR3 2D2E3	FQGSHPYPT
61	VHCDR1 27A9	GYTFNCYMH
62	VHCDR2 27A9	ETNPRNGGTNYNEKFKR
63	VHCDR3 27A9	GTSGYEYFDY
64	VKCDR1 27A9	RSSQSIVHSDGNIYLE
65	VKCDR2 27A9	KVSYRFS
66	VKCDR3 27A9	FQGSHPYPT
67	VHCDR1 5C	GYTFDYYMH
68	VHCDR2 5C	ETNPRNGGTTYNEKFKG
69	VKCDR3 18	FQASHVPYPT
70	DBG22VH	QVQLEQSGPG LVAPSQRSLI TCTVSGFSLT SYIVDWVRQS PGKGLEWLGW IWAGGSTNYN SALRSRLSIT KSNSKSQVFL QMNSLQTDDET AIYYCASAAY YSYNYDGFAY YWGQGTLLTV SA
71	DBG22VK	DVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLYW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGI YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IK
72	35E6VH	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKTSGYTFT NYWMHWVRQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVDKSSNTAY MQLSSLTFGD SAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTTLTVSS
73	35E6VK	DVLTMTQPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQTIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRK SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDLGW YFCFQASHFP YTFGGGTKLE IK
74	45B9VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLI TCTVSGVSLF TYDWDWVRQS PGKDLEWLGW MWSGGTTNYN SALKSRLNIM KDSSKSQVFL KMSGLQTDDET GIYYCATDRW SPGGFAYWGQ GTLLTVSA
75	45B9VK	DVMTQTPLT LSVLIGQPAS ISCQSSQSLL YTNGKTYLHW LLQRPQGSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI

[0354]

		SRVEAEDLGV YYCLQSTHFP HTFGGGTKLE IR
76	48E1VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT SYDVDWVRQS PGKGLEWLGW IWAGGSTNYN SALKSRLIIS KDNSKNQVFL RMNSLQTDDET AMYYCASDRW SPGGFAYWGO GTLVTVSA
77	48E1VK	DVVMQTPTLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLIW LLQRPQGSPK RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV FYCLQTHFP HTFGGGTKLE IR
78	49F8VH	QVQLKQSGPG LVAPSQSLSI TCTVSGFSLT TYGVDWVRQS PKKGLEWLGW IWAGGSTNYN SAFKSRLSIS KDNSKSQVFL KMNSLQTDDET AMYYCASERS GDSPPFGYWGO GTLVTVSA
79	49F8VK	DVVMQTSPLI LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLNW LLQRPQGSPE RLIHLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCLQNSHFP HTFGSGTKLE IK
80	6A7F1VH	EVKLVESGGD LVRPGGSLKL SCAASGFTFS TYGMSWVRQS PEKRLEWVAS VTRGGNTYYP DSMRGRFTIS RDNVGNILYL HLRSLRSED AIYFCARDYS GWYFDVWGAG TTVTVSS
81	6A7F1VK	DVLMTQIPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGDTFLEW YLQKSGQSPK LLIYKVSNNF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSRIIP YTFGGGTKE IK
82	3B4E7VH	QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT YYTIHWVKQR PGQGLEWIGY INPASSYTN IQKFKDRATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVFYCARGA NWDYFDYWGO GTTLTVSS
83	3B4E7VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNII QSNNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV YTFGGGTNLE IK
84	2F1E5VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWKQV PGKGLRWGMW INTYTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINNLLKNEA AATYFCARSA GTDYFDYWGO GTTLTVSS
85	2F1E5VK	NFVLTSQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYGNSFMHWC QQKPGQPPKL LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPW TFGGGTKLEI K
86	1F6G8VH	QIQLVQSGPE LKKPGETVKI SCKSSGFTLT NYGMNWKQV PGKGLRWGMW INTYTGEPTY ADDFKGRFAF SLETSARTAY LQINNLLKNEA AATYFCARSA GTDYFDYWGO GTTLTVSS
87	1F6G8VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQNIV QTNGNTYLEW YLQKPGQSPN LLIYKVSSRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV FTFGGGTKLE IK
88	2D2E3VH	QAQIHLVQSG PELKKPGETV KISCKASGYT FTHSGMNWMK QTPGKDLKWM GWINTNTGEP TYAEFEFNGRF AFSLEASANT AYLQINNLLKN EDTATYFCAR SWWTDYFDYW QGGTTLTVSS
89	2D2E3VK	DVLMTQTPLS LPVSLGDQTS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNNF SGVPDRISGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHPV YTFGGGTKE IT
90	27A9VH	QVQLQQPGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT NCYMHWKQQR PGQGLEWIGE TNPRNGGTNY NEKFKRKATL TVNKYSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCTIGT SGYEYFDYWG QGTTLTVSS

[0355]

91	27A9VK	NILMTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK VLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTYFTLKI SRVEAEDLGV YFCFQGSHPV YTFGGGKTLE IK
92	VH5C	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMHWVRQA PGQGLEWMGE TNPRNGGTTY NEKFKGKATM TRDTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTLLVTVSS
93	VK18	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGQGTLE IK
94	VK21	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGGGKTLE IK
95	克隆 22 嵌合 HC	QVQLEQSGPG LVAPSQRSLI TCTVSGFSLT SYIVDWVRQS PGKGLEWLGV IWAGGSTNYN SALRSRLSIT KSNKSKQVFL QMNSLQTDIT AIYYCASAAY YSYNYDGFA YWGQGTLLTV SAASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV VTPVSSSLGT QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPEAA GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH YTQKSLSLSP GK
96	克隆 22 嵌合 LC	DVVMTQTPLT LSVTIGQPAS ISCKSSQSLL YTNGKTYLYW LLQRPQSPK RLIYLVSKLD SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGI YYCLQSTHFP HTFGGGKTLE IKRTVAAPSV FIFFPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNRGEC
97	hCL 域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG NSQESVTEQD SKDYSTLSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK SFNRGEC
98	hCH 域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKTHTCP PCPAPEAAAGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSGDSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK
99	HCVH5C	QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT DYYMHWVRQA PGQGLEWMGE TNPRNGGTTY NEKFKGKATM TRDTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTIGT SGYDYFDYWG QGTLLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW

[0356]

		NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHNKPSN TKVDKKVEPK SC
100	LCVK18	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGQGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPPREK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC
101	LCVK21	DIVMTQTPLS LSVTPGQPAS ISCRSSQSIV HSDGNIYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSYRF SGVPDRFSGS GSGTGFTLKI SRVEAEDVGV YYCFQASHVP YTFGGGTKLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPPREK VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

[0357] 依实施例 II 中所述的凝血酶凝血时间测试,测试小鼠单克隆抗体克隆 22 中和人血浆中的达比加群抗凝血活性的能力。该抗体以剂量依赖性方式完全逆转人血浆中达比加群介导的依赖凝血酶的凝血时间延长(图 5)。该抗体也有效抑制人全血中的达比加群功能。自此抗体产生的 Fab 阻断人血浆中的达比加群活性,表明单价抗原结合域可中和化合物的抗凝血活性(图 6)。

[0358] 达比加群在人体中的主要代谢途径为通过羧基部分的葡萄糖苷酸化。达比加群酰基葡萄糖苷酸已显示药理活性(Ebner 等人, Drug Metab. Dispos. 2010, 38(9):1567-75)。为了测试该小鼠单克隆抗体克隆 22 是否能中和这些代谢产物,自经达比加群处理的恒河猴的尿液中纯化达比加群酰基葡萄糖苷酸,并在凝血酶凝血时间测试中评估。该抗体剂量依赖性地在人血浆中逆转达比加群酰基葡萄糖苷酸-介导的依赖凝血酶的凝血时间延长,其与使用达比加群所观察到的效力类似(图 7)。因此,该抗体有效阻断出现在人体中的达比加群代谢产物的抗凝血活性。

