



(10) 授权公告号 CN 111727075 B

(45) 授权公告日 2024. 04. 05

(21) 申请号 201880076746.7

(22) 申请日 2018.11.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111727075 A

(43) 申请公布日 2020.09.29

(30) 优先权数据
62/591,168 2017.11.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2018/059318 2018.11.26

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/102435 EN 2019.05.31

(73) 专利权人 普渡制药公司
地址 美国康涅狄格州

(72) 发明人 丹尼尔·A·绍尔蒂什
托马斯·梅尔林
理查德·约翰·布伊克

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 郑斌 张福誉

(51) Int.Cl.
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/36 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2012237528 A1, 2012.09.20
CN 1303431 A, 2001.07.11
US 2004229301 A1, 2004.11.18
CN 106084053 A, 2016.11.09
CN 103119065 A, 2013.05.22
WO 2004039842 A2, 2004.05.13
E.C.w.Breij et al..An Antibody-Drug
Conjugate that Targets Tissue Factor
Exhibits Potent Therapeutic Activity
Against a Broad Range of Solid Tumors.
《Cancer Research》.2013,第74卷(第4期),
1214-1226.

审查员 张若曦

权利要求书3页 说明书55页
序列表17页 附图19页

(54) 发明名称

靶向人组织因子的人源化抗体

(57) 摘要

本公开提供了与人组织因子特异性结合,并且与正常血浆对照相比,不抑制组织因子介导的凝血的人源化抗体和抗体-药物缀合物。还描述了制备所公开的人源化抗体和抗体-药物缀合物的方法以及使用所公开的人源化抗体和抗体-药物缀合物治疗癌症的方法。

1. 一种与人组织因子特异性结合的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体或其抗原结合片段包含:

(i) SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区或其抗原结合片段;

(ii) SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区或其抗原结合片段;并且

(iii) 其中所述人源化抗体或其抗原结合片段与正常血浆对照相比,不抑制组织因子介导的凝血。

2. 如权利要求1所述的人源化抗体,其中所述抗体是全长抗体。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的人源化抗体或其抗原结合片段,其与人组织因子特异性结合,其中 K_D 为1.0nM至10nM。

4. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求1-3中任一项所述的人源化抗体或抗原结合片段的轻链或重链可变区。

5. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求1-3中任一项所述的人源化抗体或抗原结合片段的全长轻链或全长重链。

6. 一种载体,其包含如权利要求4所述的多核苷酸。

7. 一种载体,其包含如权利要求5所述的多核苷酸。

8. 一种宿主细胞,其包含如权利要求6所述的载体。

9. 一种宿主细胞,其包含如权利要求7所述的载体。

10. 一种宿主细胞,其经基因工程改造为包含如权利要求4所述的多核苷酸。

11. 一种宿主细胞,其经基因工程改造为包含如权利要求5所述的分离的多核苷酸。

12. 一种制备如权利要求1-3中任一项所述的人源化抗体的方法,其包括:(i) 培养表达所述人源化抗体的细胞;并且 (b) 从所述培养的细胞中分离所述人源化抗体。

13. 一种式 $Ab-(L-CA)_n$ 的抗体-药物缀合物,其中:

(i) Ab是与人组织因子特异性结合的人源化抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区或其抗原结合片段以及SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区或其抗原结合片段;并且

(ii) $(L-CA)_n$ 是接头-细胞毒性剂部分,其中L是接头,CA是细胞毒性剂,以及n表示1至8的数字。

14. 如权利要求13所述的抗体-药物缀合物,其中所述人源化抗体或其抗原结合片段与正常血浆对照相比,不抑制组织因子介导的凝血。

15. 如权利要求13或权利要求14所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:抗有丝分裂剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白抑制剂、RNA聚合酶II抑制剂、DNA烷化剂、DNA损伤剂和吡咯并苯并二氮杂~~草~~。

16. 如权利要求13-15中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:美登素、美登木素生物碱、倍癌霉素、喜树碱、澳瑞他汀、毒伞肽、加利车霉素和微管溶素。

17. 如权利要求16所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是美登素。

18. 如权利要求16所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。

19. 如权利要求16所述的抗体-药物缀合物,其中所述细胞毒性剂是澳瑞他汀。

20. 如权利要求19所述的抗体-药物缀合物,其中所述澳瑞他汀是单甲基澳瑞他汀E (MMAE)。

21. 如权利要求13-20中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述接头选自由以下组成的组:亲水性接头、脲接头、硫酰胺接头和基于二羧酸的接头。

22. 如权利要求13-21中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述接头是可裂解的接头。

23. 如权利要求13-22中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述接头是不可裂解的接头。

24. 如权利要求13-23中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中所述抗体-药物缀合物具有为1至8的药物:抗体比率(DAR)。

25. 如权利要求24所述的抗体-药物缀合物,其中所述抗体-药物缀合物具有为4的DAR。

26. 如权利要求24所述的抗体-药物缀合物,其中所述抗体-药物缀合物具有为2的DAR。

27. 一种药物组合物,其包含如权利要求13-26中任一项所述的抗体-药物缀合物和药学上可接受的载剂。

28. 如权利要求27所述的药物组合物,其中所述药物组合物具有在1至8的范围内的平均DAR。

29. 一种用于产生如权利要求13-26中任一项所述的抗体-药物缀合物的方法,其包括:
(i) 将所述接头连接至所述细胞毒性剂;(ii) 使所述接头-细胞毒性剂部分与所述抗体缀合;并且(iii) 纯化所述抗体-药物缀合物。

30. 治疗有效量的包含如权利要求1所述的人源化抗体或其抗原结合片段的组合物,如权利要求13-26中任一项所述的抗体-药物缀合物,或如权利要求27或28所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中治疗癌症的药物中的用途。

31. 如权利要求30所述的用途,其中所述癌症为实体瘤。

32. 如权利要求31所述的用途,其中所述实体瘤选自由以下组成的组:乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、黑素瘤、脑癌、头颈癌、上皮癌、肉瘤、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、尿路上皮癌和肺癌。

33. 如权利要求30所述的用途,其中所述癌症是恶性血液病。

34. 如权利要求33所述的用途,其中所述恶性血液病是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

35. 如权利要求33所述的用途,其中所述恶性血液病是急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特淋巴瘤(BL)或里希特转化。

36. 如权利要求33所述的用途,其中所述恶性血液病是霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)或慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

37. 如权利要求32所述的用途,其中所述实体瘤是头颈癌。

38. 如权利要求32所述的用途,其中所述肝癌是肝细胞癌(HCC)。

39. 如权利要求32所述的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。

40. 如权利要求32所述的用途,其中所述肺癌是小细胞肺癌(SCLC)。

41. 如权利要求30-40中任一项所述的用途,其中所述癌症过表达人组织因子。
42. 如权利要求30-41中任一项所述的用途,其中所述有需要的受试者是人受试者。

靶向人组织因子的人源化抗体

[0001] 发明背景

发明领域

[0002] 本公开属于人源化抗体、抗体-药物缀合物和癌症疗法的领域。具体而言,本公开涉及能够特异性结合人组织因子而不抑制正常组织因子介导的凝血的人源化抗体,其制备方法和使用方法,包括在癌症治疗中用作抗体-药物缀合物的方法。

[0003] 相关领域

[0004] 组织因子(TF),也称为促凝血酶原激酶、凝血因子III或CD142,是一种47-kDa的跨膜糖蛋白,与其天然配体因子VIIa一起,启动体内凝血级联。TF具有一个219个氨基酸的胞外区、一个23个氨基酸的跨膜区和一个21个氨基酸的胞质区。TF的胞外区是促凝血功能所需的并且由两个纤连蛋白III样结构域及II类细胞因子和干扰素受体的二硫桥特性分布组成。TF的胞质区含有可以磷酸化并且已经牵涉于细胞信号传导的三个丝氨酸残基。Aberg, M.和Siegbahn, A., J Thromb Haemost 11:817-825(2013)。

[0005] TF是由在正常情况下不暴露于流动的血液的细胞,诸如内皮下细胞(例如,平滑肌细胞)和血管周围的细胞(例如,成纤维细胞)表达的。然而,TF由许多类型的肿瘤细胞(包括肿瘤相关的血管内皮细胞)表达,其中TF暴露于血液蛋白。TF可以有助于转移、肿瘤生长和肿瘤血管生成。参见van den Berg, Y.W., Blood 119:924-32(2012); Kasthuri, R.S.等人, J Clin Oncol. 27:4834-8(2009)。重要的是,凝血的TF依赖性激活已牵涉于癌症相关的血栓形成和转移。同上。除其促凝活性以外,TF还具有细胞信号传导特性。在肿瘤细胞表面形成TF:FVIIa复合物导致G-蛋白偶联受体PAR2的裂解和激活。该TF:FVIIa-PAR2信号传导途径似乎会促进肿瘤生长和肿瘤血管生成。

[0006] 同上。

[0007] 也已将TF的表达水平与肿瘤细胞侵蚀性关联起来。Lima, L.G.和Monteiro R.Q., Biosci. Rep. 33:701-710(2013); Ruf, W.等人, J Thromb Haemost.:9(增刊1):306-315(2011)。此外,人TF也以可溶性交替剪接形式asHTF存在。已经发现asHTF会促进肿瘤生长(Hobbs等人, Thrombosis Res. 120:S13-S21(2007))。

[0008] 与TF-FVIIa相互作用位点结合的抗体可以抑制TF-FVIIa相互作用,从而抑制或阻断凝血。然而,将大量的那些抗体用于肿瘤疗法时,患者的有效出血控制可能受损。

[0009] 尽管在肿瘤学领域已经取得了许多进展,但是仍然需要改进的癌症治疗。因此,本公开提供了特异性靶向人组织因子的人源化抗体、抗体-药物缀合物和药物组合物,其用于治疗癌症而不抑制正常组织因子介导的凝血。

发明内容

[0010] 一方面,本发明提供了一种与人组织因子特异性结合的人源化抗体或其抗原结合片段,其中所述人源化抗体包含(i)与选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区或其抗原结合片段;(ii)与选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列具

有至少90%序列同一性的轻链可变区或其抗原结合片段;并且(iii)其中所述人源化抗体或其抗原结合片段与正常血浆对照相比,不抑制组织因子介导的凝血。

[0011] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含与选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的重链可变区。

[0012] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含具有选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的重链可变区。

[0013] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的重链可变区。

[0014] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含与选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的轻链可变区。

[0015] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含具有选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0016] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段包含具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的轻链可变区。

[0017] 在一些实施方案中,人源化抗体是全长抗体。

[0018] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段与人组织因子特异性结合,其中 K_D 为约1.0nM至约10nM。

[0019] 一方面,本公开提供了一种分离的多核苷酸,其编码本文所述的人源化抗体或抗原结合片段的轻链或重链可变区。在一些实施方案中,所述分离的多核苷酸编码本文公开的人源化抗体或抗原结合片段的全长轻链或全长重链。

[0020] 一方面,本公开提供了包含本文公开的多核苷酸的载体。

[0021] 一方面,本公开提供了包含本文公开的载体的宿主细胞。在一些实施方案中,所述宿主细胞经基因工程改造为包含如本文所公开的分离的多核苷酸。

[0022] 一方面,本公开提供了一种制备人源化TF抗体的方法,其包括(i)培养表达人源化抗体的细胞;并且(b)从培养的细胞中分离人源化抗体。

[0023] 一方面,本公开提供了一种式 $Ab-(L-CA)_n$ 的抗体-药物缀合物(ADC),其中(i)Ab是与人组织因子特异性结合的人源化抗体或其抗原结合片段,所述抗体包含与选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的重链可变区或其抗原结合片段以及选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的轻链可变区或其抗原结合片段;并且(ii) $(L-CA)_n$ 是接头-细胞毒性剂部分,其中L是接头,CA是细胞毒性剂,并且n表示1至8的数字。

[0024] 在一些实施方案中,人源化抗体或其抗原结合片段与正常血浆对照相比,不抑制组织因子介导的凝血。

[0025] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物包含人源化组织因子抗体或抗原结合片段,其包含与选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的重链可变区或其抗体片段。

[0026] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物包含人源化组织因子抗体或其抗原结合片段,其包含具有选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的重链可变区或其抗体片段。

[0027] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物包含人源化组织因子抗体或其抗原结

合片段,其包含与选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的轻链可变区或其抗原结合片段。

[0028] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物包含人源化组织因子抗体或其抗原结合片段,其包含具有选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列的轻链可变区或其抗原结合片段。

[0029] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物包含与人组织因子结合的人源化抗体或其抗原结合片段,其包含具有选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的重链可变区或其抗原结合片段,以及具有选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列的轻链可变区或其抗原结合片段。

[0030] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物中的细胞毒性剂选自由以下组成的组:抗有丝分裂剂、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白抑制剂、RNA聚合酶II抑制剂、DNA烷化剂、DNA损伤剂和吡咯并苯并二氮杂~~草~~。在一些实施方案中,所述细胞毒性剂选自由以下组成的组:美登素、美登木素生物碱(maytansinoid)、倍癌霉素、喜树碱、澳瑞他汀(auristatin)、毒伞肽(amatoxin)、加利车霉素(calicheamicin)、微管溶素(tubulysin),及其衍生物或类似物。

[0031] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物中的细胞毒性剂是美登素。在一些实施方案中,所述细胞毒性剂是美登木素生物碱。在一些实施方案中,所述细胞毒性剂是澳瑞他汀。在一些实施方式中,所述细胞毒性剂是单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。

[0032] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物中的接头选自由以下组成的组:亲水性接头、脲接头、硫酰胺接头和基于二羧酸的接头。在一些实施方案中,所述接头是可裂解的接头。在一些实施方案中,所述接头是不可裂解的接头。

[0033] 在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物具有为1:8的药物:抗体比率(DAR)。在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物具有为4的DAR。在一些实施方案中,所述抗体-药物缀合物具有为2的DAR。

[0034] 一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含根据权利要求19-37中任一项所述的抗体-药物缀合物和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,所述药物组合物具有在1至8的范围内的平均DAR。

[0035] 一方面,本发明提供了一种用于产生抗体-药物缀合物的方法,其包括:(i)将所述接头连接至所述细胞毒性剂;(ii)使所述接头-细胞毒性剂部分与所述抗体缀合;并且(iii)纯化所述抗体-药物缀合物。

[0036] 一方面,本发明提供了一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,其包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含人源化抗体或其抗原结合片段的组合物、抗体-药物缀合物或药物组合物。

[0037] 在一些实施方案中,所述癌症为实体瘤。在一些实施方案中,所述实体瘤选自乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、黑素瘤、脑癌、头颈癌、上皮癌、肉瘤、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、尿路上皮癌和肺癌。

[0038] 在一些实施方案中,所述癌症为恶性血液病。在一些实施方案中,所述恶性血液病是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。在一些实施方案中,所述恶性血液病是急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、霍奇金淋巴瘤(HL,Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、弥漫性大B细胞淋巴瘤

(DLBCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特淋巴瘤(BL, Burkitt's lymphoma)或里希特转化(Richter's transformation)。在一些实施方案中,所述恶性血液病是霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)或慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

[0039] 在一些实施方案中,所述实体瘤是头颈癌。在一些实施方案中,所述肝癌是肝细胞癌(HCC)。在一些实施方案中,所述肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方案中,所述肺癌是小细胞肺癌(SCLC)。

[0040] 在一些实施方案中,所述癌症过表达人组织因子。在一些实施方案中,有需要的受试者是人受试者。

附图说明

[0041] 图1.具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His₆标签序列的全长人组织因子的核苷酸(SEQ ID NO:1)和氨基酸(SEQ ID NO:2)序列。

[0042] 图2.具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His₆标签序列的人组织因子的胞外结构域的核苷酸(SEQ ID NO:3)和氨基酸(SEQ ID NO:4)序列。

[0043] 图3A-3B.图3A.鼠抗体TF278的重链可变区(VH0)的核苷酸(SEQ ID NO:5)和氨基酸(SEQ ID NO:6)序列。图3B.鼠抗体TF278的轻链可变区(VL0)的核苷酸(SEQ ID NO:7)和氨基酸(SEQ ID NO:8)序列。六个CDR序列带下划线。

[0044] 图4A-4B.图4A.本文中称为“B278-LC7HC6变体”的人源化组织因子抗体的重链可变区(VH6)的核苷酸(SEQ ID NO:25)和氨基酸(SEQ ID NO:9)序列。图4B.人源化TF抗体B278-LC7HC6变体的轻链可变区(VL7)的核苷酸(SEQ ID NO:26)和氨基酸(SEQ ID NO:12)序列。六个CDR序列带下划线。

[0045] 图5A-5B.公开的人源化TF抗体B278变体的轻链(图5A)和重链(图5B)可变区的比对。VL5、VL6和VL7是基于VL3的在框架内的关键残基处具有各种突变的三个变体。VL8是基于不同的人亚型,但与鼠VL0具有物理相似性的新变体。两个另外的VH变体,VH5和VH6,是基于VH4的,各自具有一组不同的突变。六个CDR用方框指示。

[0046] 图6.纯化的人源化B278抗体变体的还原性SDS-PAGE(4-20%丙烯酰胺凝胶)分析。泳道1:SeeBlue plus 2(Invitrogen,CA),泳道2:B278-LC3HC5变体,泳道3:B278-LC3HC6变体,泳道4:B278-LC5HC4变体,泳道5:B278-LC5HC5变体,泳道6:B278-LC5HC6变体,泳道7:B278-LC6HC4变体#2,泳道8:B278-LC6HC5变体,泳道9:B278-LC6HC6变体,泳道10:B278-LC7HC4变体,泳道11:B278-LC7HC4变体#2;泳道12:B278-LC7HC5变体,泳道13:B278-LC7HC6变体,泳道14:B278-LC7HC6变体#2,泳道15:B278-LC8HC4变体#2,泳道16:B278-LC8HC5变体,泳道17:B278-LC8HC6变体,泳道18:SeeBlue plus 2(Invitrogen,CA)。

[0047] 图7.纯化的人源化B278抗体变体的非还原性SDS-PAGE(4-20%丙烯酰胺凝胶)分析。泳道1:SeeBlue plus 2(Invitrogen,CA),泳道2:B278-LC3HC5变体,泳道3:B278-LC3HC6变体,泳道4:B278-LC5HC4变体,泳道5:B278-LC5HC5变体,泳道6:B278-LC5HC6变体,泳道7:B278-LC6HC4变体#2,泳道8:B278-LC6HC5变体,泳道9:B278-LC6HC6变体,泳道10:B278-LC7HC4变体,泳道11:B278-LC7HC4变体#2;泳道12:B278-LC7HC5变体,泳道13:B278-LC7HC6变体,泳道14:B278-LC7HC6变体#2,泳道15:B278-LC8HC4变体#2,泳道16:B278-

LC8HC5变体,泳道17:B278-LC8HC6变体,泳道18:SeeBlueplus 2(Invitrogen,CA)。

[0048] 图8.人源化B278抗体LC7和LC8变体及嵌合B278-LC0HC0与重组人凝血因子III(也称为组织因子)的结合。嵌合对照B278-LC0HC0含有鼠可变区和人恒定区。

[0049] 图9A-9B.来自于尺寸排阻色谱(SEC)分析的两份重复的样品B278-LC7HC6变体(样品名称:PS-F09-2016-012)的紫外线色谱图($\lambda=280\text{nm}$)。

[0050] 图10A-10B.来自于疏水相互作用色谱(HIC)分析的两份重复的样品B278-LC7HC6变体(PS-F09-2016-012)的紫外线色谱图($\lambda=280\text{nm}$)。

[0051] 图11A-11B.为评估结合亲和力及缔合和解离速率而对人源化B278-LC7HC6变体(图11A)和嵌合对照B278-LC0HC0(图11B)进行的Biacore™/SPR结合分析。

[0052] 图12.样品B278-LC7HC6的示例性纳米-DSC热谱图(第一重复)和拟合。数字5指示的线条表示所记录的数据,数字4指示的线条表示拟合结果。鉴定的个体转变用数字1、2和3指示的线条示出。

[0053] 图13.人源化TF抗体B278-LC7HC6变体对组织因子介导的凝血的抑制。2N2、1L6和5D6是表达人源化B278-LC7HC6变体的CHO细胞系的亚克隆物,针对人源化LC7HC6抗体的最佳表达水平进行选择。对照1(ADG4507, Sekisui Diagnostics, MA)和对照2(ADG4508, Sekisui Diagnostics, MA)是已知会抑制组织因子介导的凝血级联的激活的对照抗体。LC0HC0是B278的嵌合形式。

具体实施方式

[0054] 定义

[0055] 为促进对本公开的理解,下面定义多个术语和短语。另外的定义在整个详细描述中阐述。

[0056] 如本文所用,术语“人组织因子”(在本文中可互换地称为“TF”或“hTF”)是指由细胞自然表达或由人组织因子基因转染的细胞表达的任何天然人组织因子或其任何剪接变体、等位基因变体、同种型和物种同源物。hTF可以具有NCBI参考序列:NP_001984(同种型1)或NCBI参考序列:NP_001171567.1(同种型2)中的蛋白质序列。人组织因子在本领域中也称为促凝血酶原激酶、凝血因子III或CD142。术语“hTF”涵盖“全长”未加工的hTF以及由细胞内加工产生的任何形式的hTF。本文描述的hTF多肽可以从各种来源,诸如从人组织类型或其它来源分离,或通过重组或合成方法制备。

[0057] 如本文所用,术语“抗体”或“Ab”意指免疫球蛋白分子(或其抗原结合片段),其识别靶标(诸如蛋白质、多肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或其组合)并通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原结合位点与靶标特异性结合。如本文所用,术语“抗体”涵盖完整的单克隆抗体、完整的多克隆抗体、由至少两个完整抗体产生的双特异性或多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、经修饰的抗体、单链抗体、单链Fv(scFv)、二硫键连接的Fv(dsFv)、抗体片段(诸如Fab、F(ab')₂和Fv片段,由Fab表达文库产生的片段,以及包含VL或VH结构域的片段)、抗独特型(抗Id)抗体(包括,例如本文公开的TF抗体的抗Id抗体)、细胞内产生的抗体(即,胞内抗体)和抗原结合抗体片段。

[0058] 本文描述的抗体,可以基于其分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链恒定结构域的同源性,是五个主要类别的免疫球蛋白(即,IgA、IgD、IgE、IgG和IgM),或其亚类(同种型)(即,IgG1、

IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)中的任一种。在一些实施方案中,免疫球蛋白是IgG1同种型。在一些实施方案中,免疫球蛋白是IgG2同种型。在一些实施方案中,免疫球蛋白是IgG4同种型。不同类别的免疫球蛋白具有不同且熟知的亚基结构和三维构型。本文描述的抗体可以是未修饰的或与其它分子诸如毒素、放射性同位素等缀合。

[0059] 术语“抗TF抗体”或“与TF结合的抗体”是指能够以足够的亲和力结合组织因子的抗体,使得该抗体可用作靶向人组织因子的诊断剂和/或治疗剂。抗TF抗体与不相关的非hTF蛋白的结合程度可以低于抗体与hTF的结合的约10%,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案中,抗体与hTF结合的解离常数(K_d) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 。

[0060] 术语“抗体片段”是指完整抗体的一部分,其包含完整抗体的抗原决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段、线性抗体、单链抗体和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0061] 如本文所用,术语“单克隆抗体”旨在用于本领域中,并且是指从与相同抗原决定簇(表位)结合的基本上同源的抗体群体中获得的抗体。“基本上同源”意指单独的抗体除了可少量存在的可能天然存在的突变以外是相同的。这与多克隆抗体形成对比,多克隆抗体通常包括针对各种不同的抗原决定簇(表位)的不同抗体。术语“单克隆抗体”涵盖完整的和全长单克隆抗体,以及抗体片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv)、单链(scFv)突变体、包含抗体部分的融合蛋白和包含抗原识别位点的任何其它经修饰的免疫球蛋白分子。“单克隆抗体”及其抗原结合片段以许多方式制成,包括但不限于,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达和转基因动物。

[0062] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指非人(例如鼠)抗体的形式,其是含有最小的非人(例如鼠)序列的特异性免疫球蛋白链、嵌合免疫球蛋白或其片段。通常,人源化抗体或其抗原结合片段是其中来自人互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特异性、亲和力和功能性的非人物种(例如,小鼠、大鼠、兔和仓鼠等)的CDR的残基置换的人免疫球蛋白(Jones等人,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-327(1988);Verhoeyen等人,Science 239:1534-1536(1988))。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架区(FR)残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人物种的抗体中的相应残基置换。人源化抗体还可以通过取代Fv框架区和/或被置换的非人残基内的其它残基进行修饰以改善和优化抗体特异性、亲和力和/或能力。一般而言,人源化抗体将包含至少一个且通常两个或三个可变结构域的基本上全部,可变结构域含有全部或基本上全部与非人免疫球蛋白相对应的CDR区,而全部或基本上全部的FR残基是人免疫球蛋白共有序列的那些。所述人源化抗体或其抗原结合片段还可以包含免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的免疫球蛋白恒定区或结构域(Fc)的至少一部分。用于产生人源化抗体的方法的非限制性实例在美国专利第5,225,539号;Roguska等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,USA 91:969-973(1994);以及Roguska等人,Protein Eng.9:895-904(1996)中有描述。在一些实施方案中,“人源化抗体”是表面重塑抗体(resurfaced antibody)。

[0063] 抗体的“可变区”是指抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区,无论是单独的还是组合的。重链和轻链的可变区各自由四个相对保守的框架区(FR)通过三个互补决定区(CDR)连接组成,也称为高变区。每条链中的CDR通过FR紧密靠近在一起,并且与来自其它链

的CDR一起,有助于形成抗体的抗原结合位点。

[0064] 有至少两种用于确定CDR的技术:(1)基于跨物种序列变异性的方法(即,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991));和(2)基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法(Al-lazikani等人,J.Molec.Biol.273:927-948(1997))。另外,在本领域中有时使用这两种方法的组合来确定CDR。当提及可变结构域中的残基(大致为轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(Kabat等人,Sequences of Immunological Interest,第5版,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。

[0065] 依照Kabat的氨基酸位置编号是指Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中,用于抗体汇编的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统,实际线性氨基酸序列可含有更少的或另外的氨基酸,分别对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可以包括在H2的残基52之后的单个氨基酸插入物(例如,根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。对于给定的抗体,可以通过在抗体序列的同源性区域与“标准”Kabat编号序列比对来确定残基的Kabat编号。

[0066] 而Chothia是指结构环的位置(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。Chothia CDR-H1环的末端,当使用Kabat编号惯例进行编号时,在H32和H34之间根据环的长度而改变(这是因为Kabat编号方案在H35A和H35B处放置插入;如果35A和35B都不存在,则环在32处结束;如果只有35A存在,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。AbM高变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且通过Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用。

环	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34
(Kabat 编号)			
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
(Chothia 编号)			
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0068] 如本文所用,术语“人源化组织因子抗体”是指能够与人组织因子特异性结合,而与正常血浆对照相比不抑制TF介导的凝血的人源化抗体(如以上定义)。通常,本文描述的人源化组织因子抗体能够以足够的亲和力结合组织因子,使得该抗体可用作靶向人组织因子的诊断剂和/或治疗剂。如本文公开的抗hTF抗体与不相关的非hTF蛋白的结合程度可以低于抗体与hTF的结合的约10%,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的。在某些实施方案

中,抗体与hTF结合的解离常数(Kd) $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 。还请参见下面的“结合亲和力”。

[0069] 本文公开的人源化组织因子抗体可以包含单独的或与整个或部分铰链区CH1、CH2、CH3和/或一个或多个Fc结构域组合的一个或多个可变区。

[0070] 如本文所用,术语“人抗体”意指由人产生的抗体或使用本领域中已知的任何技术制备的具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义包括完整的(或全长)抗体及其片段。

[0071] 如本文所用,术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两个或更多个物种的抗体。通常,轻链和重链两者的可变区对应于源自一个哺乳动物物种(例如小鼠、大鼠、兔等)的具有所需特异性、亲和力和能力的抗体的可变区,而恒定区与源自另一物种(通常是人)的抗体中的序列同源以降低在该物种中引发免疫应答的机会。

[0072] 如本文所用,术语“经修饰的抗体”是指已相对于效应功能进行修饰,从而增强抗体在介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)(也称为补体介导的细胞杀伤)方面的有效性的抗体。例如,可以在Fc区中引入一个或多个半胱氨酸残基,从而允许在该区域中形成链间二硫键。这样产生的同型二聚体抗体可具有改善的内化能力和/或增加的ADCC和CDC。参见Caron等人,J.Exp.Med.176:1191-1195(1992)和Shopes,B.,J.Immunol.148:2918-2922(1992)。如Wolff等人,Cancer Research 53:2560-2565(1993)所述,还可以使用异双功能交联剂制备抗肿瘤活性增强的同型二聚体抗体。可替代地,抗体可以被修饰,使其具有双Fc区,并且由此可以具有增强的补体介导的裂解和ADCC能力。参见Stevenson等人,Anti-Cancer Drug Design 3:219-230(1989)。另外,抗体可以被工程改造为产生糖型,这些糖型具有导致ADCC活性增强的改变的糖基化模式。参见美国专利第6,602,684号。

[0073] 本公开还涵盖特异性识别hTF的双特异性或双功能抗体。双特异性抗体是能够特异性识别并结合至少两个不同表位的抗体。不同的表位可以在相同分子(例如,相同hTF)内或不同分子上,使得例如抗体可特异性识别并结合hTF,以及例如凝血因子。双特异性或双功能抗体是具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可以通过多种方法产生,包括杂交瘤的融合或F(ab')片段的连接。参见,例如Songsivilai和Lachmann,Clin.Exp.Immunol.79:315-321(1990),Kostelny等人,J.Immunol.148:1547-1553(1992)。另外,双特异性抗体可形成为“双抗体”(Holliger等人,PNAS USA 90:6444-6448(1993))或“Janusins”(Traunecker等人,EMBO J.10:3655-3659(1991)和Traunecker等人,Int.J.Cancer Suppl.7:51-52(1992))。

[0074] 同样,多特异性抗体是对至少两种不同的抗原具有结合特异性的分子。虽然此类分子通常结合两种抗原(即双特异性抗体),但是具有另外特异性的抗体,诸如三特异性抗体也被本发明所涵盖。

[0075] 术语“表位”和“抗原决定簇”在本文中可互换使用,并且是指能够被特定抗体识别并特异性结合的抗原的部分。当抗原是多肽时,表位可由通过蛋白质三级折叠并置的连续氨基酸和非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在蛋白质变性后保留,而通过三级折叠形成的表位通常在蛋白质变性后丢失。表位通常包括呈独特空间构象的至少3个,并且更通常至少5个或8-10个氨基酸。

[0076] 在两个或更多个核酸或多肽的上下文中的术语“相同”或“同一性”百分比是指当出于最大对应性进行比较和比对(如有必要,引入空位),而不考虑任何保守性氨基酸取代作为序列同一性的一部分时,相同的或具有指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个序列或子序列。同一性百分比可以使用序列比较软件或算法或通过目视检查来测量。本领域中已知可用于获得氨基酸或核苷酸序列的比对的各种算法和软件。

[0077] 在一些实施方案中,序列比对算法是Karlin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.87:2264-2268(1990)描述的,如Karlin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.90:5873-5877(1993)中修改的算法,并且并入NBLAST和XBLAST程序中(Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1991)。在一些实施方案中,使用空位BLAST,如Altschul等人,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997)所述。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschul等人,Methods in Enzymology 266:460-480(1996)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech,South San Francisco,California)或Megalign(DNASTAR)是可用于比对序列的其它公开可用的软件程序。

[0078] 在一些实施方案中,两个核苷酸序列之间的同一性百分比是使用GCG软件中的GAP程序(例如,使用NWSgapdna.CMP矩阵及空位加权40、50、60、70或90和长度加权1、2、3、4、5或6)而确定的。在某些替代实施方案中,并入了Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))的在GCG软件包中的GAP程序,可用于确定两个氨基酸序列之间的同一性百分比(例如,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,及空位加权16、14、12、10、8、6或4和长度加权1、2、3、4、5)。可替代地,在某些实施方案中,核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比是使用Myers和Miller的算法(CABIOS4:11-17(1989))确定的。例如,可以使用ALIGN程序(版本2.0)和使用PAM120,以残基表、空位长度罚分12和空位罚分4来确定同一性百分比。用于通过特定比对软件进行最大限度比对的适当参数可由本领域的技术人员确定。在某些实施方案中,使用该比对软件的默认参数。在某些实施方案中,第一氨基酸序列与第二氨基酸序列的同一性百分比“X”按照 $100 \times (Y/Z)$ 计算,其中Y是在第一和第二序列比对(如通过目视检查或特定的序列比对程序进行比对)中被评分为相同匹配的氨基酸残基的数目并且Z是第二序列中的残基的总数。

[0079] 在一些实施方案中,任何特定多核苷酸是否与参考序列具有一定序列同一性百分比(例如,至少80%相同,至少85%相同,至少90%相同,并且在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%或99%相同),可以使用Bestfit程序(Wisconsin序列分析包,8版本用于Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,575 Science Drive, Madison,WI 53711)确定。Bestfit利用Smith和Waterman,Advances in Applied Mathematics 2:482-489(1981)的局部同源性算法来寻找两个序列间的最佳同源性区段。当使用Bestfit(或任何其它序列比对程序来确定特定序列是否与根据本公开的参考序列例如95%相同)时,将参数设置成以便在参考核苷酸序列全长上计算同一性百分比,并且允许高达参考序列中核苷酸总数5%的同源性空位。