[0359] 使用 Kinexa 技术,测定该 Fab 及包括克隆 22 的小鼠-人嵌合抗体的亲和性。将恒定浓度的 Fab 或嵌合抗体与多种浓度的达比加群培养,直至达到平衡。该培养之后,通过与生物素缀合的达比加群类似物所偶合的中性链亲和素(neutravidin)珠捕获该抗体,来测定游离抗体的浓度。用经 FITC 标签的抗-小鼠 IgG(Fab 特异性)F(ab')₂ 片段,检测所捕获的 Fab。用与 Cy5 缀合的抗-人 IgG 检测所捕获的嵌合抗体。使用 1:1 结合模型,计算解离常数。所述实验的结果总结于下表中。

[0360] 抗达比加群抗体的亲和力

[0361]

抗体	表观 Kd
克隆 22Fab	48pM
克隆 22 嵌合 Ab	34pM

[0362] FAB 与嵌合抗体两者均以高亲和力结合达比加群。

[0363] 凝血酶凝血时间测试

[0364] 简言之,抽取全血至 3.13% 柠檬酸钠中,获得人血浆。随后离心,获得不含血小板

的血浆,并转移至单独的试管中并冷冻,直至在测试当天需要时。在测试当天,使血浆在 37℃解冻。

[0365] 凝血酶凝血时间操作如下。首先,将凝血酶在所提供的缓冲液(Dade Behring 测试试剂盒)中稀释至制备商规格(3IU/ml 凝血酶),并预热至 37℃。在制成后 2 小时以内使用。所有测试均在市售的 CL4 凝血机(Behnk Electronics, Norderstadt, Germany)上进行。用吸管吸取 50 μ L 血浆加至所提供具有磁力搅拌子的测光管中,并在 CL4 机器中已预热至 37℃的孔中搅拌 2 分钟。此时,添加 100 μ L 凝血酶溶液,并由该 CL4 自动记录血浆样品凝固所需的时间。在添加凝血酶及开始测量之前,先在所提供的测光管中的血浆中将达比加群预先培养 5 分钟。如果抗体也进行测试(至多 50 μ L 原液),则在开始凝固之前,需另外在 37℃培养 5 分钟(即,与达比加群一共培养 10 分钟,与抗体一共培养 5 分钟,且随后用凝血酶启动凝血)。

[0366] 嵌合抗体及人源化 Fab 在凝血酶时间分析中的活性分别展示于图 8-10 中。

[0367] 亲和力测定(Kinexa 方法)

[0368] 使用 KinExA® 技术测定 Fab 及小鼠-人类嵌合抗体的亲和力。将恒定浓度的 Fab 或嵌合抗体与各种浓度的达比加群一起培育直至达到平衡。在此培育之后,通过将抗体捕捉于中性链亲和素珠粒上来测定游离抗体的浓度,所述珠粒与生物素结合的达比加群类似物偶合。用经 FITC 标记的抗人 IgG (Fab 特异性) F(ab')₂ 片段检测所捕捉的 Fab。用与 Cy5 结合的抗人 IgG 检测所捕捉的嵌合抗体。使用 1:1 结合模型计算解离常数 (K_D)。

[0369] 使用动力学直接法(Kinetics Direct method)用 KinExA® 仪器测量速率常数 (k_{on} 及 k_{off})。在此方法中,将结合搭配物(binding partner)混合于溶液中,且随时间探测游离活性结合位点的浓度,因为活性结合位点由于形成复合物而消耗。在指定时间间隔下收集数据点且分析信号。以此方式,直接测量 k_{on} 且解离速率 k_{off} 计算为 $k_{off}=K_D \times k_{on}$ 。

[0370] 表:使用 KinExA® 技术测定的嵌合抗体的 K_D 值。

[0371]

嵌合Ab	K_D (pM)
45B6	545
48E1	281
35E6	52
49F8	40
27A9	120

[0372] 表:人源化 Fab VH5C/VK18 及 VH5C/VK21 的 K_D 值、 k_{on} 及 k_{off}

[0373]

Fab	K_D	k_{on}	k_{off} (计算值)
VH5C/VK18	133 pM	9.38e+005/Ms	1.25e-004/s
VH5C/VK21	147 pM	1.377e+006/Ms	2.02e-004/s

[0374] Fab- 达比加群复合物的形成及结晶

[0375] 将 Fab 浓缩至 10mg/ml,与 2 摩尔浓度过量的达比加群混合且在 4℃下培育 1 小时。按 1:1 混合复合物与结晶溶液。复合物在 25%PEG1500、0.1M SPG 缓冲液(pH7)中结晶。

[0376] 数据收集及结构测定

[0377] 所有晶体的数据集皆在 Paul Scherrer Institut 的 Swiss light Source beamline PXI-X06SA 上收集。所有数据集皆用 autoPROC 套件处理 (Vonrhein, C., Flensburg, C., Keller, P., Sharff, A., Smart, O., Paciorek, W., Womack, T. 及 Bricogne, G. (2011). Data processing and analysis with the autoPROC toolbox. *Acta Cryst. D* 67, 293-302.)。

[0378] Fab VH5C/VK21: 达比加群晶体以单位晶胞尺寸 $a=59.97 \text{ \AA}$, $b=78.39 \text{ \AA}$, $c=87.67 \text{ \AA}$ 的空间群 P212121 生长且衍射分辨率为 $2.2 \text{ \AA}$ 。复合物结构通过使用同源 Fab 结构 (PDB-ID1C1E) 作为起始搜寻模型, 用 phaser 程序 (Collaborative Computational Project, 第 4 号. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Cryst. D* 50, 760-763; Phaser crystallographic software. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. *J. Appl. Cryst.* (2007). 40, 658-674.) 进行分子置换加以解析。对电子密度图的分析显示达比加群的清晰电子密度。用 Coot 进行多轮模型构建并用 autoBUSTER 进行改进来改良完整结构 ("Coot: model-building tools for molecular graphics" Emsley P, Cowtan K *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* 60:2126-2132 第 12 部分特刊第 1 期 2004 年 12 月; Bricogne G., Blanc E., Brandl M., Flensburg C., Keller P., Paciorek W., Roversi P, Sharff A., Smart O. S., Vonrhein C., Womack T. O. (2011). BUSTER 第 2.11.2 版. Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd)。

[0379] Fab VH5C/VK18: 达比加群晶体分别以空间群 P21 及 P212121 生长。具有空间群 P21 的晶体显示单位晶胞尺寸 $a=51.81 \text{ \AA}$, $b=128.92 \text{ \AA}$, $c=60.26 \text{ \AA}$ 且衍射分辨率为 $1.9 \text{ \AA}$ 。具有空间群 P212121 的晶体显示单位晶胞尺寸 $a=48.20 \text{ \AA}$, $b=59.74 \text{ \AA}$, $c=127.69 \text{ \AA}$ 且衍射分辨率为 $2.2 \text{ \AA}$ 。两种复合物结构均通过使用 Fab VH5C/VK21 的结构作为起始搜寻模型, 用 phaser 程序进行分子置换加以解析。对电子密度图的分析显示达比加群的清晰电子密度。用 Coot 进行多轮模型构建并用 autoBUSTER 进行改进来改良完整结构。

[0380] 空间聚集趋势 (SAP) 的计算机分析

[0381] 如 (1) 中所述计算各原子及各残基的空间聚集趋势 (SAP), 但残基疏水性参数取自 (2)。Fv SAP 计算为抗体可变域中所有正性残基 SAP 值的总和。CDR SAP 计算为抗体互补决定区中所有正性残基 SAP 值的总和。已计算来自蛋白数据库 (protein data bank, PDB) 的 850 种不同抗体结构的 Fv SAP 及 CDR SAP, 从而产生该两种性质的平均 (μ_{Fv} 及 μ_{CDR}) 及标准偏差值 (σ_{Fv} 及 σ_{CDR})。

[0382] 接着根据以下各式计算抗体的 Fv SAP 及 CDR SAP 的 Z 评分

[0383] Z 评分 (Fv SAP) = $(Fv \text{ SAP} - \mu_{Fv}) / \sigma_{Fv}$ 及

[0384] Z 评分 (CDR SAP) = $(CDR \text{ SAP} - \mu_{CDR}) / \sigma_{CDR}$ 。

[0385] 结果 (图 11) :

[0386] 人源化 Fab 18/15 :

[0387] Z 评分 (Fv SAP) = 1.06

[0388] Z 评分 (CDR SAP)=1.00

[0389] 人源化 Fab VH5C/VK18 :

[0390] Z 评分 (Fv SAP)=-0.61

[0391] Z 评分 (CDR SAP)=-0.84

[0392] 人源化 Fab VH5C/VK21 :

[0393] Z 评分 (Fv SAP)=-0.61

[0394] Z 评分 (CDR SAP)=-0.78

[0395] Fab18/15(参见 W02011089183)所具有的溶剂暴露疏水性表面大于蛋白数据库中已知抗体的平均值。

[0396] 意外的是,VH5C/VK18(SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:100)与 VH5C/VK21(包含 SEQ ID NO:99/SEQ ID NO:101)两者所具有的溶剂暴露疏水性表面均小于蛋白数据库中已知抗体的平均值(负性 Z 评分)。这表明这些化合物在水性介质中的溶解度增加且聚集趋势较低,从而使其更适用于抗体浓度较高的稳定药物制剂。

[0397] (1)Chennamsetty 等人,Proc Natl Acad Sci;2009,106(29),第 11937-11942 页。

[0398] (2)Cowan 及 Whittaker,Pept Res;1990,3(2),第 75-80 页。

[0399] CHO 细胞中 Fab 的表达

[0400] 按如下过程产生 Fab:短暂转染入 CHO DG44,然后选择并生成稳定的细胞池。图 13 显示了用 Fab18/15(参见 W02011089183)、Fab VH5c/Vk18 和 Fab VH5c/Vk21 分批补料运行的效价。出乎意料地,相比于 Fab18/15,Fab VH5c/Vk18 和 Fab VH5c/Vk21 显示效价高出 5-10 倍。

[0001]

序列表

<110> 勃林格殷格翰国际有限公司

<120> 抗凝血剂解毒剂

<160> 101

<170> BiSSAP 1.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR1 DBG22"

/生物体="小鼠"

<400> 1

Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Ile Val Asp

1 5 10

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR2 DBG22"

/生物体="小鼠"

<400> 2

Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg Ser

1 5 10 15

<210> 3

<211> 14

[0002]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..14

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR3 DBG22"

/生物体="小鼠"

<400> 3

Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 DBG22"

/生物体="小鼠"

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr

1

5

10

15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 DBG22"

/生物体="小鼠"

<400> 5

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

[0003]

1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..9
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR3 DBG22"
/生物体="小鼠"

<400> 6
Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 7
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1 35E6"
/生物体="小鼠"

<400> 7
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..17
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2 35E6"

[0004]

/生物体="小鼠"

<400> 8

Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR3 35E6"

/生物体="小鼠"

<400> 9

Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 35E6"

/生物体="小鼠"

<400> 10

Arg Ser Ser Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

[0005]

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 35E6"

/生物体="小鼠"

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 35E6"

/生物体="小鼠"

<400> 12

Phe Gln Ala Ser His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR1 45B9"

/生物体="小鼠"

<400> 13

Gly Val Ser Leu Phe Thr Tyr Asp Val Asp

1 5 10

[0006]

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2 45B9"
/生物体="小鼠"

<400> 14
Val Met Trp Ser Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3 45B9"
/生物体="小鼠"

<400> 15
Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR1 45B9"
/生物体="小鼠"

[0007]

<400> 16

Gln Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His

1

5

10

15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 45B9"

/生物体="小鼠"

<400> 17

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1

5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 45B9"

/生物体="小鼠"

<400> 18

Leu Gln Ser Thr His Phe Pro His Thr

1

5

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

[0008]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1 48E1"
/生物体="小鼠"

<400> 19
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Asp Val Asp
1 5 10

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2 48E1"
/生物体="小鼠"

<400> 20
Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 21
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3 48E1"
/生物体="小鼠"

<400> 21
Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

[0009]

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 48E1"

/生物体="小鼠"

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ile

1

5

10

15

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 48E1"

/生物体="小鼠"

<400> 23

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 48E1"

/生物体="小鼠"

<400> 24

Leu Gln Thr Thr His Phe Pro His Thr

1

5

[0010]

<210> 25
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1_49F8"
/生物体="小鼠"

<400> 25
Gly Phe Ser Leu Ser Thr Tyr Gly Val Asp
1 5 10

<210> 26
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2_49F8"
/生物体="小鼠"

<400> 26
Leu Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Thr Tyr Asn Ser Ala Phe Lys Ser
1 5 10 15

<210> 27
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3_49F8"
/生物体="小鼠"

[0011]

<400> 27

Glu Arg Ser Gly Asp Ser Pro Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 49F8"

/生物体="小鼠"

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 49F8"

/生物体="小鼠"

<400> 29

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

[0012]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR3_49F8"
/生物体="小鼠"

<400> 30
Leu Gln Asn Ser His Phe Pro His Thr
1 5

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1_6A7F1"
/生物体="小鼠"

<400> 31
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Gly Met Ser
1 5 10

<210> 32
<211> 14
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..14
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2_6A7F1"
/生物体="小鼠"

<400> 32
Ser Val Thr Arg Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Met
1 5 10

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

[0013]

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR3_6A7F1"

/生物体="小鼠"

<400> 33

Asp Tyr Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1_6A7F1"

/生物体="小鼠"

<400> 34

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asp Thr Phe Leu Glu

1 5 10 15

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2_6A7F1"

/生物体="小鼠"

<400> 35

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

[0014]

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..9
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR3 6A7F1"
/生物体="小鼠"

<400> 36
Phe Gln Gly Ser Arg Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 37
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1 2F1E5"
/生物体="小鼠"

<400> 37
Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr Gly Met Asn
1 5 10

<210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..17
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2 2F1E5"
/生物体="小鼠"

[0015]

<400> 38

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR3_2F1E5"

/生物体="小鼠"

<400> 39

Ser Ala Gly Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..15

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1_2F1E5"

/生物体="小鼠"

<400> 40

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

[0016]

<221> 来源
<222> 1..7
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR2 2F1E5"
/生物体="小鼠"

<400> 41
Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..9
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR3 2F1E5"
/生物体="小鼠"

<400> 42
Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1 3B4E7"
/生物体="小鼠"

<400> 43
Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr Thr Ile His
1 5 10

<210> 44
<211> 17

[0017]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..17

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR2 3B4E7"

/生物体="小鼠"

<400> 44

Tyr Ile Asn Pro Ala Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe Lys

1

5

10

15

Asp

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR3 3B4E7"

/生物体="小鼠"

<400> 45

Gly Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1

5

<210> 46

<211> 16

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 3B4E7"

/生物体="小鼠"

[0018]

<400> 46

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 3B4E7"

/生物体="小鼠"

<400> 47

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1

5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 3B4E7"

/生物体="小鼠"