[0080] 在一些实施方案中,本发明的两个核酸或多肽“基本上相同”,意指如使用序列比较算法如Bestfit或通过视觉观察进行测量的,在出于最大对应性进行比较和比对时,它们具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,并且在一些实施方案中,至少95%、96%、97%、98%、99%的核苷酸或氨基酸残基同一性。同一性可以存在于长度为至少约10个,约20个,约40-60个残基或介于之间的任何整数值的序列区域上,并且可以是在长

于60-80残基的区域,例如至少约90-100个残基的区域上,并且在一些实施方案中,在比较的序列的全长上,例如核苷酸序列的编码区上,序列基本上相同。

[0081] 术语“结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间非共价相互作用的总和强度。除非另外指出,否则如本文所用的“结合亲和力”是指反映抗原和抗体之间1:1相互作用的固有结合亲和力。抗体对其抗原的亲和力通常可用解离常数(K_D)来表示。 K_D 是解离速率(“解离速率”或 $k_{\text{解离}}$ 或 k_d)与缔合速率(“缔合速率”或 $k_{\text{缔合}}$ 或 k_a)之比,通常用摩尔浓度(M)表示。

[0082] 亲和力可通过本领域已知的常用方法(包括本文中描述的那些方法)进行测量。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持结合更久。可替代地说明, K_D 越小,结合亲和力越强。多种测量结合亲和力的方法是本领域已知的,其中任何一种可用于本公开的目的。在一些实施方案中,用于测定抗体 K_D 的方法是通过使用表面等离子共振(SPR),通常使用生物传感器系统,诸如Biacore系统来实现的。参见以下实施例6。

[0083] “或更佳”在本文中用于指结合亲和力时是指分子与其结合配偶体之间更强的结合。“或更佳”当在本文中用于指更强的结合时,以更小的 K_D 数值表示。例如,对抗原的亲和力为“0.6nM或更佳”的抗体,抗体对抗原的亲和力表示为 $K_D \leq 0.6\text{nM}$,即0.59nM、0.58nM、0.57nM等,或小于0.6nM的任何结合亲和力值。

[0084] 术语“特异性结合”通常意指抗体经由其抗原结合结构域与表位结合,并且该结合需要抗原结合结构域和表位之间有一定互补性。根据该定义,当抗体经由其抗原结合结构域与表位结合比它与随机的无关表位结合更容易时,称抗体与该表位“特异性结合”。术语“特异性”在本文中用于修饰某一抗体与某一表位结合的相对亲和力。例如,可以认为抗体“A”对于给定表位具有比抗体“B”更高的特异性,或者可以称抗体“A”与表位“C”结合的特异性比其对相关表位“D”所具有特异性的更高。

[0085] “优先结合”,意指抗体与表位特异性结合,比它与相关、相似、同源或类似的表位结合更容易。因此,与给定表位“优先结合”的抗体与该表位结合的可能性比与相关表位结合更高,即使此类抗体可以与相关表位交叉反应。

[0086] 如果抗体与表位优先结合,达到在一定程度上阻断参考抗体与该表位结合的程度,则称抗体“竞争性抑制”参考抗体与给定表位的结合。竞争性抑制可以通过本领域已知的任何方法(例如,竞争ELISA测定)确定。可以称抗体竞争性抑制参考抗体与给定表位的结合至少90%、至少80%、至少70%、至少60%或至少50%。

[0087] 如本文所用,短语“基本上相似”或“基本上相同”表示介于两个数值(通常一个与本发明的抗体相关,另一个与参考/比较抗体相关)之间的足够高的相似度,使得本领域技术人员将认为这两个值之间的差异在通过所述值(例如 K_D 值)测量的生物学特征的情形下几乎没有或没有生物学和/或统计学显著性。所述两个值之间的差异可以根据参考/比较抗体的值小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%或小于约10%。

[0088] “分离的”多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞是呈在自然界中不存在的形式或多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞。分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞包括已纯化到不再呈其于自然界中所存在的形式的程度的那些。在一些实施方案中,分离的多肽、抗体、多核苷酸、载体或细胞是基本上纯的。

[0089] 如本文所用,“基本上纯的”是指纯度为至少50%(即,不含污染物),纯度为至少90%,纯度为至少95%,纯度为至少98%,或纯度为至少99%。

[0090] 如本文所用,术语“抗体-药物缀合物”(ADC),是指其中至少一种化合物连接或缀合至如本文所公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段的组合物。术语抗体-药物缀合物和免疫缀合物在本文中可互换使用。在一些实施方案中,连接到人源化组织因子抗体或其抗原结合片段的化合物是细胞毒性剂。

[0091] 如本文所用,“细胞毒性剂”是指缀合至本文公开的人源化组织因子抗体或抗原结合片段的化合物或药物,其当施用时,引起细胞死亡,诱导细胞死亡或以其它方式降低细胞活力。在一些实施方案中,所述细胞是癌细胞或肿瘤细胞。缀合至本文描述的人源化组织因子抗体的细胞毒性剂也称为“有效载荷”或“细胞毒性有效载荷”。

[0092] 可以缀合至本文公开的人源化组织因子抗体的细胞毒性剂可以选自各种类别的剂。在一些实施方案中,细胞毒性剂是微管蛋白抑制剂,诸如澳瑞他汀和美登木素生物碱。在一些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱或美登木素生物碱类似物。在一些实施方案中,细胞毒性剂是RNA聚合酶II抑制剂,诸如鹅膏蕈碱(Amanitin)。在一些实施方案中,细胞毒性剂是拓扑异构酶I抑制剂,诸如喜树碱。在一些实施方案中,细胞毒性剂是DNA烷化剂,诸如倍癌霉素。本文描述了其它细胞毒性剂。

[0093] 如本文所用,术语“接头”、“连接基团”和“接头序列”可互换使用,并且是指能够将化合物,诸如细胞毒性剂(例如,澳瑞他汀、鹅膏蕈碱或美登木素生物碱)连接到如本文所公开的人源化组织因子抗体的任何化学部分。接头可以是在化合物或抗体保持活性的条件下,对例如二硫键裂解敏感或基本上耐受的。接头可以是可裂解的或不可裂解的。合适的接头是本领域中已知的并且包括,例如二硫化物基团、硫醚基团、酸不稳定基团、光不稳定基团、肽不稳定基团和酯酶不稳定基团。在一个实施方案中,所述接头是可裂解的。

[0094] 在一些实施方案中,抗体-药物缀合物中每个抗体或其抗原结合片段可含有多种细胞毒性剂和/或每个抗体或其抗原结合片段可含有多个接头。

[0095] 如本公开和权利要求书中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“所述(该)”包括复数形式。

[0096] 如本文所用,术语“约”和“大约”用于修饰数值或数值范围时,表明比该值或范围高多至10%和低至5%至10%的偏差仍然在列举的值或范围的预期含义内。

[0097] 因此,本文在短语诸如“A和/或B”中使用的术语“和/或”意在包括“A和B两者”、“A或B”、“A”和“B”。

[0098] 开放式术语诸如“包括(include/including)”、“含有(contain/containing)”等意指“包含(comprising)”。这些开放式过渡短语用于引入元件、方法步骤等的开放式列表,不排除另外的未列举的元件或方法步骤。每当在本文用措辞“包含”来描述各方面时,还提供以“由……组成”和/或“基本上由……组成”描述的其它类似方面。

[0099] 人源化组织因子抗体

[0100] 本公开提供了抗体、其抗原结合片段和抗体-药物缀合物,其全部特异性结合人TF(hTF)。

[0101] 本公开还提供了能够与hTF结合的分离的人源化抗体,其中所述抗体与正常血浆对照相比不抑制TF介导的凝血,并且其中所述抗体可以启动一种或多种Fc介导的机制。因

为本文公开的人源化TF抗体不抑制正常TF介导的凝血,所以在用本文公开的人源化TF抗体治疗的患者中,正常的血浆凝固不受影响。在某些实施方案中,人源化TF抗体是分离的。

[0102] 本文提供了具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的人组织因子的全长核苷酸和氨基酸序列,分别用SEQ ID NO:1和2表示。

[0103] SEQ ID NO:1:具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的全长人组织因子的核苷酸序列。

ATGGAGACCCCTGCCTGGCCCCGGGTCCCGCGCCCCGAGA
CCGCCGTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCCA
GGTGGCCGGCGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATAT
AATTTAACTTGGAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGT
GGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAG
CACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACA
GACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTG
AAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGA
ATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAA
CTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAG
[0104] CCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAAT
GTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAAC
ACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTA
TACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACA
GCCAAAACAAACACTAATGAGTTTTTTGATTGATGTGGATAAAG
GAGAAAACACTGTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCG
AACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTAT
GGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAATATTCTACATCAT
TGGAGCTGTGGTATTTGTGGTCATCATCCTTGTCATCATCCTGG
CTATATCTCTACACAAGTGTAGAAAGGCAGGAGTGGGGCAGA
GCTGGAAGGAGAACTCCCCACTGAATGTTTCAAGAGGATCCCA
[0105] CCATCACCATCACCATTAA

[0106] SEQ ID NO:2:具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的全长人组织因子的氨基酸序列。

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVA
AYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYT
TDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENS
[0107] PEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCF
VQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFREIFYIIGAVVFVVIILV
IILAISLHKCRKAGVGQSWKENSPLNVSRRGSHHHHHH

[0108] 已知基本抗体结构单元包含由两对相同的多核苷酸链组成的四聚体,每一对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分限定主要负责Fc介导的机制的恒定区。人轻链分类为K和 λ 轻链。重链分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别限定抗体的同种型为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。通常参见,Fundamental Immunology,第7章(Paul,W.编辑,第2版,Raven Press,N.Y.(1989))。每个轻链/重链对的可变区形成抗原结合位点。因此,完整的IgG抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中以外,两个结合位点是相同的。

[0109] 本文公开的人源化TF抗体源自美国专利第7,993,644号中公开的鼠亲本抗体TF278,该专利通过引用整体并入本文。鼠抗体TF278的重链和轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列分别以SEQ ID NO:5-8提供,并且示于图3A和3B中。

[0110] SEQ ID NO:5:鼠抗体TF278的可变重链结构域(VH)的核苷酸序列(VH0):

GAGGTCCAGCTGCAGCAATCTGGAGCTGAGCTGATGAAGC
CTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACAC
ATTCAGTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGG
ACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGCT
[0111] AGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTC
ACTGCAGATACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCA
GCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAGA
TTATTACTACGGTAGTAGCTACGGGTTTGCTTACTGGGGCCAA
GGGACTCTGGTCACTGTCTCGAGT

[0112] SEQ ID NO:6:鼠抗体TF278的可变重链结构域(VH)的氨基酸序列(VH0):

EVQLQQSGAELMKPGASVKISKATGYTFSSYWIEWVKQRP
[0113] GHGLEWIGEILPGSASTKYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSL
TSEDSAVYYCARDYYYGSSYGFAFWGQGTLVTVSS

[0114] SEQ ID NO:7:鼠抗体TF278的可变轻链结构域(VL)的核苷酸序列(VL0):

CAGGCTGTTGTGACTCAGGAATCTGCACTCACCACATCAC
CTGGTGAAACAGTCACACTCACTTGTCTGCTCAAGTACTGGGGC
TGTTACAAC TAGTA ACTATGCCAACTGGGTCCAAGAAAAACCA
[0115] GATCATTTATTC ACTGGCCTAATAGGTGGTACCAACAACCGAG
GTCCAGGTGTTCTCCTGCCAGATTCTCAGGCTCCCTGATTGGAGA
CAAGGCTGCCCTCACCATCACAGGGGCACAGACTGAGGATGA
GGCAGTATATTTCTGTGCTCTATGGTACAGCAACCATTGGGTGT
TCGGTGGAGGAACCAA ACTGACTGTCCTAGGT

[0116] SEQ ID NO:8:鼠抗体TF278的可变轻链结构域(VL)的氨基酸序列(VL0):

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQEK
[0117] PDHLFTGLIGGTNNRGPV PARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAV
YFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG

[0118] 本文公开的人源化TF抗体包含选自SEQ ID NO:9-11的重链可变区或选自SEQ ID NO:12-16的轻链可变区。本公开还提供了能够干扰本文公开的人源化TF抗体与hTF结合的分离的抗TF抗体,其中所述抗TF抗体与正常血浆对照相比,不抑制TF介导的凝血。

[0119] 在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段结合与正常人TF多肽(例如,SEQ ID NO:2)具有至少约95%、至少约90%、至少约85%、至少约80%、至少约75%、至少约70%、至少约65%、至少约60%、至少约55%、至少约50%、至少约45%或至少约40%的氨基酸序列同一性的多肽。

[0120] 本文公开的人源化TF抗体可以与hTF多肽或hTF的多肽片段免疫特异性结合。在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体与hTF免疫特异性结合。在其它实施方案中,本文公开的人源化TF抗体与hTF的胞外结构域免疫特异性结合。如本文所用,“hTF的胞外结构域”意在指hTF的位于细胞外表面上的219个氨基酸残基的部分(参见例如图2,提供了人组织因子的胞外结构域的核苷酸(SEQ ID NO:3)和氨基酸(SEQ ID NO:4)序列。

[0121] SEQ ID NO:3:具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的人组织因子的胞外结构域的核苷酸序列:

ATGGAGACCCCTGCCTGGCCCCGGGTCCCGCGCCCCGAGA
CCGCCGTCGCTCGGACGCTCCTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCCA
[0122] GGTGGCCGGCGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCAGCATAT
AATT TAACTTGGAATCAACTAATTTCAAGACAATTTTGGAGT
GGGAACCCAAACCCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAATAAG

CACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAATGCTTTTACACAACA
GACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTG
AAGCAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGA
ATGTGGAGAGCACCGGTTCTGCTGGGGAGCCTCTGTATGAGAA
CTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTCGGACAG
CCAACAATTCAGAGTTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAAT
[0123] GTGACCGTAGAAGATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAAC
ACTTTCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGCAAGGACTTAATTTA
TACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACA
GCCAAAACAAACACTAATGAGTTTTTGATTGATGTGGATAAAG
GAGAAAACACTGTTTTCAGTGTTCAAGCAGTGATTCCCTCCCG
AACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAGTGTAT
GGGCCAGGAGAAAGGGGAATTCAGAGAAAGAGGATCCCACCA
TCACCATCACCATTAA

[0124] SEQ ID NO:4:具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的人组织因子的胞外结构域的氨基酸序列:

METPAWPRVPRPETAVARTLLLGWVFAQVAGASGTTNTVA
AYNLTWKSTNFKTILEWEPKPVNQVYTVQISTKSGDWKSKCFYT
TDTECDLTDEIVKDVKQTYLARVFSYPAGNVESTGSAGEPLYENS
[0125] PEFTPYLETNLGQPTIQSFEQVGTKVNVTVEDERTLVRRNNTFLSL
RDVFGKDLIYTLYYWKSSSSGKKTAKTNTNEFLIDVDKGENYCFS
VQAVIPSRTVNRKSTDSPVECMGQEKGEFRERGSHHHHHH

[0126] 在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体与hTF优先结合。在其它实施方案中,本文公开的人源化TF抗体与hTF免疫特异性结合,而不与任何其它抗原交叉反应。本文公开的人源化TF抗体与正常血浆对照相比,不抑制TF介导的凝血。在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体启动一种或多种Fc介导的机制。

[0127] 如本文所用,术语“抗原结合抗体片段”(或“抗原结合片段”)是指与本文公开的人源化抗体的相应全长或天然多肽序列相比,是多肽序列的一部分或部分的多肽。多肽序列的一部分或部分可以是本文公开的全长人源化TF抗体的全长多肽序列的至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或至少约99%,但保留了全长抗体的至少一定程度的结合特异性,并且与正常血浆对照相比,不抑制TF介导的凝血。该抗原结合片段也能够启动Fc介导的机制。

[0128] 本文公开的抗体分子的抗原结合抗体片段(包括衍生物)(例如,VH结构域和/或VL

结构域)包括但不限于,具有全长抗体的至少20个、至少40个、至少60个、至少80个、至少100个、至少120个、至少140个、至少160个或超过160个氨基酸的片段(包括衍生物),并且可以包括VH结构域、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL结构域、VL-CDR1、VL-CDR2和/或VL-CDR3。可针对生物活性对所得抗体或抗原结合抗体片段进行筛选以鉴定保留所需活性(例如,结合hTF的能力)的片段。

[0129] 在一些实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体包含选自SEQ ID NO:9-11的重链可变序列。在一些实施方案中,人源化组织因子抗体包含选自SEQ ID NO:12-16的轻链可变序列。表1和2中分别提供了重链和轻链可变序列。