<400> 48

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

[0019]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR1 1F6G8"
/生物体="小鼠"

<400> 49
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Ile His
1 5 10

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..17
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR2 1F6G8"
/生物体="小鼠"

<400> 50
Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Tyr Tyr Ile Gln Asn Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..9
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3 1F6G8"
/生物体="小鼠"

<400> 51
Gly Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 52
<211> 16

[0020]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..16

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR1 1F6G8"

/生物体="小鼠"

<400> 52

Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Gln Thr Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1

5

10

15

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..7

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR2 1F6G8"

/生物体="小鼠"

<400> 53

Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser

1

5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 1F6G8"

/生物体="小鼠"

<400> 54

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Phe Thr

[0021]

1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR1 2D2E3"

/生物体="小鼠"

<400> 55

Gly Tyr Thr Phe Thr His Ser Gly Met Asn

1 5 10

<210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..18

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR2 2D2E3"

/生物体="小鼠"

<400> 56

Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe Asn

1 5 10 15

Gly Arg

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

[0022]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3 2D2E3"
/生物体="小鼠"

<400> 57
Ser Trp Trp Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR1 2D2F8"
/生物体="小鼠"

<400> 58
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..7
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR2 2D2E3"
/生物体="小鼠"

<400> 59
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

[0023]

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 2D2E3"

/生物体="小鼠"

<400> 60

Phe Gln Gly Ser His Phe Pro Tyr Thr

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR1 27A9"

/生物体="小鼠"

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Cys Tyr Met His

1 5 10

<210> 62

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..17

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR2 27A9"

/生物体="小鼠"

<400> 62

Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Arg

[0024]

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..10
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VHCDR3 27A9"
/生物体="小鼠"

<400> 63
Gly Thr Ser Gly Tyr Glu Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 64
<211> 16
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..16
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR1 27A9"
/生物体="小鼠"

<400> 64
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Glu
1 5 10 15

<210> 65
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..7
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VKCDR2 27A9"

[0025]

/生物体="小鼠"

<400> 65

Lys Val Ser Tyr Arg Phe Ser

1

5

<210> 66

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 27A9"

/生物体="小鼠"

<400> 66

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 67

<211> 10

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..10

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR1 5C"

/生物体="小鼠"

<400> 67

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met His

1

5

10

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

[0026]

<221> 来源

<222> 1..17

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VHCDR2 5C"

/生物体="小鼠"

<400> 68

Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..9

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VKCDR3 18"

/生物体="小鼠"

<400> 69

Phe Gln Ala Ser His Val Pro Tyr Thr

1

5

<210> 70

<211> 122

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..122

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="DBG22VII"

/生物体="小鼠"

<400> 70

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

1

5

10

15

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

[0027]

```

                20                25                30
Ile Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
                35                40                45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
                50                55                60
Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
        65                70                75                80
Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
                85                90                95
Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
                100                105                110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
                115                120

```

<210> 71

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="DBG22VK"

/生物体="小鼠"

<400> 71

```

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 Tyr Thr
                20                25                30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
                35                40                45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
                50                55                60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
        65                70                75                80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
                85                90                95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
                100                105                110

```

<210> 72

<211> 119

[0028]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..119

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="35E6VH"

/生物体="小鼠"

<400> 72

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

<210> 73

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="35E6VK"

/生物体="小鼠"

<400> 73

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

[0029]

20	25	30	
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser			
35	40	45	
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro			
50	55	60	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Lys Ile			
65	70	75	80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Ala			
85	90	95	
Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 74

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="45B9VH"

/生物体="小鼠"

<400> 74

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

<210> 75

<211> 112

[0030]

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="45B9VK"

/生物体="小鼠"

<400> 75

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Leu Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu His Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser 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 Ser
 85 90 95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
 100 105 110

<210> 76

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="48E1VH"

/生物体="小鼠"

<400> 76

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
Asp Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

[0031]

```

          35          40          45
Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
          50          55          60
Ser Arg Leu Ile Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
          65          70          75          80
Arg Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Ser Asp Arg Trp Ser Pro Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ala
          115

```

<210> 77

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="48E1VK"

/生物体="小鼠"

<400> 77

```

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 Tyr Thr
          20          25          30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ile Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
          35          40          45
Pro Lys Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser 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 Phe Tyr Cys Leu Gln Thr
          85          90          95
Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
          100          105          110

```

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

[0032]

<220>

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="49F8VH"

/生物体="小鼠"

<400> 78

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

<210> 79

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="49F8VK"

/生物体="小鼠"

<400> 79

Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ile Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Thr
 20 25 30
Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

[0033]

```

          35          40          45
Pro Glu Arg Leu Ile His Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
          50          55          60
Asp Arg Phe Ser 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 Asn
          85          90          95
Ser His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105          110

```

<210> 80

<211> 117

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..117

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="6A7F1VH"

/生物体="小鼠"

<400> 80

```

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

```

<210> 81

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

[0034]

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="6A7F1VK"

/生物体="小鼠"

<400> 81

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
Asn Gly Asp Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Ser Gly Gln Ser
 35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
Asp Arg Phe Ser 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 Phe Gln Gly
 85 90 95
Ser Arg Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 82

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="3B4E7VH"

/生物体="小鼠"

<400> 82

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Tyr
 20 25 30
Thr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ala Ser Ser Tyr Thr Asn Tyr Ile Gln Lys Phe

[0035]

```

      50              55              60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65              70              75              80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Phe Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg Gly Ala Asn Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
      100             105             110
Thr Leu Thr Val Ser Ser
      115

```

<210> 83

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="3B4E7VK"

/生物体="小鼠"

<400> 83

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1              5              10              15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Ile Gln Ser
      20              25              30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50              55              60
Asp Arg Phe Ser 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 Phe Gln Gly
      85              90              95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys
      100             105             110

```

<210> 84

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

[0036]

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="2F1E5VH"

/生物体="小鼠"

<400> 84

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

<210> 85

<211> 111

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..111

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="2F1E5VK"

/生物体="小鼠"

<400> 85

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

[0037]

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

<210> 86

<211> 118

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..118

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="1F6G8VH"

/生物体="小鼠"

<400> 86

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gly Phe Thr Leu Thr Asn Tyr		
20	25	30
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Arg Trp Met		
35	40	45
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Arg Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Ser Ala Gly Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
100	105	110
Thr Leu Thr Val Ser Ser		
115		

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

[0038]

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="1F6G8VK"

/生物体="小鼠"

<400> 87

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Gln Thr
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Asn Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser 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 Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 88

<211> 120

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..120

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="2D2E3VH"

/生物体="小鼠"

<400> 88

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

[0039]

65 70 75 80
Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95
Phe Cys Ala Arg Ser Trp Trp Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 89
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..112
<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="2D2E3VK"
/生物体="小鼠"

<400> 89
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Thr Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Ile Ser 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 Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr
100 105 110

<210> 90
<211> 119
<212> PRT
<213> 小鼠

<220>
<221> 来源
<222> 1..119

[0040]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="27A9VH"
/生物体="小鼠"

<400> 90

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

<210> 91

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="27A9VK"
/生物体="小鼠"

<400> 91

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

[0041]

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

<210> 92

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1..119

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="VH5C"

/生物体="人工序列"

<400> 92

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr			
	20	25	30
Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
	35	40	45
Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr 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
Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 93

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

[0042]

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VK18"
/生物体="人工序列"

<400> 93

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

<210> 94

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1..112

<223> /mol_类型="蛋白"
/标记="VK21"
/生物体="人工序列"

<400> 94

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

[0043]

	85	90	95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
100	105	110	

<210> 95
 <211> 452
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <222> 1..452
 <223> /mol_类型="蛋白"
 /标记="克隆 22 嵌合 HC"
 /生物体="人工序列"

<400> 95
 Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Val Asp Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Arg
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Thr Lys Ser Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Ser Ala Ala Tyr Tyr Ser Tyr Tyr Asn Tyr Asp Gly Phe Ala Tyr Trp
 100 105 110
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 115 120 125
 Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
 130 135 140
 Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
 145 150 155 160
 Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
 165 170 175
 Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 180 185 190
 Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 195 200 205
 His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser

[0044]

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

<210> 96

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1., 219

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="克隆 22 嵌合 LC"

/生物体="人工序列"

[0045]

<400> 96
 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 Tyr Thr
 20 25 30
 Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 97
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> 来源
 <222> 1., 107
 <223> /mol_类型="蛋白"
 /标记="hCL 域"
 /生物体="智人"

<400> 97
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0046]