[0130] 表1.TF抗体B278的人源化变体的重链可变区的氨基酸序列

简要说明	序列(SEQ ID NO)
[0131] 人源化 TF 抗体 B278 的重链可变区 VH6 的氨基酸序列	EVQLQQSGAEVMKPGASVKISCKASGY TFSSYWIEWVKQAPGQGLEWIGEILPGS ASTKYNEKFKGRVTFTADTSTNTAYME LSSLRSEDNAVYYCARDYYYGSSYGFA YWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:9)
人源化 TF 抗体 B278 的重链可变区 VH4 的氨基酸序列	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGY TFSSYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS ASTKYNEKFKGRVTMTTRDTSTSTVYME
[0132]	LSSLRSEDNAVYYCARDYYYGSSYGFA YWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:10)
人源化 TF 抗体 B278 的重链可变区 VH5 的氨基酸序列	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCASGY TFSSYWIEWVRQAPGQGLEWMGEILPGS ASTKYNEKFKGRVTMTADTSTNTVYME LSSLRSEDNAVYYCARDYYYGSSYGFA YWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:11)

[0133] 表2.TF抗体B278的人源化变体的轻链可变区的氨基酸序列

简要说明	序列(SEQ ID NO)
人源化 TF 抗体 B278 的轻链可变区 VL7 的氨基酸序列	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQLPKGLISGTNN RGPWTTARFSGSILGDKAVLTLWGAHT EDEAVYYCALWYSNHWVFGGGTKLTV LG(SEQ ID NO:12)
人源化 TF 抗体 B278 的轻链可变区 VL3 的氨基酸序列	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSSTGA VTTSNYANWIQQKPGQGPKTLISGTNN RGPWTTARFSGSILGDKAVLTLWGAHA EDEADYYCALWYSNHWVFGGGTHLTV QG(SEQ ID NO:13)
[0134] 人源化 TF 抗体 B278 的轻链可变区 VL5 的氨基酸序列	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQQKPGQTPTSLISGTNN RGPWTPARFSGSILGDKAVLTLWGAHA EDEADYFCALWYSNHWVFGGGTKLTV LG(SEQ ID NO:14)
人源化 TF 抗体 B278 的轻链可变区 VL6 的氨基酸序列	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGA VTTSNYANWVQEKPGHGFKGLISGTNN RGPWTTARFSGSILGDKAVLTLWGAHA EDEADYFCALWYSNHWVFGGGTKLTV LG(SEQ ID NO:15)
人源化 TF 抗体 B278 的轻链可变区 VL8 的氨基酸序列	QSALIQPPSVSGSPGQSVTISCRSSTGAV TTSNYANWVQQHPGTVPKPMIYGTTNR GPGVPDRFSGSKSGNTASMTISGLQAED EADYFCALWYSNHWVFGGGTKLTVLG(SEQ ID NO:16)

[0135] 在一些实施方案中,人源化TF B278抗体变体包含重链可变区VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3序列。在一些实施方案中,人源化TF B278抗体变体包含轻链可变区VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3序列。本文公开的每种人源化TF B278抗体变体的CDR序列如下:

[0136] VH-CDR1:GYTFSSYWIE(SEQ ID NO:19)

[0137] VH-CDR2:EILPGSASTKYNEKFKG(SEQ ID NO:20)

[0138] VH-CDR3:ARDYYYGSSYGFAY(SEQ ID NO:21)

[0139] VL-CDR1:RSSTGAVTTSNYAN(SEQ ID NO:22)

[0140] VL-CDR2:GTNNRGP(SEQ ID NO:23)

[0141] VL-CDR3:ALWYSNHWV(SEQ ID NO:24)

[0142] 以非限制性实例而言,如果抗体与蛋白质结合的解离常数(K_D)或解离速率($K_{解离}$)小于该抗体对第二抗原的 K_D 或 $K_{解离}$,则可以认为该抗体优先结合hTF。在其它非限制性实施方案中,如果抗体与蛋白质结合的 K_D 或 $K_{解离}$ 比该抗体对第二抗原的 K_D 或 $K_{解离}$ 小至少一个数量级,则可以认为该抗体优先结合hTF。在其它非限制性实施方案中,如果抗体与hTF结合的 K_D 或 $K_{解离}$ 比该抗体对第二抗原的 K_D 或 $K_{解离}$ 小至少两个数量级,则可以认为该抗体优先结合hTF。

[0143] 本文公开的人源化TF抗体也可以根据其与人源TF的结合亲和力来描述。在一些实施方案中,结合亲和力包括解离常数或 K_D 小于或等于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 或 $10^{-4}M$ 的那些结合亲和力。在其它实施方案中,亲和力包括解离常数或 K_D 小于或等于 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 或 $10^{-8}M$ 的那些结合亲和力。还有其它实施方案中,结合亲和力包括解离常数或 K_D 小于或等于 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 的那些结合亲和力。

[0144] 在一些实施方案中,本发明的抗体可以以小于或等于 $5 \times 10^{-2}秒^{-1}$ 、 $10^{-2}秒^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-3}秒^{-1}$ 或 $10^{-3}秒^{-1}$ 的解离速率($K_{解离}$)结合hTF多肽。在其它实施方案中,本发明的抗体可以以小于或等于 $5 \times 10^{-4}秒^{-1}$ 、 $10^{-4}秒^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-5}秒^{-1}$ 或 $10^{-5}秒^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-6}秒^{-1}$ 、 $10^{-6}秒^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-7}秒^{-1}$ 或 $10^{-7}秒^{-1}$ 的解离速率($K_{解离}$)结合hTF多肽或其片段。

[0145] 在本公开的一些实施方案中,与hTF免疫特异性结合的抗体可以包含具有由本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的任一重链和/或由本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的任一轻链的氨基酸序列的多肽。在本公开的其它实施方案中,与hTF免疫特异性结合的抗体可以包含具有由本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的重链的任一VH结构域和/或由本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的轻链的任一VL结构域的氨基酸序列的多肽。还有其它实施方案中,本公开的抗体可以包含由本发明的表达抗TF抗体的单一细胞系所表达的VH结构域和VL结构域的氨基酸序列。在其它实施方案中,本公开的抗体可以包含由本发明的表达抗TF抗体的两种不同细胞系所表达的VH结构域和VL结构域的氨基酸序列。包含本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的VH和/或VL结构域的抗原结合抗体片段,或可替代地由本发明的表达抗TF抗体的细胞系所表达的VH和/或VL结构域的抗原结合抗体片段组成的,与hTF免疫特异性结合的分子也被本发明所涵盖,编码这些VH和VL结构域、分子和/或片段的核酸分子也一样。

[0146] 本公开还提供了包含本文描述的人源化TF抗体分子(例如,VH结构域和/或VL结构域)的变体(包括衍生物)或可替代地由本文描述的人源化TF抗体分子(例如,VH结构域和/或VL结构域)的变体(包括衍生物)组成的多肽,所述多肽与hTF或其片段或变体免疫特异性地结合。术语“变体”是指与相应的天然多肽或DNA序列相比在其氨基酸或核苷酸序列上具有至少一个或多个差异的分子(例如,多肽或多核苷酸序列)。本发明的氨基酸序列变体将与如本文所公开的人源化TF抗体的氨基酸序列具有至少约70%、至少约75%、至少约85%、至少约95%或至少约99%的序列同一性。

[0147] “取代变体”是去除了天然序列中的至少一个氨基酸残基并且在它原来的相同位置插入了不同氨基酸的变体。所述取代可以是单一的,其中分子中仅一个氨基酸残基被取代,或者所述取代可以是多个的,其中在同一分子中有两个或更多个氨基酸残基被取代。“插入变体”是紧邻天然氨基酸序列中与氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接的特定位置的氨基酸插入了一个或多个氨基酸的变体。“缺失变体”是从天然氨基酸序列中去除了一个或多个氨基酸残基的变体。通常,缺失变体在分子的特定区域中将会有一个或两个氨基酸缺失。

[0148] 可以使用本领域技术人员已知的标准技术向如本文所公开的人源化TF抗体中引入突变,例如通过编码核酸分子的定点诱变或PCR介导的诱变,从而产生氨基酸取代。在一

些实施方案中,所述变体(包括衍生物)相对于参考多肽具有少于50个氨基酸的取代,少于40个氨基酸的取代,少于30个氨基酸的取代,少于25个氨基酸的取代,少于20个氨基酸的取代,少于15个氨基酸的取代,少于10个氨基酸的取代,少于5个氨基酸的取代,少于4个氨基酸的取代,少于3个氨基酸的取代,或少于2个氨基酸的取代。在一些实施方案中,变体多肽与本公开的多肽具有相同的免疫特异性,或与相同的表位结合。

[0149] 本领域熟知的是,具有相似的氨基酸序列的多肽或其片段或变体,可以具有相似的结构和许多相同的生物活性。因此,本公开还涉及一种分离的第一抗体,或其抗原结合片段,其具有与第二抗体至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,所述第二抗体包含选自以下组成的组的氨基酸序列:(a)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少一个CDR区;(b)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少两个CDR区;(c)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少三个CDR区;(d)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少一个CDR区;(e)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少两个CDR区;和(f)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少三个CDR区。在一些实施方案中,第一抗体或其抗原片段,与第二抗体具有相同的免疫特异性,或结合相同的表位。

[0150] 本公开还提供了一种分离的人源化TF抗体,或其抗原结合片段,其具有与选自SEQ ID NO:9-18的氨基酸序列至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段,与选自SEQ ID NO:9-18的氨基酸序列所编码的多肽具有相同的免疫特异性,或结合相同的表位。

[0151] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL3 (SEQ ID NO:13)和重链可变区VH4 (SEQ ID NO:10)组成的B278-LC3HC4变体。

[0152] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL3 (SEQ ID NO:13)和重链可变区VH5 (SEQ ID NO:11)组成的B278-LC3HC5变体。

[0153] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL3 (SEQ ID NO:13)和重链可变区VH6 (SEQ ID NO:9)组成的B278-LC6HC6变体。

[0154] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL5 (SEQ ID NO:14)和重链可变区VH4 (SEQ ID NO:10)组成的B278-LC5HC4变体。

[0155] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL5 (SEQ ID NO:14)和重链可变区VH5 (SEQ ID NO:11)组成的B278-LC5HC5变体。

[0156] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL5 (SEQ ID NO:14)和重链可变区VH6 (SEQ ID NO:9)组成的B278-LC5HC6变体。

[0157] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL6 (SEQ ID NO:15)和重链可变区VH4 (SEQ ID NO:10)组成的B278-LC6HC4变体。

[0158] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL6 (SEQ ID NO:15)和重链可变区VH5 (SEQ ID NO:11)组成的B278-LC6HC5变体。

[0159] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL6 (SEQ ID NO:15)和重链可变区VH6 (SEQ ID NO:9)组成的B278-LC6HC6变体。

[0160] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL7 (SEQ ID NO:12)和

重链可变区VH4(SEQ ID NO:10)组成的B278-LC7HC4变体。

[0161] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL7(SEQ ID NO:12)和重链可变区VH5(SEQ ID NO:11)组成的B278-LC7HC5变体。

[0162] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL7(SEQ ID NO:12)和重链可变区VH6(SEQ ID NO:9)组成的B278-LC7HC6变体。

[0163] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL8(SEQ ID NO:16)和重链可变区VH4(SEQ ID NO:10)组成的B278-LC8HC4变体。

[0164] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL8(SEQ ID NO:16)和重链可变区VH5(SEQ ID NO:11)组成的B278-LC8HC5变体。

[0165] 在一些实施方案中,人源化组织因子抗体是由轻链可变区VL8(SEQ ID NO:16)和重链可变区VH6(SEQ ID NO:9)组成的B278-LC8HC6变体。

[0166] 还提供了包括以下的多肽:(a)与SEQ ID NO:9-11和17具有至少约90%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:12-16和18具有至少约90%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,所述多肽包括与SEQ ID NO:9-18具有至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%序列同一性的多肽。因此,在某些实施方案中,还提供了包括以下的多肽:(a)与SEQ ID NO:9-11和17具有至少约95%序列同一性的多肽;和/或(b)与SEQ ID NO:12-16和18具有至少约95%序列同一性的多肽。在一些实施方案中,所述多肽包括:(a)具有SEQ ID NO:9-11和17的氨基酸序列的多肽;和/或(b)具有SEQ ID NO:12-16和18的氨基酸序列的多肽。在一些实施方案中,所述多肽是抗体和/或所述多肽特异性结合hTF。在一些实施方案中,所述多肽是特异性结合hTF的人源化抗体。在一些实施方案中,与SEQ ID NO:9-18具有一定百分比的序列同一性的多肽与SEQ ID NO:9-18的不同之处仅在于保守性氨基酸取代。

[0167] 多肽可以包含本文所公开的单条轻链或重链之一。抗体和多肽还可以包含如本文所公开的轻链和重链两者。本文提供了示例性的轻链和重链序列(LC7和HC6):

[0168] SEQ ID NO:17:全长重链HC6的氨基酸序列:

EVQLQQSGAEVMKPGASVKISCKASGYTFSSYWIEWVKQAP
[0169] GQGLEWIGEILPGSASTKYNEKFKGRVTFTADTSTNTAYMELSSL
RSEDTAVYYCARDYYYGSSYGFAIWGQGTLVTVSSASTKGPSVF
PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
[0170] LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0171] SEQ ID NO:18:全长轻链LC7的氨基酸序列:

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQK
PGQLPKGLISGTNNRGPWTTARFSGSILGDKAVLTLWGAHTEDEA
[0172] VYYCALWYSNHWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNK
YAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0173] 本公开还涵盖具有与本文描述的一种或多种抗体相同的一种或多种生物特征的人源化抗体。“生物特征”意在指人源化抗体的体外或体内活动或特性,例如,能够与TF(例如,细胞表面上表达的hTF或膜包埋的hTF)特异性结合,而与正常血浆对照相比不抑制TF介导的凝血的能力,或与本文公开的一种TF抗体结合相同表位的能力。此类表位结合可以用本领域已知的测定来常规地确定。

[0174] 本公开还涉及一种人源化TF单克隆抗体或其抗原结合片段,其具有与以ATCC登录号PTA-5676保藏的杂交瘤细胞系TF278产生的单克隆抗体所识别的表位结合的特征或竞争结合该表位。

[0175] 本公开还涉及一种与TF特异性结合的多肽或人源化抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:9-26的一个或多个氨基酸序列。

[0176] 产生抗体的方法

[0177] 与TF(例如,人TF)免疫特异性结合的抗体及其抗原结合片段可以通过本领域中已知的用于合成抗体及其抗原结合片段的任何方法来产生,例如,通过化学合成或通过重组表达技术。除非另有说明,否则本文描述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传学分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交,以及本领域技术范围内相关领域的常规技术。这些技术,例如在本文引用的参考文献中有描述并且在文献中进行了充分解释。参见,例如,Sambrook J.等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001); Ausubel, F.M. 等人, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987年和每年的更新); Coligan, J.E. 等人, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons (1987年和每年的更新); Gait. M.J. (编辑), Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL Press (1984); Eckstein, F. (编辑), Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press (1991); Birren, B. 等人 (编辑), Genome Analysis: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)。

[0178] 一方面,本文提供了一种制备与TF(例如,人TF)免疫特异性结合的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括培养本文描述的细胞或宿主细胞。在另一方面,本文提供了一种制备与TF(例如,人TF)免疫特异性结合的抗体或其抗原结合片段的方法,其包括使用本文描述的细胞或宿主细胞(例如,包含编码本文描述的抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸的细胞或宿主细胞)表达(例如,重组表达)所述抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,所述细胞是分离的细胞。在一些实施方案中,所述多核苷酸已经引入到细胞中。在一些实施方案中,所述方法还包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体或其抗原结合片段。

[0179] 用于产生目标抗原的多克隆抗体的方法是本领域中已知的(参见,例如Ausubel, F.M.等人编辑,Short Protocols in Molecular Biology中的第11章,第5版,John Wiley and Sons,New York,(2002))。例如,可以将目标多肽施用于各种宿主动物中的任一种,包括但不限于兔、小鼠、大鼠等,以诱导产生含有对抗原有特异性的多克隆抗体的血清。根据宿主物种,可以使用各种佐剂来增强免疫应答,并且包括但不限于,弗氏佐剂(完全和不完全)、矿物凝胶(如氢氧化铝)、表面活性物质(如溶血卵磷脂)、普朗尼克多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白、二硝基苯酚以及潜在有用的人佐剂例如BCG(卡介苗)和小棒状杆菌。此类佐剂也是本领域公知的。

[0180] 单克隆抗体可使用本领域已知的多种技术制备,包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术及其组合。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术产生,包括本领域已知的和例如在Harlow等人,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版.(1988);Hammerling等人,在Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas中,Elsevier,New York(1981),第563-681页中教导的,或如Kohler,G.和Milstein,C.,Nature 256:495-497(1975)描述的那些。可用于选择和产生本文描述的抗体的基于酵母的呈递方法的实例包括例如W02009/036379、W02010/105256和W02012/009568中公开的那些,其各自通过引用整体并入本文。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指由单个克隆物,包括任何真核、原核或噬菌体克隆物,而不是通过其产生方法得到的抗体。

[0181] 在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段是由克隆细胞(例如,产生重组抗体或其抗原结合片段的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体或其抗原结合片段,其中如例如通过ELISA或本领域中或本文提供的实例中已知的其它抗原结合测定所测定的,所述抗体或其抗原结合片段与TF(例如,人TF)免疫特异性结合。在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段可以是嵌合或人源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,单克隆抗体或其抗原结合片段可以是Fab片段或F(ab')₂片段。