```

1           5           10           15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
          20           25           30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
          35           40           45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
          50           55           60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
        65           70           75           80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
          85           90           95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          100          105

```

<210> 98

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<220>

<221> 来源

<222> 1..330

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="hCH 域"

/生物体="智人"

<400> 98

```

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

```

[0047]

```

130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225          230          235          240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          245          250          255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          260          265          270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
          275          280          285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290          295          300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305          310          315          320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
          325          330

```

<210> 99
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <222> 1..222
 <223> /mol_类型="蛋白"
 /标记="HCVH5C"
 /生物体="人工序列"

<400> 99
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0048]

```

          35          40          45
Gly Glu Thr Asn Pro Arg Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60
Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Arg Asp Thr 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
Thr Ile Gly Thr Ser Gly Tyr Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
          115          120          125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
          130          135          140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145          150          155          160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
          165          170          175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
          180          185          190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
          195          200          205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
          210          215          220

```

<210> 100

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1..219

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="LCVK18"

/生物体="人工序列"

<400> 100

```

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

```

[0049]

```

50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65          70          75          80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ala
85          90          95
Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100         105         110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115        120        125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130        135        140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145        150        155        160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165        170        175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180        185        190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195        200        205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210        215

```

<210> 101

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<222> 1., 219

<223> /mol_类型="蛋白"

/标记="LCVK21"

/生物体="人工序列"

<400> 101