[0182] 本文描述的抗体的抗原结合片段可通过本领域中已知的任何技术产生。例如,本文描述的Fab和F(ab')₂片段可以通过使用酶诸如木瓜蛋白酶(产生Fab片段)或胃蛋白酶(产生F(ab')₂片段)对免疫球蛋白分子进行蛋白水解裂解而产生。Fab片段对应于四聚体抗体分子的两个相同的臂中的一个,并且含有与重链的VH和CH1结构域配对的完整轻链。F(ab')₂片段含有四聚体抗体分子的两个抗原结合臂,这两个臂通过铰链区中的二硫键连接。

[0183] 此外,本文描述的抗体或其抗原结合片段也可以使用本领域已知的各种噬菌体展示和/或基于酵母的呈递方法来产生。在噬菌体展示方法中,蛋白质展示在携带编码这些蛋白质的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面。具体而言,编码VH和VL结构域的DNA序列是从动物cDNA文库(例如,受影响组织中的人或鼠cDNA文库)扩增的。将编码VH和VL结构域的DNA通过PCR与scFv接头重组在一起,并克隆到噬菌粒载体中。将载体在大肠杆菌(E.coli)中电穿孔并且用辅助噬菌体感染大肠杆菌。在这些方法中使用的噬菌体通常是包括fd和M13的丝状噬菌体,并且VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。可以用抗原,例如使用标记的抗原或结合或捕获到固体表面或珠粒上的抗原,选择或鉴定表达与特定抗原结合的抗体或其抗原结合片段的噬菌体。可用于制备本文描述的抗体或片段的噬菌体展示

方法的实例包括以下文献中公开的那些:Brinkman U.等人,J Immunol Methods 182:41-50(1995);Ames,R.S.等人,J Immunol Methods 184:177-186(1995);Kettleborough,C.A.等人,Eur J Immunol 24:952-958(1994);Persic,L等人,Gene 187:9-18(1997);PCT申请号PCT/GB91/001134;国际公开号WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;和WO 97/13844;及美国专利号5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743;和5,969,108。

[0184] 在一些实施方案中,针对hTF的抗体是人源化抗体或其抗原结合片段,其可以选自任何类别的免疫球蛋白(包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE)和任何同种型(包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄)。在一些实施方案中,在治疗上使用此类抗体,以在施用给人受试者时减少抗原性和HAMA(人抗小鼠抗体)应答。本文公开的人源化TF抗体可通过本领域已知的多种方法制备,所述多种方法包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公开WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735和WO 91/10741。另外,抗体可以使用本领域已知的多种技术人源化,所述多种技术包括例如,CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089),饰面或表面重塑(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka等人,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska等人,PNAS 91:969-973(1994)),和链改组(美国专利号5,565,332)。

[0185] 人源化抗体也可以在含有人免疫球蛋白基因座的转基因小鼠中产生,这些转基因小鼠能够在没有内源免疫球蛋白产生的情况下,在免疫后产生人抗体的所有组成部分。这种方法在美国专利5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016中有描述。

[0186] 在一些实施方案中,使用CDR移植(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089)人源化TF抗体。使用分子建模鉴定与鼠框架序列结构最相似的人框架序列。然后,将鼠CDR序列移植到人框架中并再次对组合序列建模,并且寻求仅那些移植的基本上不改变结构模型的CDR/框架序列。然后可以引入突变,以去除可干扰折叠和结构的残基或引入可以成为修饰(裂解、糖基化、酰胺化等)的靶标,或者可以产生强T细胞表位,从而导致人源化抗体具有免疫原性的位点。

[0187] 在一些实施方案中,针对hTF的抗体是人抗体。人抗体可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白,但是可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠产生。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机地或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。可替代地,除了人重链和轻链基因外,编码人可变区和恒定区的核酸也可以引入小鼠胚胎干细胞中。可以单独地或在通过同源重组引入人免疫球蛋白的同时致使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因无功能。在一些实施方案中,JH区的纯合缺失阻止内源性抗体产生。扩增经修饰的胚胎干细胞并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后使嵌合小鼠繁殖以产生表达人抗体的纯合后代。以正常方式用选定抗原,例如,全部或一部分目标多肽对转基因小鼠进行免疫。针对该抗原的单克隆抗体可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠中获得。由转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,随后经历类别转换和体细胞突变。因此,

使用此类技术,可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。

[0188] 对于这种用于生产人抗体的技术的综述,参见Lonberg和Huszar, Int.Rev.Immunol.13:65-93(1995)。对于这种用于生产人抗体和人单克隆抗体的技术的详细讨论,参见,例如,PCT公开W0 98/24893;W0 92/01047;W0 96/34096;W0 96/33735;欧洲专利号0598877;美国专利号5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;5,885,793;5,916,771;5,939,598;6,075,181;和6,114,598。亲和力和成熟策略和链改组策略是本领域中已知的并且可以用于产生高亲和力人抗体,参见Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992)。

[0189] 可以使用称为“导向选择”的技术来产生识别所选表位的全人抗体。在这种方法中,使用所选非人单克隆抗体,例如小鼠抗体,引导选择识别相同表位的全人抗体(Jespersen等人,Bio/technology 12:899-903(1988))。

[0190] 可用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括美国专利号4,946,778和5,258,498;Huston等人,Methods in Enzymology 203:46-88(1991);Shu等人,PNAS 90:7995-7999(1993);以及Skerra等人,Science 240:1038-1040(1988)中描述的那些。通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段,从而产生单链多肽来形成单链抗体。也可以使用在大肠杆菌中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等人,Science 242:1038-1041(1988))。

[0191] 另外,用于产生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见例如,Morrison,Science 229:1202(1985);Oi等人,BioTechniques 4:214(1986);Gillies等人,J.Immunol.Methods 125:191-202(1989);Neuberger等人,Nature 312:604-608(1984);Takeda等人,Nature 314:452-454(1985);美国专利号5,807,715;4,816,567;和4,816,397。

[0192] 一旦如本文所公开的TF抗体(即,人源化抗体)已经由动物产生,化学合成,或重组表达,其就可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法来纯化。纯化方法包括例如,通过色谱法(例如,离子交换、亲和力和施胶柱色谱法(sizing column chromatography))、离心、差异性溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。另外,本文公开的TF抗体或其片段可以融合到本文描述的或本领域另外已知的异源多肽序列上,以促进纯化。

[0193] 编码人源化TF抗体和及其多肽的核酸分子

[0194] 本公开还提供了一种分离的多核苷酸分子,其具有编码本文公开的人源化TF抗体的核苷酸序列。在一些实施方案中,分离的多核苷酸分子包含SEQ ID NO:25-28或35-36的核苷酸序列,或其片段或变体。在一些实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体包含分别由选自SEQ ID NO:25或26的核苷酸序列编码的重链或轻链可变区。在一些实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体包含分别由选自SEQ ID NO:35或36的核苷酸序列编码的重链或轻链可变区。SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:35之间的核苷酸序列差异在下面以粗体表示。SEQ ID NO:26和SEQ ID NO:36之间的核苷酸序列差异在下面也以粗体表示。在一些实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体包含分别由选自SEQ ID NO:27或28的核苷酸序列编码的全长重链或轻链序列。

[0195] SEQ ID NO:25:人源化TF抗体的重链可变区的核苷酸序列:

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCGGGAGCAGAGGTGATGAAG
CCCGGAGCCTCAGTGAAGATTAGCTGCAAAGCCTCGGGATACA
CTTTCTCGTCATACTGGATTGAATGGGTCAAACAGGCCCCCGG
CCAAGGACTGGAGTGGATTGGCGAAATCCTTCCTGGGAGCGCC
[0196] TCGACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGACGCGTGACATTC
ACCGCCGATACCAGCACCAACACTGCCTACATGGAGCTTAGCT
CATTGCGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGA
CTACTATTACGGCTCCTCATACGGCTTCGCATACTGGGGACAG
GGTACCTTGGTCACGGTGTCTCC

[0197] SEQ ID NO:35:人源化TF抗体的重链可变区的核苷酸序列:

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCGGGAGCAGAGGTGATGAAG
CCCGGAGCCTCAGTGAAGATTAGCTGCAAAGCCTCGGGATACA
CTTTCTCGTCATACTGGATTGAATGGGTCAAACAGGCCCCCGG
CCAAGGACTGGAGTGGATTGGCGAAATCCTTCCTGGGAGCGCC
[0198] TCGACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGACGCGTGACATTC
ACCGCCGATACCAGCACCAACACTGCCTACATGGAGCTTAGCT
CATTGCGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGA
CTACTATTACGGCTCCTCATACGGCTTCGCATACTGGGGTCAG
GGAACCTTGGTCACGGTGTCTCC

[0199] SEQ ID NO:26:人源化TF抗体的轻链可变区的核苷酸序列:

CAGGCTGTGGTCACTCAGGAGCCTTCGCTGACTGTCAGCC
[0200] CGGGCGGTACCGTGACCCTGACCTGTCGCTCCTCAACTGGAGC
AGTGACCACCTCCAACCTACGCGAACTGGGTGCAGCAGAAACCC
GGCCAACCTTCCTAAGGGACTGATCTCCGGCACTAACAACAGGG
GACCTTGGACCACCGCCCGGTTCTCCGGTTCCATCCTTGGGGA
[0201] CAAGGCGGTGCTGACACTGTGGGGGGGCCACACGGAGGACGA
GGCCGTCTACTACTGCGCGCTCTGGTACTCCAACCATTTGGGTGT
TTGGCGGAGGCACTAAGTTGACCGTGCTGGGC

[0202] SEQ ID NO:36:人源化TF抗体的轻链可变区的核苷酸序列:

[0203]

CAGGCTGTGGTCACTCAGGAGCCTTCGCTGACTGTCAGCC
CGGGTGGCACCGTGACCCTGACCTGTGCTCCTCAACTGGAGC
AGTGACCACCTCCAACCTACGCGAACTGGGTGCAGCAGAAACCC
GGCCAACTTCCTAAGGGACTGATCTCCGGGCACTAACAACAGGG
GACCTTGGACCACCGCCCGGTTCTCCGGTTCCATCCTTGGGGA
CAAGGCGGTGCTGACACTGTGGGGGGGCCACACGGAGGACGA
GGCCGTCTACTACTGCGCGCTCTGGTACTCCAACCATTTGGGTGT
TTGGCGGAGGCACTAAGTTGACCGTGCTGGGC

[0204]

SEQ ID NO:27:人源化TF抗体的全长重链的核苷酸序列:

[0205]

GAGGTCCAGCTGCAACAGTCGGGAGCAGAGGTGATGAAG
CCCGGAGCCTCAGTGAAGATTAGCTGCAAAGCCTCGGGATACA
CTTTCTCGTCATACTGGATTGAATGGGTCAAACAGGCCCCCGG
CCAAGGACTGGAGTGGATTGGCGAAATCCTTCCTGGGAGCGCC
TCGACCAAGTACAACGAGAAGTTCAAGGGACGCGTGACATTC
ACCGCCGATACCAGCACCAACACTGCCTACATGGAGCTTAGCT
CATTGCGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTGCGCGGGA
CTACTATTACGGCTCCTCATACGGCTTCGCATACTGGGGTCAG
GGAACCTTGGTCACGGTGTCTCCGCGTCCACCAAGGGTCCCT
CCGTGTTCCCTCTCGCGCCGTCCTCAAAGTCTACCTCCGGTGGA
ACTGCCGCGCTCGGTTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCGGAGC

CTGTGACTGTCTCCTGGA ACTCCGGGGCCCTCACCAGCGGAGT
GCACACTTTCCCCGCCGTGCTGCAATCCTCCGGCCTGTACAGCC
TGTCCTCCGTCGTGACTGTGCCTAGCTCCTCCCTGGGAACCCAG
ACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACACCAAGG
TCGACAAGAAGGTCGAACCGAAGTCGTGCGACAAGACTCATA
CGTGCCCTCCTTGCCCGGCCCGGAACTGCTGGGAGGCCCATC
CGTGTTCTGTGCCACCCAAGCCTAAGGATACCCTGATGATC
AGCAGAACACCGGAAGTGACCTGTGTGGTGGTGGACGTCAGC
CACGAAGATCCCGAGGTCAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGGG
TGGAGGTGCACAACGCAAAGACCAAGCCCCGGGAGGAACAGT
[0206] ACAACTCCACCTATCGCGTGGTGTCTGGTGTGCTGACGGTGTGCA
CCAGGACTGGTTGAACGGAAGGAGTATAAGTGCAAAGTGTC
GAACAAGGCCCTGCCCGCTCCTATCGAAAAGACCATCTCCAAG
GCCAAGGGCCAGCCGCGGGAACCCCAGGTCTACACTCTCCCAC
CGAGCCGCGACGA ACTGACTAAGAATCAAGTGTGCTGACTTG
CCTCGTCAAGGGCTTCTACCCGTCCGACATCGCCGTGGAATGG
GAGAGCAACGGCCAGCCGGAACA ACTACAAGACCACCCCT
CCCGTGCTGGATTCCGACGGGTCCTTCTTCTGTACTCAAACT
GACCGTGGATAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAATGTCTTTTCA
TGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTGCATAACCACTACACCCAGA
AGTCGCTGTCCCTGTCCCCGGGGAAGTGA
[0207] SEQ ID NO:28:人源化TF抗体的全长轻链的核苷酸序列:
CAGGCTGTGGTCACTCAGGAGCCTTCGCTGACTGTCAGCC
CGGGTGGCACCGTGACCCTGACCTGTCGCTCCTCAACTGGAGC
AGTGACCACCTCCA ACTACGCGAACTGGGTGCAGCAGAAACCC
[0208] GGCCA ACTTCCTAAGGGACTGATCTCCGGCACTAACAACAGGG
GACCTTGGACCACCGCCCGGTTCTCCGGTTCCATCCTTGGGGA
CAAGGCGGTGCTGACACTGTGGGGGGGCCACACGGAGGACGA
GGCCGTCTACTACTGCGCGCTCTGGTACTCCAACCATTTGGGTGT

TTGGCGGAGGCACTAAGTTGACCGTGCTGGGCCCAGCCTAAGGC
CGCACCATCGGTGACCCTGTTCCCGCCGAGCTCGGAAGAACTC
CAGGCCAACAAAGGCCACTCTGGTCTGCCTGATTTCCGACTTCT
ATCCCGGTGCTGTGACCGTGGCTTGGAAGGCCGATAGCTCGCC
[0209] CGTGAAGGCCGGAGTGGAACCACCCCGTCCAAACAGTC
CAACAATAAGTACGCCGCCTCCTCCTACTTGAGCCTCACGCCC
GAGCAGTGGAAGTCTACCGCTCATACTCCTGCCAAGTCACCC
ACGAAGGGAGCACTGTGGAAAAGACCGTGGCACCCACTGAGT
GCTCGTGA

[0210] 因此,本公开还涉及一种分离的多核苷酸,其具有编码第一抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列,所述第一抗体或其抗原结合片段具有与第二抗体的氨基酸序列至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%相同的氨基酸序列,第二抗体包含选自以下组成的组的氨基酸序列:(a)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少一个CDR区;(b)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少两个CDR区;(c)如SEQ ID NO:19-21所示的人源化TF抗体的VH结构域的至少三个CDR区;(d)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少一个CDR区;(e)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少两个CDR区;和(f)如SEQ ID NO:22-24所示的人源化TF抗体的VL结构域的至少三个CDR区。在一些实施方案中,第一抗体或其抗原片段,与第二抗体具有相同的免疫特异性,或与相同的表位结合。

[0211] 本公开还提供了一种多核苷酸分子,其具有编码与hTF结合而与正常血浆对照相比,不抑制正常TF介导的凝血,并且任选地,可以启动Fc介导的机制的抗原结合抗体片段的核苷酸序列。本公开还提供了一种分离的多核苷酸分子,其具有可以在严格条件下与SEQ ID NO:25-28的核苷酸序列的互补序列杂交并且编码可以与hTF结合而与正常血浆对照相比,不抑制正常TF介导的凝血,并且任选地,可以启动Fc介导的机制的多肽的核苷酸序列。本公开还提供了一种分离的多核苷酸分子,其包含与SEQ ID NO:25-28中的任一个具有至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性并且编码可以与hTF结合而与正常血浆对照相比,不抑制正常TF介导的凝血,并且任选地,可以启动Fc介导的机制的多肽的核苷酸序列。

[0212] 如本领域中已知的,两个核苷酸序列之间的“序列同一性”是通过将一个多核苷酸分子的核苷酸序列与第二多核苷酸分子的序列进行比较而确定的。当在本文中讨论时,可以使用本领域已知的方法和计算机程序/软件,例如Bestfit程序,如上所述,确定任何特定核苷酸序列是否与另一个核苷酸序列相同。