```

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

```

[0050]

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

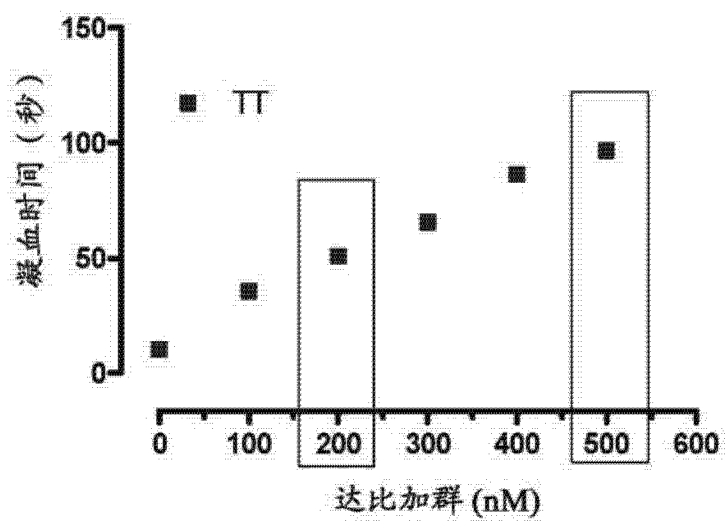


图 1

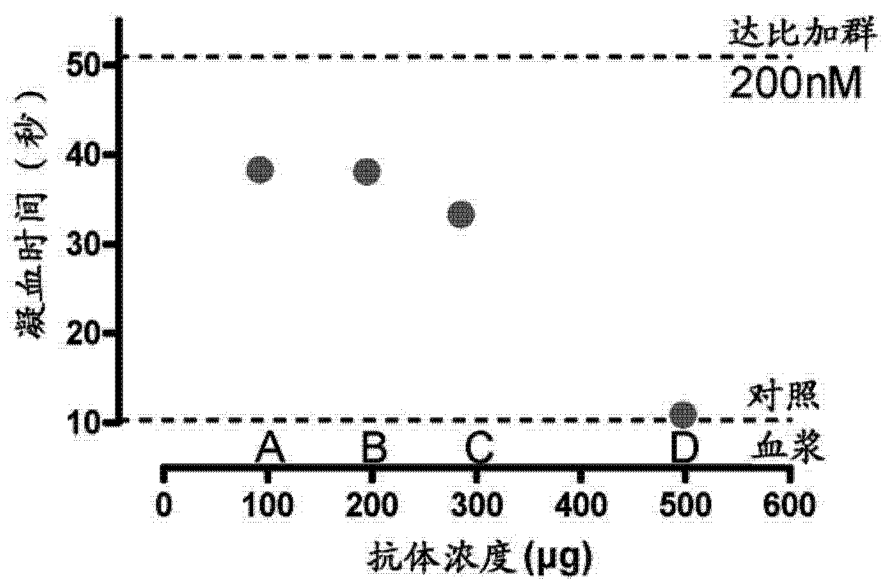


图 2

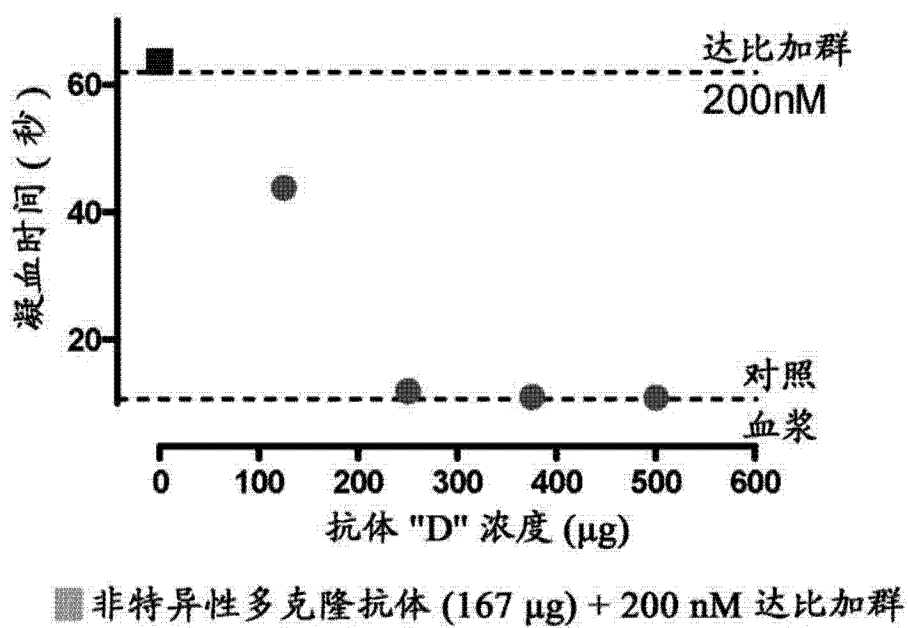


图 3

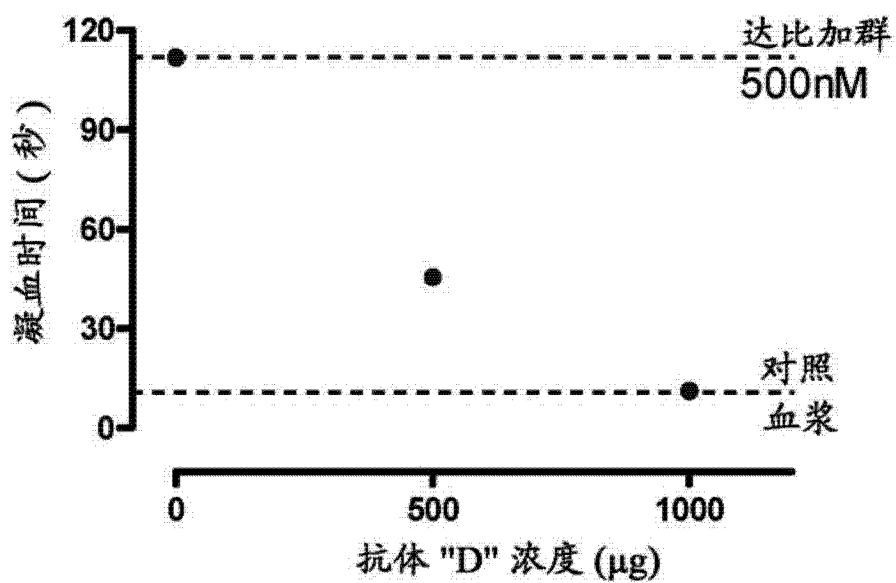


图 4