[0213] 如本文所用,“严格条件”是指第一多核苷酸分子与第二过滤器结合的多核苷酸分子在0.5M NaHPO₄、7%十二烷基硫酸钠(SDS)和1mM EDTA中在65℃下杂交并保持结合,然后在42℃下在0.2 X SSC/0.1% SDS中洗涤的能力(参见Ausubel等人(编辑),Current

Protocols in Molecular Biology,第1卷,Green Publishing Associates,Inc.,以及 John Wiley&Sons,Inc.,New York(1989),第2.10.3页)。

[0214] 载体和宿主细胞

[0215] 本公开还提供了包含如本文所公开的多核苷酸的重组载体,以及包含所述载体的宿主细胞。用本发明的载体对宿主细胞进行基因工程改造(转导、转化或转染),所述载体可以是,例如克隆载体或表达载体。所述载体可以是,例如呈质粒、病毒颗粒、噬菌体等的形式。宿主细胞可以在视情况经改良用于激活启动子、选择转化株或扩增本公开的基因的常规营养培养基中培养。培养条件,诸如温度、pH等,可以是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些,并且将为普通技术人员显而易见。

[0216] 本公开还提供了一种制备如本文所公开的人源化TF抗体的方法,其包括:(a)表达由本发明的分离的多核苷酸编码的抗体;并且(b)回收所述抗体。

[0217] 如本文所公开的多肽的片段或部分可以用于通过肽合成产生相应的全长多肽;因此,此类片段可以用作产生全长多肽的中间体。同样,如本文所公开的多核苷酸的片段或部分可以用于合成本公开的全长多核苷酸。

[0218] 如本文所公开的多核苷酸分子可以用于通过重组技术产生多肽。因此,例如,多核苷酸分子可以包括在用于表达多肽的多种表达载体中的任何一种中。此类载体包括染色体、非染色体和合成DNA序列,例如,SV40的衍生物;细菌质粒;噬菌体DNA;杆状病毒;酵母质粒;源自质粒和噬菌体DNA、病毒DNA如牛痘、腺病毒、禽痘病毒和伪狂犬病毒的组合的载体。然而,任何其它载体如果在宿主中可复制并且可存活,则可以使用。

[0219] 适当的DNA序列可以通过多种程序插入载体中。一般而言,将DNA序列通过本领域已知的程序插入载体中的一个或多个适当限制性内切核酸酶位点。此类程序是本领域已知的。

[0220] 将表达载体中的DNA序列可操作地连接到一个或多个适当的表达控制序列(启动子)以指导mRNA合成。此类启动子的代表性实例包括LTR或SV40启动子、大肠杆菌lac或trp、噬菌体 λ P_L启动子以及已知会控制原核或真核细胞或其病毒中的基因表达的其它启动子。表达载体还应含有用于翻译起始的核糖体结合位点,以及转录终止子。载体还可以包含用于扩增表达的适当序列,如下文所讨论的。

[0221] 另外,表达载体可以含有一个或多个选择标记基因,以提供用于选择已转化的宿主细胞的表型性状,所述表型性状诸如对于真核细胞培养的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性,或大肠杆菌中的四环素或氨苄青霉素抗性。

[0222] 含有如上文所述的适当DNA序列,以及适当的启动子或控制序列的载体,可用于转化适当的宿主细胞以容许所述宿主细胞表达所述蛋白质。许多合适的载体和启动子是本领域技术人员已知的并且可商购获得。提供以下载体作为非限制性实例:细菌:pQE70、pQE60、pQE-9(Qiagen)、pBS、pD10、phagescript、psiX174、pbluescript SK、pbsks、pNH8A、pNH16a、pNH18A、pNH46A(Stratagene);ptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia)。真核生物:pWLN0、pSV2CAT、pOG44、pXT1、pSG(Stratagene)pSVK3、pBPV、pMSG、pSVL(Pharmacia)。然而,其它质粒或载体如果在宿主中可复制并且稳定,则可以使用。

[0223] 启动子区可以使用CAT(氯霉素转移酶)载体或具有选择标记的其它载体从任何所需基因中选择。两种适当的载体是PKK232-8和PCM7。特别命名的细菌启动子包括lacI、

lacZ、T3、T7、gpt、 λP_R 、 P_L 和trp。真核生物启动子包括CMV立即早期、HSV胸苷激酶、早期和晚期SV40、来自逆转录病毒的LTR和小鼠金属硫蛋白-I。适当的载体和启动子的选择在本领域普通技术人员的技术水平内。启动子可以源自编码糖酵解酶诸如3-磷酸甘油酸激酶(PGK)、 α -因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白等的操纵子。待表达的异源结构序列在适当的阶段与翻译起始和终止序列组装,并且如有必要,与能够指导翻译的蛋白质分泌到周质空间或胞外介质中的前导序列组装。任选地,异源序列可以编码包括N末端或C末端鉴定肽的融合蛋白,鉴定肽赋予所需特征,例如,表达的重组产物的稳定化或简化纯化。

[0224] 在一些实施方案中,将信号序列用于构建含有如本文所公开的人源化TF抗体、抗原结合片段或其多肽的VH和VL的载体。例如,在一个实施方案中,核苷酸序列(SEQ ID NO:29,编码SEQ ID NO:30的信号肽)用于表达人源化TF抗体的重链可变区。在另一个实施方案中,核苷酸序列(SEQ ID NO:31,编码SEQ ID NO:32的信号肽)用于表达人源化TF抗体的轻链可变区。在另一个实施方案中,核苷酸序列(SEQ ID NO:33,编码SEQ ID NO:34的信号肽)用于表达人源化TF抗体的重链和轻链。下面表3中提供了示例性信号序列。

[0225] 表3. 示例性信号序列的核苷酸和氨基酸序列

SEQ ID NO	信号序列
SEQ ID NO:29	ATGGGATGGACTCTCGTGTTTCCTTTT TCTCCTCTCTGTCACTGCCGGGGTGC ATTCG
SEQ ID NO:30	MGWTLVFLFLLSVTAGVHS
SEQ ID NO:31	ATGGTGTCAAGCGCGCAGTTTCTGGG ACTGCTCCTGCTGTGTTTCCAAGGAA CCAGATGC
SEQ ID NO:32	MVSSAQFLGLLLLCFQGTRC
SEQ ID NO:33	ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT GGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGA TCTACTGGC
SEQ ID NO:34	METDTLLLWVLLLWVPGSTG

[0227] 在另一个实施方案中,本公开提供了含有上述构建体的宿主细胞。

[0228] 可以利用各种宿主表达载体系统来表达本文描述的抗体及其抗原结合片段(例如,包含如SEQ ID NO:19-24中所示的CDR的抗体或其抗原结合片段(参见,例如,美国专利号5,807,715)。此类宿主表达系统代表可以通过其产生目标编码序列并随后纯化的媒介物,而且还代表用适当的核苷酸编码序列转化或转染时,可以原位表达本文描述的抗体或其抗原结合片段的细胞。这些包括但不限于微生物,诸如用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如大肠杆菌(E.coli)和枯草芽孢杆菌(B.subtilis));用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(Saccharomyces Pichia));用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻类诸如莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii));或

携带有含源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa及NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞)。

[0229] 在一个特定实施方案中,用于表达本文描述的抗体及其抗原结合片段(例如,包含SEQ ID NO:19-24所示的CDR的抗体或其抗原结合片段)的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在一个特定实施方案中,用于表达本文描述的抗体的细胞是人细胞,例如人细胞系。在一个特定实施方案中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在一个特定实施方案中,特别是用于表达整个重组抗体分子的细菌细胞诸如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞),用于表达重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞连同载体诸如来自人巨细胞病毒的主要中间早期基因启动子元件是抗体的有效表达系统(Foecking, M.K.和Hofstetter, H, Gene 45:101-105 (1986);以及Cockett, M.I.等人, Biotechnology 8:662-667 (1990))。在某些实施方案中,本文描述的抗体或其抗原结合片段由CHO细胞或NS0细胞产生。

[0230] 另外,可以选择调节插入序列的表达,或以所需的特定方式修饰并加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(例如糖基化)和加工(例如裂解)可有助于蛋白质的功能。为此,可以使用具有对初级转录物正确加工、糖基化以及磷酸化基因产物的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括但不限于CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不产生任何内源性免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方案中,本文描述的抗TF抗体(包含SEQ ID NO:19-24所示的CDR的抗体或其抗原结合片段)在哺乳动物细胞,诸如CHO细胞中产生。

[0231] 宿主细胞中的构建体可以以传统方式用于产生由重组序列编码的基因产物。可替代地,本发明的多肽可以通过常规的肽合成仪合成产生。

[0232] 成熟蛋白质可以在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其它细胞中在适当启动子的控制下表达。也可以采用无细胞翻译系统,以使用源自本公开的DNA构建体的RNA来产生此类蛋白质。Sambrook等人, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) 描述了与原核和真核宿主一起使用的适当的克隆和表达载体。

[0233] 通过将增强子序列插入载体中可以增加高等真核生物对编码本文公开的多肽的DNA的转录。增强子是DNA的顺式作用元件,通常约10至300bp,作用于启动子以增加其转录或扩增表达。实例包括位于复制起始点后侧(late side)的SV40增强子(bp 100至270)、巨细胞病毒早期启动子增强子、位于复制起始点后侧的多瘤增强子以及腺病毒增强子。

[0234] 在合适的宿主株转化并且宿主株生长到适当的细胞密度后,可以通过适当的手段(例如,温度变化或化学诱导)引入所选启动子,并且再将细胞培养一段时间。

[0235] 在所需蛋白质保留在细胞内的情况下,通常通过离心收获细胞,通过物理或化学手段将其破碎,并保留所得粗提取物进行进一步纯化。可以通过任何便利的方法来破碎用于表达蛋白质的微生物细胞,这些方法包括冻-融循环、超声处理、机械破碎或使用细胞裂

解剂,或这些方法的组合。此类方法是本领域技术人员所公知的。

[0236] 如本文中所公开的多肽可通过包括以下各项的方法从重组细胞培养物中回收和纯化:硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、亲和色谱法、羟磷灰石色谱法和凝集素色谱法。必要时,蛋白质重折叠步骤可用于完成成熟蛋白质的构型。最后,可采用高效液相色谱法(HPLC)进行最终纯化步骤。

[0237] 如本文所公开的多肽可以是天然纯化的产物,或化学合成程序的产物,或是通过重组技术从原核或真核宿主(例如,培养的细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生的。根据在重组生产程序中使用的宿主,如本文所公开的多肽可以是糖基化的或者可以是非糖基化的。如本文所公开的多肽还可以包括起始甲硫氨酸氨基酸残基。

[0238] 一旦通过重组表达产生了本文描述的人源化hTF抗体或其抗原结合片段,就可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子的任何方法进行纯化,例如通过色谱法(例如,离子交换色谱法、亲和色谱法,特别是通过用于蛋白A之后的特异性抗原的亲和色谱法,以及施胶柱色谱法)、离心、差异性溶解度或通过用于蛋白质纯化的任何其它标准技术。此外,本文描述的抗体或其抗原结合片段可以融合到本文描述的或其它本领域已知的异源多肽序列上,以促进纯化。

[0239] 在一些实施方案中,本文描述的人源化TF抗体或其抗原结合片段是分离的或纯化的。通常,分离的抗体或其抗原结合片段是基本上不含具有与分离的抗体或其抗原结合片段不同的抗原特异性的其它抗体或其抗原结合片段的分离的抗体或其抗原结合片段。例如,在一个特定实施方案中,本文描述的抗体或其抗原结合片段的制剂基本上不含细胞物质和/或化学前体。

[0240] 抗体-药物缀合物

[0241] 如本文公开的人源化组织因子抗体可用于靶向hTF,包括在体内治疗方法中。所公开的人源化TF抗体包括通过任何类型的分子与抗体的共价连接而修饰或缀合的抗体衍生物。例如,但不是通过限制的方式,所述抗体衍生物包括已经例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封端基团衍生化、蛋白水解裂解、连接至细胞配体或其它蛋白质等方式修饰的抗体。许多化学修饰中的任何一种都可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。另外,衍生物可含有一种或多种非经典氨基酸。

[0242] 所公开的人源化TF抗体可以单独地或与其它组合物组合使用。抗体可以重组融合至异源多肽的N末端或C末端,或化学缀合(包括共价和非共价缀合)至多肽或其它组合物。例如,所公开的人源化组织因子抗体可重组融合或缀合至在检测测定中用作标记,或用作效应分子的分子,诸如异源多肽、药物、放射性核素或毒素。参见,例如,WO 92/08495、WO 91/14438、WO 89/12624、美国专利号5,314,995和EP 0396 387。

[0243] 在一些实施方案中,所公开的人源化组织因子抗体缀合至至少一种细胞毒性剂。“细胞毒性剂”是对细胞有毒的或其它方面有害的,从而导致细胞死亡,诱导细胞死亡,或以其它方式降低细胞活力的任何剂。在一些实施方案中,所述细胞是癌细胞或肿瘤细胞。缀合至本文描述的组织因子抗体的细胞毒性剂也称为“有效载荷”或“细胞毒性有效载荷”。

[0244] 在一些实施方案中,本文公开的抗体-药物缀合物由下式表示:Ab-(L-CA)_n,其中Ab是与人组织因子结合的人源化抗体,其包含:包含SEQ ID NO:9-11所示的氨基酸序列的

可变重链和包含SEQ ID NO:12-16所示的氨基酸序列的可变轻链;并且(L-CA)_n是接头-细胞毒性剂部分,其中L是接头,CA是细胞毒性剂,并且n是选自以下组成的组的数字:1至20、1至10、1至9、1至8、1至7、1至6和1至5。

[0245] 可以通过接头缀合至本文公开的人源化组织因子抗体的细胞毒性剂可以选自各种类别的剂。示例性的细胞毒性剂及可以缀合至本文公开的人源化组织因子抗体和抗原结合片段的剂的类别在Polakis,P.,Pharmacol.Rev.68:3-19(2016);Perez,H.L.等人,Drug Discovery Today 19:869-881(2014);Diamantis,N.和Banerji,U.,British Journal of Cancer 114:362-367(2016)中进行了讨论。

[0246] 在一些实施方案中,所公开的人源化组织因子抗体可缀合至细胞毒性剂,此类细胞毒性剂包括但不限于,抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪);烷化剂(例如,氮芥、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine,BSNU)和洛莫司汀(lomustine,CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺二氯二氨铂(II)(DDP)顺铂);蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星);抗生素(例如,更生霉素(以前称为放线菌素)、博来霉素、光神霉素和氨基霉素(AMC));抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱);和放射性核素。可用作治疗剂的放射性核素的实例包括但不限于¹³¹I、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y和¹⁸⁶Re。

[0247] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是微管蛋白抑制剂,诸如澳瑞他汀或美登木素生物碱。在一些实施方案中,细胞毒性剂是澳瑞他汀、多拉司他汀(dolastatin)类似物或澳瑞他汀衍生物。多拉司他汀类似物和澳瑞他汀阻断微管蛋白组装并引起G2/M期细胞周期阻滞。澳瑞他汀包括单甲基澳瑞他汀E(MMAE)和单甲基澳瑞他汀F(MMAF)。在美国专利号7,659,241中公开了有用的多拉司他汀类似物和缀合策略。

[0248] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是美登木素生物碱(例如,美登素)或美登木素生物碱类似物。美登素及其类似物(美登木素生物碱DM1和DM4)是有效的微管靶向化合物,其抑制有丝分裂细胞时的细胞增殖。参见,Lopus,M.等人.,Mol.Cancer Ther.9:2689-2699(2010)。这些细胞毒性剂作为缀合物的用途以及将此类剂缀合至抗体的方法在美国公开申请号2012/0009181的¶¶[0025]-[0030]、[0034]、[0036]、[0038]、[0040]、[0169]、[0185]和[0211]-[0218]中有描述。

[0249] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是RNA聚合酶II抑制剂,诸如蘑菇毒素毒伞肽或毒伞肽类似物。 α -鹅膏蕈碱是双环八肽,其是一种示例性的毒伞肽。 α -鹅膏蕈碱所来源的一种蘑菇种类是鬼笔鹅膏(Amanita phalloides)(Moldenhauer,G.等人,J Natl.Cancer Inst.104:622-634(2012)。类似物及其缀合物在公开申请号W02010/115629和W02014/043403中公开。

[0250] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是拓扑异构酶I(Topo I)抑制剂,诸如喜树碱或CPT(Ulukan,H.等人,Drugs 62:2039-2057(2002)或CPT类似物。示例性CPT类似物包括拓扑替康(Topotecan)、伊立替康(Irinotecan)、希拉替康(Silatecan)、科西替康(Cositecan)、依沙替康(Exatecan)、勒托替康(Lurtotecan)、吉马替康(Gimatecan)、贝洛替康(Belotecan)和鲁比替康(Rubitecan)。同上。

[0251] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是DNA烷化剂,诸如倍癌霉素或倍癌霉素类似物。有用的倍癌霉素类似物及其缀合物在公开申请号W02011/133039中公开。倍癌霉素衍生物