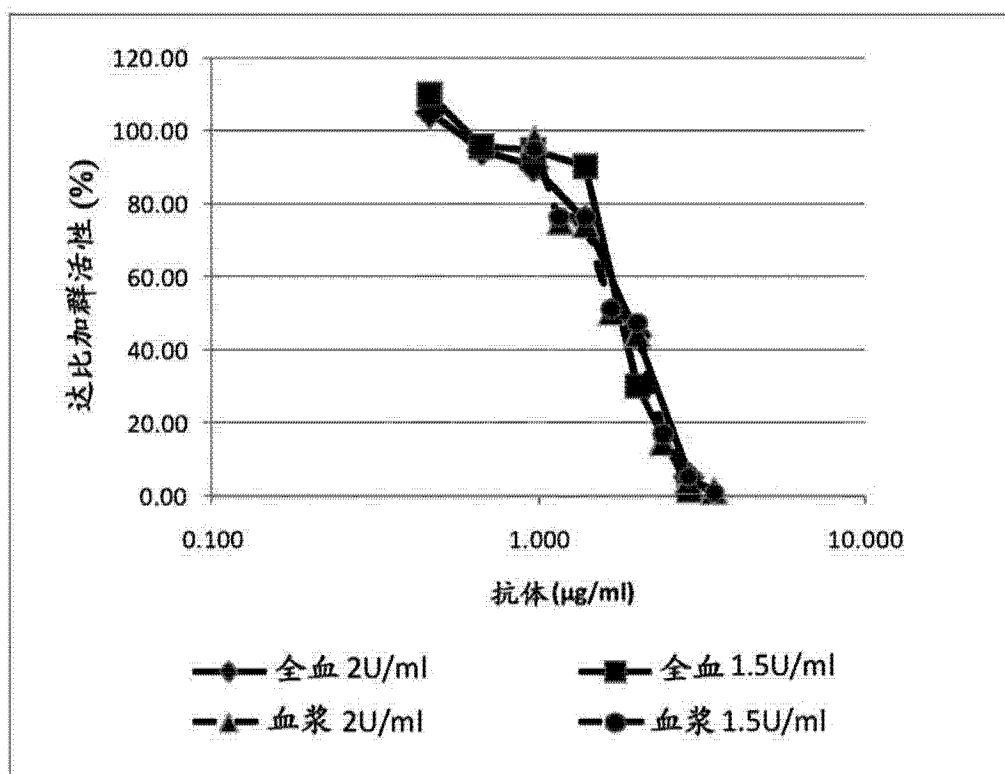


图 5

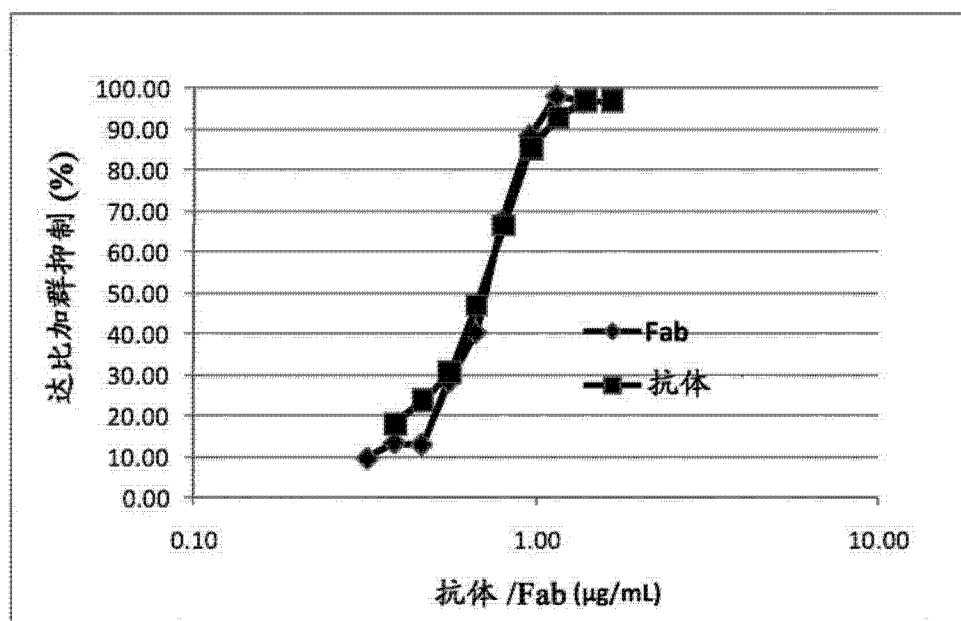


图 6

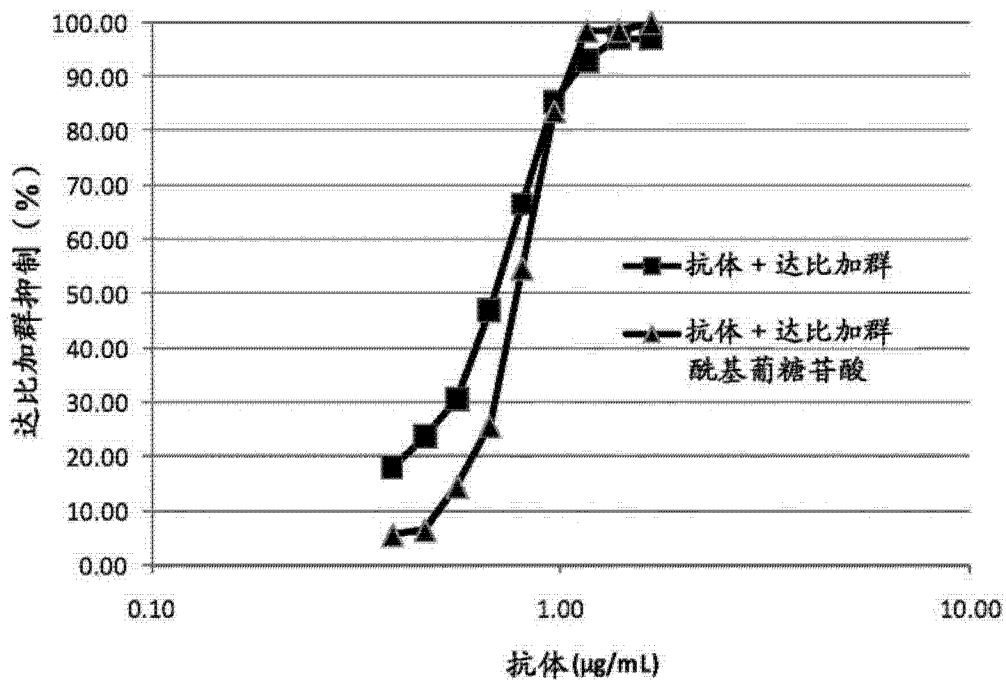


图 7

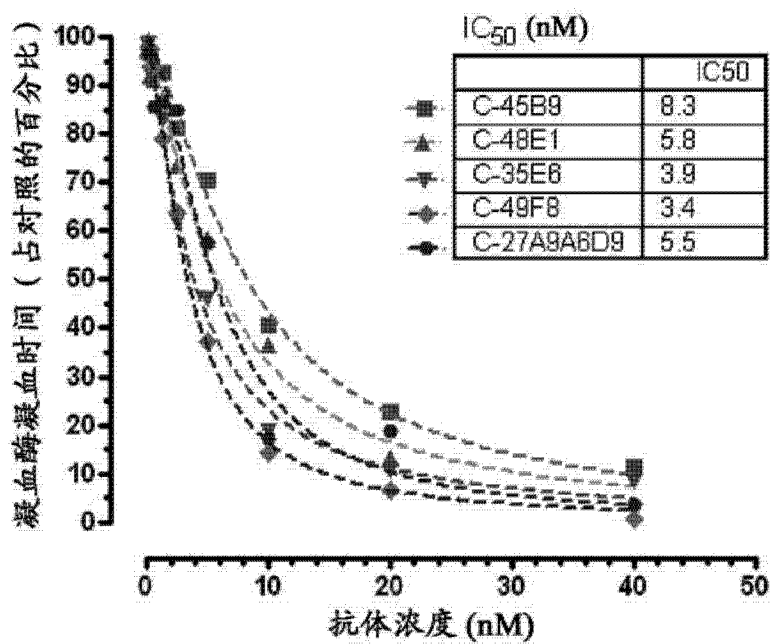


图 8

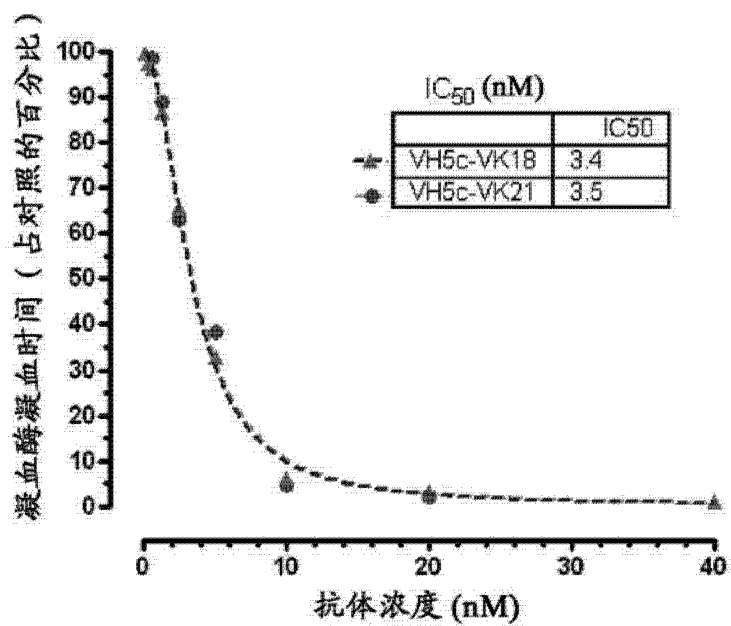


图 9

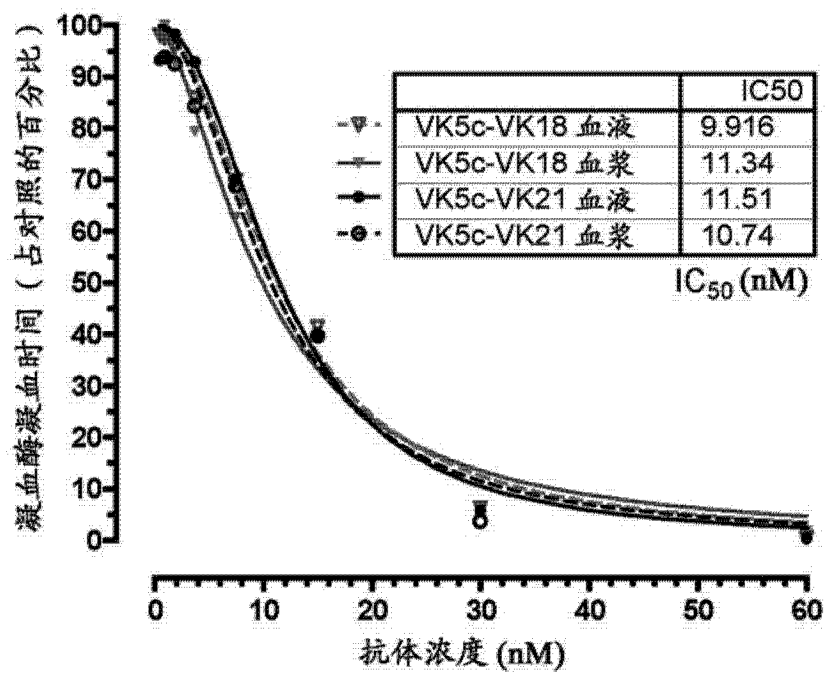


图 10

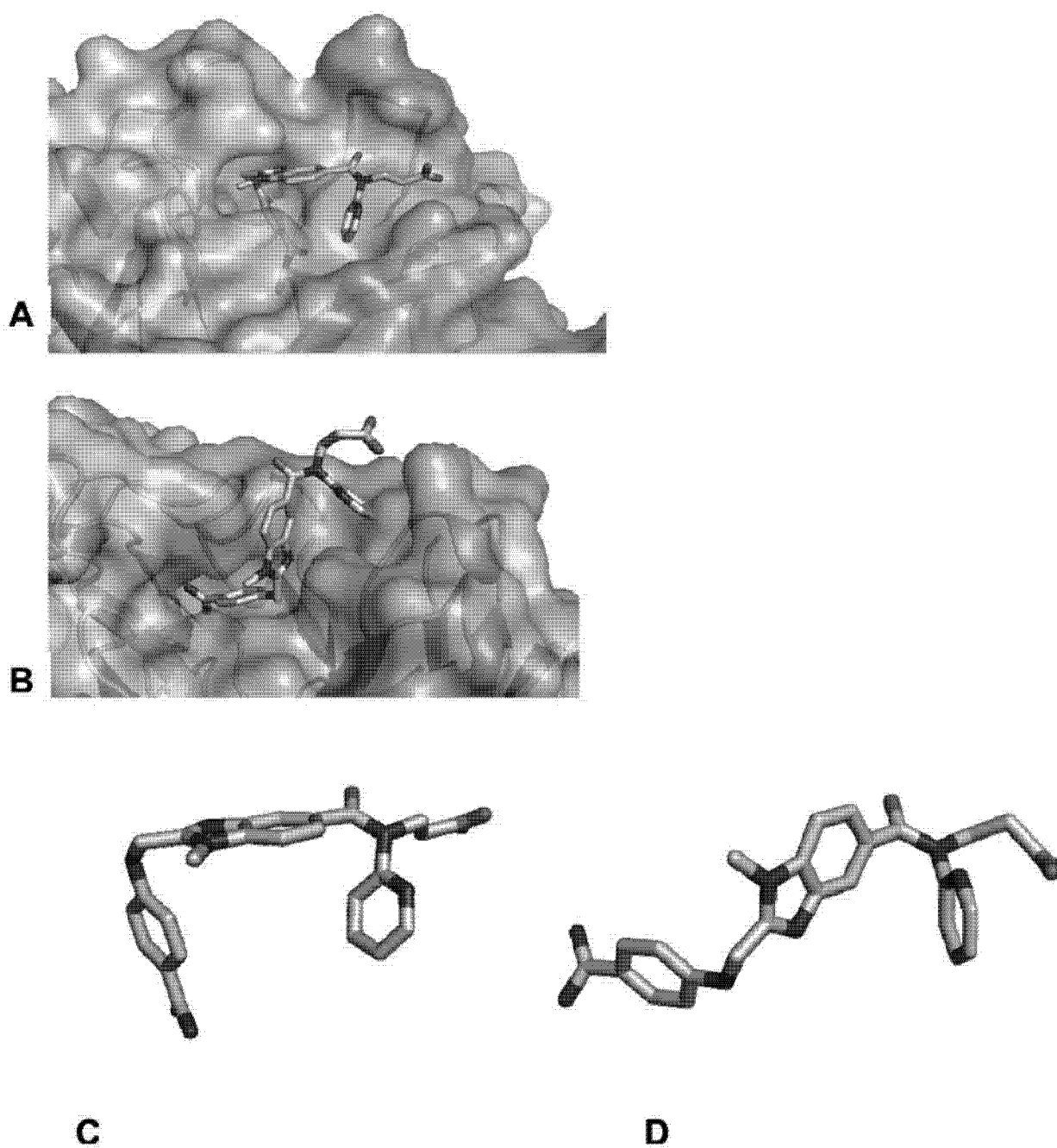
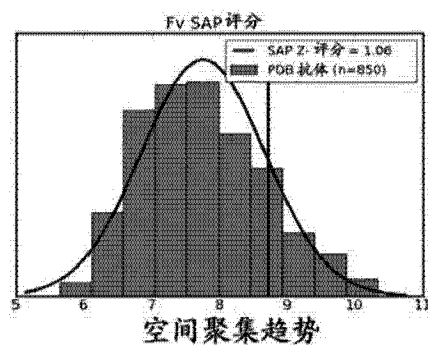