可以在DNA结合部分的选定位置或在DNA结合或DNA烷化部分上的取代基中具有杂原子或极性基团。在一些实施方案中,倍癌霉素衍生物的缀合物含有一个或多个前体部分。在一个更具体的实施方案中,此类缀合物在循环中具有足够的稳定性,但被激活在靶位点释放倍癌霉素衍生物。功能部分和倍癌霉素衍生物之间的接头的长度和性质可以适当改变。一方面,所述接头具有减小的接头长度。另一方面,所述接头含有自我消除间隔区系统。在又一个方面中,功能部分和倍癌霉素衍生物之间的接头含有被设计用于提高缀合物的药代动力学性质的一个或多个基团。在又一个方面中,功能部分和倍癌霉素衍生物之间的接头含有被设计用于提高缀合物的药代动力学性质的一个或多个基团。这些基团,例如,可以包括碳酸酯、氨基甲酸酯、尿素、酯、酰胺、亚胺、脲、酰肼、肟、二硫化物、缩醛或缩酮基团,如公开申请号WO 2011/133039中所述,该申请通过引用并入本文。

[0252] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是DNA损伤剂,诸如加利车霉素或加利车霉素衍生物。参见Maiese, W.M.等人, *J. Antibiot.* 42: 558-563 (1989); Watanabe, C.M.等人, *Chem Biol.* 9: 245-251 (2002)。

[0253] 在一些实施方案中,细胞毒性剂为吡咯并苯并二氮杂萘(pyrrolobenzodiazepine) (PBD)。PBD与离散DNA序列结合,引起致命性病变,并且尚未发现与常见化疗剂具有交叉抗性。参见Rio-Doria, J.等人, *Cancer Res.* 77: 2686-2698 (2017)。作为示例性的DNA小沟结合剂, PBD结合并交叉连接癌细胞DNA的特定位置点。这阻断癌细胞分裂而不扭曲其DNA螺旋,从而可能避免普遍的紧急抗药性现象。有用的PBD及其缀合物在美国专利号9,821,074中公开。

[0254] 在一些实施方案中,细胞毒性剂是微管溶素(tubulysin)类似物,如美国专利号9,688,721和Cohen, R.等人, *Cancer Res.* 74: 5700-5710 (2014)中所述。

[0255] 可以缀合至本文公开的人源化TF抗体的其它细胞毒性剂包括,但不限于,紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁(emetine)、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因(procaine)、丁卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素及其类似物或同源物。

[0256] 在一些实施方案中,细胞毒性剂可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可包括,例如毒素,诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子、 α -干扰素、 β -干扰素、神经生长因子、血小板衍生生长因子、组织纤溶酶原激活物、细胞凋亡剂,例如TNF- α 、TNF- β 、ATM I (参见, WO 97/33899)、ATM II (参见, WO 97/34911)、Fas配体(Takahashi等人, *Int. Immunol.* 6: 1567-1574 (1994))、VEGI (参见, WO 99/23105)、血栓形成剂或抗血管生成剂,例如,血管抑素或内皮抑素;或,生物应答调节剂如,诸如淋巴因子、白细胞介素-1 ("IL-1")、白细胞介素-2 ("IL-2")、白细胞介素-6 ("IL-6")、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 ("GM-CSF")、粒细胞集落刺激因子 ("G-CSF") 或其它生长因子。

[0257] 用于将此类细胞毒剂缀合至抗体的技术是已知的,参见例如, Arnon等人, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting of Drugs In Cancer Therapy," 在 *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* 中, Reisfeld等人编辑, Alan R. Liss, Inc. (1985), 第243-256页; Hellstrom等人, "Antibodies For Drug Delivery," 在 *Controlled*

Drug Delivery中,第2版,Robinson等人编辑,Marcel Dekker,Inc. (1987),第623-653页; Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review,"在 Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications中,Pinchera等人编辑(1985),第475-506页;"Analysis,Results,and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy,"在Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy中,Baldwin等人编辑,Academic Press (1985),第303-316页;和Thorpe等人,"The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjugates,"Immunol.Rev.62:119-158(1982),其全部通过引用并入本文。

[0258] 每个抗体分子的药物(例如,细胞毒性剂)分子的平均比率在本文中被称为"药物:抗体比率(DAR)".如上所述,本文公开的抗体-药物缀合物用式 $Ab-(L-CA)_n$ 表示;下标"n"选自由以下组成的组:1至20、1至10、1至9、1至8、1至7、1至6和1至5,并且反映了将用于计算DAR的细胞毒性剂分子的数目。在一些实施方案中,DAR为1-8、3-7、3-5或2.5-3.5。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物具有为1-8的DAR。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物具有为4的DAR。在一些实施方案中,抗体-药物缀合物具有为2的DAR。

[0259] 本公开涵盖通过一个或多个接头、接头序列或连接基团(下文称为"接头")缀合于细胞毒性剂的人源化组织因子抗体。在一些实施方案中,接头是在细胞内条件下可裂解的接头,使得接头的裂解使细胞毒性剂从抗体释放到细胞内环境中。在一些实施方案中,接头是不可裂解的并且细胞毒性剂通过抗体降解而释放。参见,例如公开申请号US 2005/0238649,其通过引用并入本文。

[0260] 在一些实施方案中,用于将本文公开的人源化组织因子抗体缀合至如本文所述的细胞毒性剂的接头技术如公开申请号W0 2011/133039中所述,该申请通过引用整体并入本文。

[0261] 在一些实施方案中,用于将本文公开的人源化组织因子抗体缀合至如本文所述的细胞毒性剂的接头技术是美国专利号7,659,241中描述的接头-药物技术,所述美国专利通过引用并入本文。参见美国专利号7,659,241;第60列第10行至第83列第47行;第83列第51行至第91列第67行;以及第92列第3行至第101列第33行。

[0262] 在一些实施方案中,用于将本文公开的人源化组织因子抗体缀合至如本文所述的细胞毒性剂的接头技术如美国专利号9,504,758中所述,所述美国专利通过引用整体并入本文。

[0263] 在一些实施方案中,本文公开的人源化组织因子抗体可融合至异源蛋白质(例如,免疫球蛋白Fc多肽或人血清白蛋白多肽)的N末端或C末端。例如,抗体可融合至白蛋白,诸如重组人血清白蛋白(参见,例如,美国专利号5,876,969、EP 0413622和美国专利号5,766,883)),从而产生嵌合多肽。在其它实施方案中,抗体可融合至成熟形式的人血清白蛋白(即,欧洲专利0322094的图1和图2所示的人血清白蛋白的氨基酸1-585)。在其它实施方案中,抗体可与多肽片段融合,所述多肽片段包含或可替代地由人血清白蛋白的氨基酸残基1-z组成,其中z是369至419的整数,如美国专利号5,766,883中所述。融合或缀合至多肽或其它目标分子的抗体也可以用于体外免疫测定和使用本领域中已知的方法的纯化方法中。参见例如,Harbor等人,同上,以及PCT公开W0 93/21232;EP 439,095;Naramura等人,

Immunol.Lett.39:91-99(1994);美国专利号5,474,981;Gillies等人,PNAS 89:1428-1432(1992);和Fell等人,J.Immunol.146:2446-2452(1991)。

[0264] 在一些实施方案中,本文公开的人源化组织因子抗体可缀合至第二抗体以形成抗体异缀合物,例如美国专利号4,676,980中所述。

[0265] 药物组合物

[0266] 本文提供了包含在生理上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂中具有所需纯度的本文公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段的组合物(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990)Mack Publishing Co.,Easton,PA)。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在采用的剂量和浓度下对受者是无毒的。

[0267] 在一些实施方案中,包含人源化TF抗体或其抗原结合片段的组合物与药学上可接受的载剂一起在制剂中提供(参见例如,Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,第20版(2003);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippencott,Williams and Wilkins(2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Pharmaceutical Press(2000))。

[0268] 本文描述的药物组合物可用于治疗诸如癌症等疾患。可以根据本文描述的方法治疗的癌症的实例包括但不限于,任何人和非人动物物种(包括猪、猫、狗和高级灵长类动物)的癌、肉瘤、淋巴瘤和白血病。

[0269] 本文公开的药物组合物(和治疗方法)适于治疗实体瘤,实体瘤可以通过广泛的脉管系统表征(微脉管肿瘤),包括各种细胞类型的癌、肉瘤和淋巴瘤。由本公开的治疗靶向的实体瘤包括但不限于:头颈癌,包括鳞状细胞和表皮样癌;腺癌,包括前列腺癌、硬癌和乳房腺癌;淋巴肉瘤;纤维肉瘤;骨肉瘤;平滑肌肉瘤;软骨瘤;前列腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃(胃部)癌、胰腺癌、喉癌、食管癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌或甲状腺癌;原发性肿瘤和转移瘤;黑素瘤;胶质母细胞瘤;卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma);非小细胞肺癌(NSCLC),包括鳞状类型和腺类型;晚期恶性肿瘤;和恶性血液病,例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。因为本发明的抗体不抑制正常TF介导的凝血,所以在用本文公开的人源化TF抗体治疗的患者中,正常的血浆凝固不受影响。

[0270] 在一些实施方案中,可通过本文公开的组合物(和方法)治疗的实体瘤是选自由以下组成的组的实体瘤:乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、黑素瘤、脑癌、头颈癌、上皮癌、肉瘤、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、尿路上皮癌和肺癌。

[0271] 在一些实施方案中,可通过本文公开的组合物(和方法)治疗的恶性血液病选自由以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特淋巴瘤(BL)和里希特转化。

[0272] 在一些实施方案中,本文描述的药物组合物用作药剂(例如,治疗癌症)。本文描述的药物组合物也可以用作诊断剂,例如,用于检测从患者(例如,人患者)获得的样品中是否

存在TF。

[0273] 用于体内施用的组合物可以是无菌的。这很容易通过例如无菌滤膜过滤实现。

[0274] 在一些实施方案中,提供了药物组合物,其中所述药物组合物包含人源化TF抗体、其抗原结合片段或抗体-药物缀合物(全部如本文所述)和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,药物组合物包含:(i)与人TF特异性结合的分离的抗体或其抗原结合片段,其包含(a)分别SEQ ID NO:19-24的重链可变区(VH)互补决定区(CDR)1、VHCDR2、VH CDR3和轻链可变区(VL)CDR1、CDR2和CDR3序列,(b)包含选自SEQ ID NO:9-11的氨基酸序列的可变重链区和包含选自SEQ ID NO:12-16的氨基酸序列的可变轻链区,和(ii)药学上可接受的赋形剂。

[0275] 用于抗体结合的测定

[0276] 可以通过本领域中已知的任何合适的方法测定本文公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段与人组织因子的免疫特异性结合。可以使用的示例性免疫测定包括但不限于竞争性和非竞争性测定系统,所述系统使用诸如以下的技术:Biacore™分析、FACS(荧光激活细胞分选仪)分析、免疫荧光、免疫细胞化学、蛋白质印迹(Westernblot)、放射性免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体固定测定、免疫放射测定、荧光免疫测定和蛋白A免疫测定。此类测定是常规的并且是本领域中公知的(参见例如,Ausubel等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York(1994))。下面简要描述了示例性免疫测定并且在实施例中举例说明了几种免疫测定。

[0277] 免疫沉淀方案通常包括在裂解缓冲液诸如补充有蛋白磷酸酶和/或蛋白酶抑制剂(例如,EDTA、PMSF、抑肽酶、钒酸钠)的RIPA缓冲液(1%NP-40或Triton X-100、1%脱氧胆酸钠、0.1%SDS、0.15M NaCl、0.01M磷酸钠(pH 7.2)、1%Trasyol)的裂解缓冲液中裂解细胞群,向细胞裂解物中添加目标抗体,在4℃下孵育一段时间(例如,1-4小时),向细胞裂解物中添加蛋白A和/或蛋白G琼脂糖珠粒,在4℃下孵育约一小时或更长时间,在裂解缓冲液中洗涤珠粒并且使珠粒重悬于SDS/样品缓冲液中。目标抗体使特定抗原免疫沉淀的能力可以通过,例如,蛋白质印迹分析进行评估。本领域的技术人员将了解可以修改参数以增加抗体与抗原的结合和降低背景(例如,用琼脂糖珠粒预先清除细胞裂解物)。有关免疫沉淀方案的进一步讨论,参见例如,Ausubel,F.等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York(1994),在10.16.1处。

[0278] 蛋白质印迹分析通常包括制备蛋白质样品,在聚丙烯酰胺凝胶中进行蛋白质样品的电泳(例如,根据抗原的分子量为8%-20%SDS-PAGE),将蛋白质样品从聚丙烯酰胺凝胶转移到膜诸如硝酸纤维素、PVDF或尼龙(nylon)上,将膜在封闭溶液(例如,含3%BSA或脱脂乳的PBS)中封闭,将膜在洗涤缓冲液(例如,PBS-吐温20)中洗涤,将膜用稀释与孵育缓冲液中的一抗(目标抗体)孵育,将膜在洗涤缓冲液中洗涤,将膜与稀释于孵育缓冲液中的缀合至酶底物(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或放射性分子(例如,³²P或¹²⁵I)的二抗孵育,将膜在洗涤缓冲液中洗涤,并检测抗原的存在。本领域技术人员将了解可以修改参数以增加检测到的信号,并减少背景噪声。参见例如,Ausubel,F.等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York(1994),在10.8.1处。

[0279] ELISA包括制备抗原,用抗原包被96孔微量滴定板的孔,向孔中添加缀合至可检测

化合物诸如酶底物(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)的目标抗体并孵育一段时间,并且检测抗原的存在。在ELISA中,目标抗体不必缀合至可检测化合物;相反,可向孔中添加缀合至可检测化合物的第二抗体(其识别目标抗体)。此外,不用抗原包被孔,可以将抗体包被到孔上。在这种情况下,可以在将目标抗原添加到已包被的孔之后,添加缀合至可检测化合物的第二抗体。本领域技术人员将了解可以修改参数以增加检测到的信号,以及ELISA的其它已知改变。参见例如,Ausubel,F.等人编辑,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York(1994),在11.2.1处。

[0280] 抗体或其抗原结合片段与抗原的结合亲和力及抗体-抗原相互作用的解离速率可以通过竞争结合测定来测定。竞争性结合测定的一个实例是放射性免疫测定,其包括在递增量的未标记抗原的存在下,将标记抗原(例如, ^3H 或 ^{125}I)或其片段或变体与目标抗体孵育,并检测与标记抗原结合的抗体。目标抗体对hTF的亲和力以及结合解离速率可根据通过Scatchard作图分析得出的数据来确定。也可以使用放射性免疫测定来确定与第二抗体的竞争。在这种情况下,将hTF与缀合至标记化合物(例如,用 ^3H 或 ^{125}I 标记的化合物)的目标抗体,在递增量的未标记的第二抗体的存在下孵育。两种抗体之间的这种竞争测定也可用于确定两种抗体是结合相同的还是不同的表位。

[0281] 凝血

[0282] 凝血是涉及以下三种相互作用的组分的复杂过程:血管、凝血因子和血小板。凝血因子是血液中作为非活性前体存在的蛋白质或糖蛋白。当发生出血时,凝血级联启动并且非活性凝血因子转化为活性蛋白酶或酶。凝血因子在凝血级联中,在辅因子(诸如钙、TF和磷脂)的帮助下依次激活,从而导致最终形成纤维蛋白凝块。纤维蛋白是不溶于血液中的粘性、丝状蛋白,并且提供了血小板粘附和凝血的基础。

[0283] 如果因脉管系统外部的损伤(诸如皮肤擦伤或切割)引起出血,则启动外源性途径。如果血管本身内部发生损伤,则激活内源性途径。许多出血事件激活两个途径。

[0284] 当TF在一些身体损伤后暴露于血液时,在血管外细胞表面上触发内源性凝血途径。TF可以与因子VII激活形式和失活形式两者结合。在外源性途径中,少量循环的活化因子VII(因子VIIa)在其释放后与TF复合。这种TF/因子VIIa复合物通过将因子IX和X转化成活性形式而启动凝血。

[0285] 该反应通过其中凝血因子VIIa、IXa和Xa激活与TF结合的其它因子VII的反馈机制而放大。与辅因子、因子Va和磷脂复合的因子Xa在级联中继续将凝血酶原(也称为因子II)激活为凝血酶(也称为因子IIa)。涉及凝血酶的另一反馈机制起作用以激活因子V、VIII和XI。因子VIIIa与血小板表面上的因子IXa复合以激活因子X,从而导致更多的局部凝血酶产生。凝血酶负责最终产生纤维蛋白。

[0286] 在内源性途径中,与高分子量激肽原和激肽释放酶原复合的循环活化因子XII,接触到暴露的内皮下膜接触以启动凝血并激活因子XI。因子XIa与钙复合以激活因子IX。因子IXa,与因子VIIIa、钙和磷脂一起,导致因子X激活为因子Xa并且随后产生凝血酶。因子X激活后,外源性和内源性途径合并。