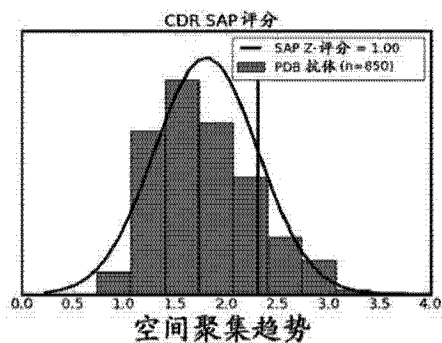
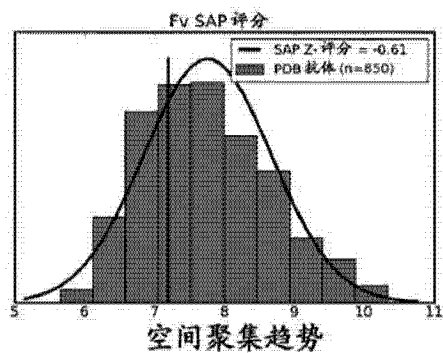
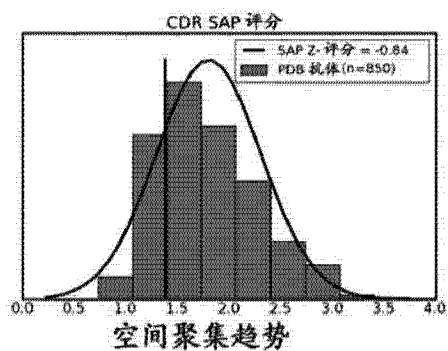


图 11

A) Fab 18/15



B) Fab VH5C/VK18



C) Fab VH5C/VK21

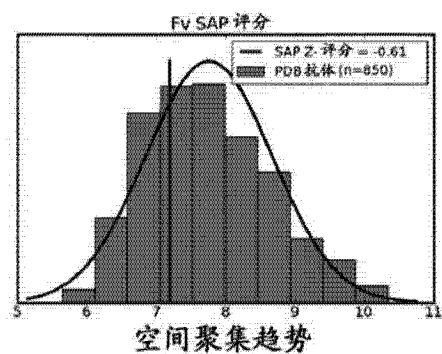
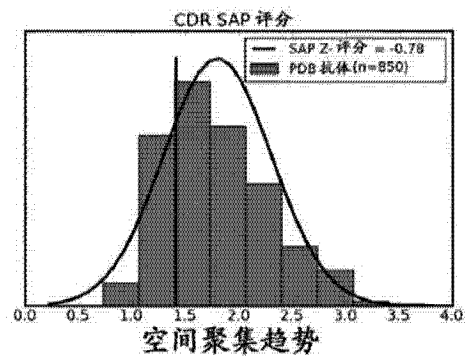


图 12

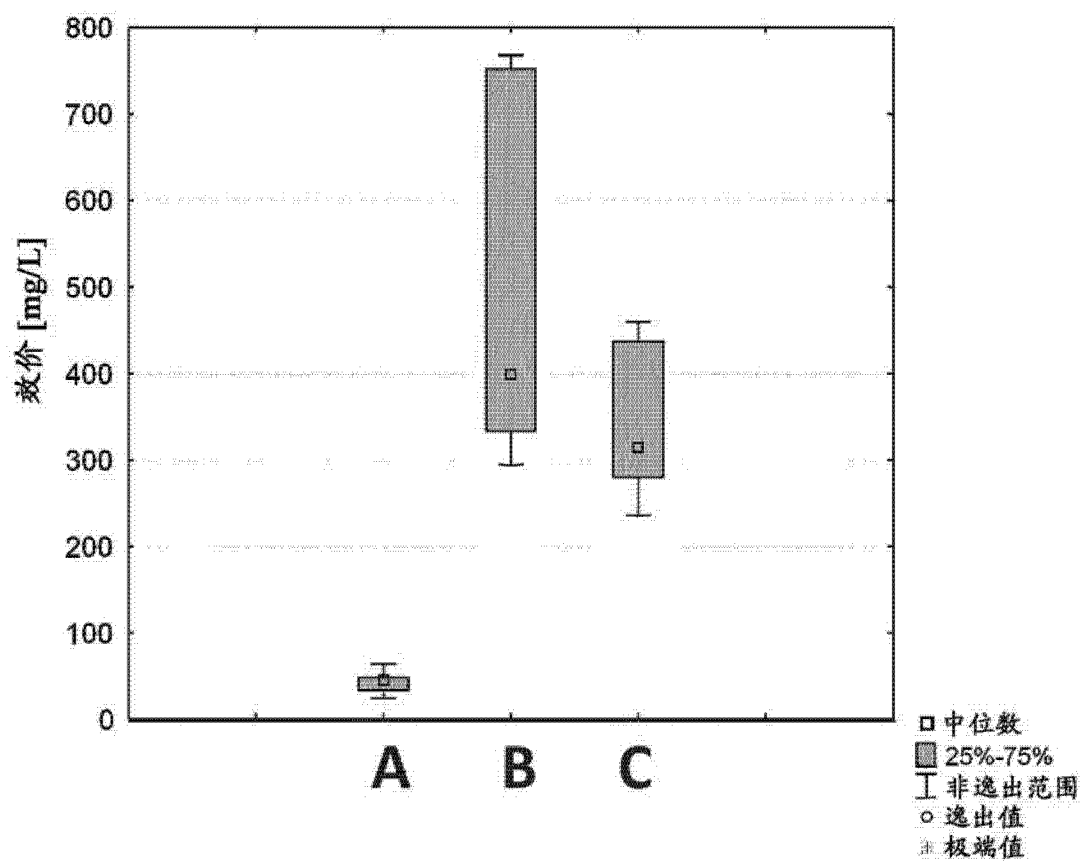


图 13