[0287] 凝块形成的最后一步是由于肽键裂解,血浆可溶性纤维蛋白原转化为不溶性纤维蛋白。由于蛋白水解酶凝血酶而发生裂解,凝血酶是由凝血酶原产生的。除了钙以外,凝血酶原转化为凝血酶还需要凝固因子。纤维蛋白凝块是交联基质,其捕获血液的形成元素,从

而封闭出血部位。形成元素包括血小板、白血细胞和红血细胞。

[0288] TF是一种细胞锚定组分,其与因子VIIa一起,启动体内凝血。TF是一种跨膜糖蛋白,其具有一个219个残基的胞外区、一个23个残基的跨膜区和一个21个残基的胞质区。TF的胞外区具有两个纤连蛋白III样结构域及II类细胞因子和干扰素受体特有的二硫桥分布。TF的胞质区含有可以磷酸化并且已经牵涉于细胞信号传导的三个丝氨酸残基。Aberg, M.和Siegbahn,A.,J Thromb Haemost 11:817-825(2013)。

[0289] TF与其天然配体,即因子VIIa形成紧密的复合物($K_d \sim \text{pmol}$)。在该复合物中,VIIa环绕TF(Banner,D.W.等人,Nature 380:41-46(1996)),并形成与TF表面接触的广泛区域。TF结合并变构地激活因子VIIa(fVIIa),并且复合物TF/fVIIa负责经由因子IX和X的激活而产生凝血酶,并且是生理条件下血液凝固的主要引发剂。与TF-FVIIa相互作用位点结合的抗体可以抑制TF-FVIIa相互作用,从而抑制或阻断凝血。本文公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段与TF,例如hTF结合,但是与正常血浆对照相比,不抑制TF介导的凝血。

[0290] 如本文所用,术语“正常血浆对照”是指从正常人供体汇集的血浆,诸如由George King Bio-Medical,Inc.,Kansas提供的血浆(正常汇集血浆)。

[0291] 在一些实施方案中,所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段对TF介导的凝血的影响可以使用血液凝固测定来确定。例如,本领域已知的血液凝固测定,诸如在例如Morrissey,J.H.等人,Thrombosis Research 52:247-261(1988)和Fang,C.H.等人,Thrombosis and Haemostasis 76:361-368(1996)中描述的那些,可用于确定抗TF抗体对凝血的影响。其它血液凝固测定包括但不限于:一步法凝血酶原时间测定(Miale J.B., Laboratory Medicine,Hematology,CN Mosbey Co.,St.Louis(1977),并且也可以使用两步法凝固测定(Bach等人,Biochemistry 15:4007-4020(1986))。

[0292] 其它测定,诸如实施例8中描述的测定,测量因子X的激活,因子X是组织因子介导的凝血的替代标志物。这种测定(例如,组织因子人显色活性测定试剂盒,AbCam)测量脂蛋白TF/FVIIa将因子X(FX)激活为因子Xa的能力。通过使用高度特异性的FXa底物,释放出黄色对硝基苯胺(pNA)发色团产生的FXa的量来定量TF/FVIIa复合物的水解酰胺活性。405nm下pNA的吸光度的变化与TF的酶活性成正比。如本文所公开的,人源化TF抗体“与正常血浆对照相比不抑制TF介导的凝血”,其中在hTF凝血测定中,如Chen,C.等人,Hybridoma 24:78-85(2005)所提供的,用抗体处理的血样的凝固时间是正常血浆对照的凝固时间的约150%或更少,约140%或更少,约130%或更少,约120%或更少,约110%或更低,或约100%或更少。

[0293] 此外,如本文所公开的,人源化TF抗体“与先前证实会中和TF的促凝血活性的抗体诸如Sekisui ADG4507或ADG4508相比,不抑制TF介导的凝血”,其中在人TF显色活性测定中,使用在裂解后释放出黄色发色团的高度特异性因子Xa底物来测量因子X的TF依赖性激活。

[0294] Fc介导的机制

[0295] 在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体及其抗原结合片段能够与hTF结合,而与正常血浆对照相比不抑制TF介导的凝血,并且可以启动一种或多种Fc介导的机制。

[0296] 当将抗体暴露于蛋白水解酶诸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶时,产生几种主要的片段。保留抗原结合能力的片段由抗体Y构型的两个“臂”组成并且称为F(ab)(抗原结合片段)

或 $F(ab')_2$ (代表通过二硫键连接的两个Fab臂)。产生的其它主要片段构成Y的单一“尾部”或中心轴并且因其倾向于从溶液中结晶而称为Fc (晶体片段)。IgG、IgA、IgM或IgD的Fc片段由每种抗体的两个羧基末端结构域 (即, IgG、IgA和IgD中的CH2和CH3, IgM中的CH3和CH4) 的二聚体的组成。相比之下, IgE Fc片段由其三个羧基末端重链结构域 (C2、C3和C4) 的二聚体组成。

[0297] Fc片段含有抗体的生物“活性位点”,这使得抗体与其它免疫系统分子或细胞“通信”,并从而激活和调节免疫系统防御功能或宿主介导的机制。此类通信发生在抗体Fc区内的活性位点与称为Fc受体的分子结合时。Fc受体是以高亲和力和特异性与免疫球蛋白Fc区内活性位点结合的分子。Fc受体可以作为完整的膜蛋白存在于细胞的外质膜内,或者可以作为游离的“可溶性”分子存在,其在血浆或其它体液中自由循环。

[0298] 对于五种抗体类别中的每一种而言,存在与该类别的Fc区特异性结合并执行不同功能的几种类型的Fc受体。因此, IgE Fc受体仅与IgE Fc区或与分离的IgE Fc片段以高亲和力结合。已知存在不同类型的类别特异性Fc受体,其识别并结合Fc区内的不同位置。例如,某些IgG Fc受体专门与IgG的第二恒定结构域 (CH2) 结合,而介导其它免疫功能的Fc受体专门与IgG的第三恒定结构域 (CH3) 结合。其它IgG Fc受体与位于CH2和CH3结构域两者内的活性位点结合,而不能与单一、分离的结构域结合。

[0299] 在抗体结合抗原或以其它方式引起抗体聚集之后, Fc区内的活性位点能够结合并激活Fc受体,从而提供抗体与免疫系统其余部分之间的关键连接。Fc与Fc受体结合因此可以表征为介导抗体功能的“最终共同途径”。如果抗原结合的抗体不与Fc受体结合,则该抗体不能激活免疫系统的其它部分,因此使其功能失活。

[0300] 免疫球蛋白的Fc区结合Fc受体并且复合物可以根据细胞类型触发多种应答。在巨噬细胞的情况下, 应答可包括吞噬作用和抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性 (ADCC)。一旦通过抗体Fc区活性位点的结合而激活, Fc受体就介导多种重要的免疫杀伤和调控功能。例如,某些IgG Fc受体介导该抗体已经经由其Fab臂结合的细胞的直接杀伤 (即, ADCC)。其它IgG Fc受体, 当被IgG占据时, 刺激某些白血细胞通过吞噬作用吞没并破坏细菌、病毒、癌细胞或其它实体。在某些类型的称为B淋巴细胞的白血细胞上的Fc受体调控其生长并发育成分泌抗体的浆细胞。

[0301] 根据与抗体或其活性肽片段的Fc部分结合的Fc受体的特定类型, 所述肽可以启动或抑制免疫功能。如果Fc受体是通过与Fc区的结合作用而变得被激活的类型, 或者可替代地, 如果Fc活性位点肽刺激该受体, 则可以发生启动。产生的启动类型可以包括但不限于, 通过抗体Fc区-Fc受体的结合直接或间接介导的功能。

[0302] 启动免疫系统功能的能力, 包括以上列出的那些, 已知在治疗疾病诸如感染性疾病, 其中由于先天或获得性疾患引起免疫系统缺陷的疾患, 癌症和许多其它疾病方面在治疗上有用。此类免疫刺激也可用于加强身体对某些注射或口服施用的物质 (作为疫苗施用的) 的保护性细胞和抗体应答。

[0303] 如本文所用, 术语“Fc介导的机制”是指通过Fc受体活化所介导的对外源抗原的免疫应答的启动。Fc介导的机制包括但不限于, 抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0304] 在一些实施方案中, 在本文公开的人源化TF抗体可以启动Fc介导的机制的情况

下,该机制是ADCC。在其它实施方案中,本文公开的人源化TF抗体可以启动CDC。

[0305] ADCC是触发自然杀伤细胞、T淋巴细胞、单核细胞/巨噬细胞和多形核中性粒细胞(效应细胞)以破坏外源或感染细胞的过程。IgG抗体必须先与靶细胞上的抗原结合,从而使细胞敏化以便被介导ADCC的细胞识别。在遇到IgG敏化的靶标时,细胞上介导ADCC的IgG Fc受体与靶细胞表面上暴露的Fc区结合。此类Fc受体结合激活介导ADCC的细胞直接裂解靶细胞,从而导致其死亡。ADCC包括但不限于,由某些类别的白细胞(多形核中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞)刺激吞噬作用;巨噬细胞激活;自然杀伤(NK)细胞的活性;B和T淋巴细胞的生长和发育以及淋巴细胞分泌淋巴因子(具有杀伤或免疫调控活性的分子)。

[0306] CDC是可以破坏外源或感染因子的另一过程。抗体与外源抗原的相互作用,形成抗体-抗原复合物,可导致抗体Fc区的构象变化。该构象变化可激活补体因子C1,从而启动涉及补体起始因子C1、C2、C3和C4的补体激活级联。补体激活级联终止于C5、C6、C7、C8和C9的依序相互作用,形成膜攻击复合物(MAC)。MAC通过破坏细胞的磷脂膜以在细胞膜中形成大的孔隙而介导细胞裂解。参见,例如Reff,M.E.等人Blood 83:435-445(1994)。以这种方式,MAC复合物能够刺激含有由本发明的抗体识别的抗原的外源或感染因子的细胞死亡。此外,C3和C4可以充当炎症的肽介质,这是导致中性粒细胞、巨噬细胞和其它吞噬细胞的局部化血管舒张和迁移的过程。这些吞噬细胞可携带Fc受体,从而增加局部化抗体依赖性的细胞毒性作用。

[0307] 在一些实施方案中,本文公开的人源化TF抗体含有中度至高度Fc介导的活性,包括但不限于中度至高度ADCC和/或中度至高度CDC活性。如本文所公开的人源化TF抗体,具有“中度至高度”ADCC活性,如果抗体浓度为10 μ g/ml且效应细胞与靶细胞的比率为30,则至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的靶细胞被裂解。如本文所公开的人源化TF抗体,具有“中度至高度”CDC活性,如果抗体浓度为10 μ g/ml并且存在未稀释的人血清或兔血清,则至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的靶细胞被裂解。

[0308] 本领域已知的任何测定均可用于监测所公开的人源化TF抗体的Fc介导的机制。可以在体外或在体内监测本公开的抗体启动一种或多种Fc介导的机制的能力。例如,抗体的CDC活性和ADCC活性可以通过Ohta等人的方法来测量,Cancer Immunol.Immunother.36:260(1993)。其它测定包括但不限于,ADCC和补体介导的裂解的⁵¹Cr释放测定。参见Current Protocols in Immunology,Coligan,A.M.等人(编辑),Wiley&Sons,Inc.(1991),例如7.27单元;Wang,B.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 96:1627-1632(1999);Manches,O.等人,Blood 101:949-954(2003)。

[0309] 此外,可以在体外通过常规的免疫测定来监测Fc介导的宿主应答,其中可以通过CDC和/或ADCC测定来确定该应答的抗肿瘤活性。该测定方法是公知的,并且在Handbook of Experimental Immunology,第2卷,Blackwell Scientific Publications,Oxford(1986)中有描述。另外,人源化嵌合抗体对培养的癌细胞系的CDC活性和ADCC活性可根据Menekigaku Jikken Nyumon,(Manual of Immunological Experiments)Matsushashi等人,Gakkai Shuppan Center,Japan,1981)公开的程序测量。

[0310] 可以在体内通过开发延迟类型的超敏反应,或本领域技术人员已知的其它体内或

体外手段(例如,皮肤测试反应方案;淋巴细胞刺激测定;通过使用标准的放射性释放测定,通过限制性稀释测定,或通过使用标准ELISA测定来测量IL-2的血浆水平来测量受试者淋巴细胞对肿瘤细胞的毒性)来监测Fc介导的机制。

[0311] 治疗方法

[0312] 本公开还提供了一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向需要此类治疗的患者施用治疗有效量的如本文所公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段,或抗体-药物缀合物。在一些实施方案中,这种基于抗体的疗法涉及向动物,更特别地是哺乳动物,并且更特别地是人患者施用本文公开的人源化组织因子或抗体-药物缀合物,用于治疗癌症。

[0313] “治疗有效量”是人源化TF抗体或其抗原结合片段或抗体-药物缀合物,当施用于受试者或患者以治疗疾患、病症或疾病时,足以引发临床上显著的细胞应答,而不会导致过度水平的不良副作用的量。更多细节,参见下文的“制剂和治疗性施用”部分。

[0314] “受试者”是指分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物,以及动物园动物、运动动物和伴侣动物,诸如家庭宠物和其它驯养动物,例如但不限于牛、绵羊、雪貂、猪、马、家禽、兔、山羊、狗、猫等。在一些实施方案中,伴侣动物是狗和猫。在其它实施方案中,受试者是人。

[0315] “患者”是指需要治疗疾患、病症或疾病(例如,癌症)的受试者,例如人。

[0316] 如本文所用的术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指治疗性治疗和预防性(prophylactic或preventative)措施,其中目的是预防、抑制、减少或减缓不利的生理疾患、病症或疾病的进展,或获得一种或多种有益或需要的临床结果。对于本发明的目的,有益或需要的临床结果包括但不限于症状的减轻;疾患、病症或疾病范围的减小;疾患、病症或疾病的状态稳定(即,不恶化);疾患、病症或疾病的发作延迟或进展减缓;疾患、病症或疾病状态的改善;缓和(不论部分还是全部);或疾患、病症或疾病的促进或改进。治疗还包括但不限于引发临床上显著的细胞应答,而无过度水平的副作用。治疗还包括但不限于,相比于不接受治疗时的预期生存期,延长生存期。

[0317] 本发明的治疗性化合物包括但不限于,人源化TF抗体或其抗原特异性片段、抗体-药物缀合物和药物组合物(全部如本文所公开的)。本文公开的人源化TF抗体可用于治疗癌症或与癌症相关的病症或疾患,包括但不限于本文描述的任何一种或多种疾病、病症或疾患。本文公开的人源化TF抗体可在如本领域已知的或如本文所述的药学上可接受的组合物中提供。

[0318] 术语“肿瘤”和“癌症”可互换使用,并且与它们的语法变型一起,是指任何细胞类型的肿瘤,包括任何人和非人动物物种(包括猪、猫、狗和高级灵长类动物)的癌、肉瘤、淋巴瘤和白血病。本文公开的方法(和组合物)适于治疗实体瘤,实体瘤可以通过广泛的脉管系统表征(微脉管肿瘤),包括各种细胞类型的癌、肉瘤和淋巴瘤。通过本公开的治疗靶向的实体瘤包括但不限于:头颈癌,包括鳞状细胞和表皮样癌;腺癌,包括前列腺癌、硬癌和乳房腺癌;淋巴肉瘤;纤维肉瘤;骨肉瘤;平滑肌肉瘤;软骨瘤;前列腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胃(胃部)癌、胰腺癌、喉癌、食管癌、睾丸癌、肝癌、腮腺癌、胆道癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、宫颈癌、子宫癌、子宫内膜癌、肾癌、膀胱癌或甲状腺癌;原发性肿瘤和转移瘤;黑素瘤;胶质母细胞瘤;卡波西肉瘤;非小细胞肺癌(NSCLC),包括鳞状类型和腺类型;晚期恶性肿瘤;和恶性血液病,例如白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0319] 在一些实施方案中,可通过本文公开的组合物和方法治疗的实体瘤是选自以下组成的组的实体瘤:乳腺癌、卵巢癌、甲状腺癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、黑素瘤、脑癌、头颈癌、上皮癌、肉瘤、肾癌、胰腺癌、前列腺癌、肝癌、尿路上皮癌和肺癌。

[0320] 在一些实施方案中,可通过本文公开的组合物和方法治疗的恶性血液病选自以下组成的组:急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、多发性骨髓瘤(MM)、霍奇金淋巴瘤(HL)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、华氏巨球蛋白血症(WM)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、边缘区淋巴瘤(MZL)、毛细胞白血病(HCL)、伯基特淋巴瘤(BL)和里希特转化。

[0321] 在一些实施方案中,通过本文所述方法(或组合物)治疗的癌症细胞过表达人组织因子。参见,例如Callander等人,Cancer 70:1194-1201(1992);Sato等人,Cancer Sci.105:1631-1637(2014);Zhang等人,Int.J.Mol.Med.29:409-415(2012);及Cocco等人,Clin Exp Metastasis 28:689-700(2011)。

[0322] 可以用本文公开的人源化TF抗体、ADC或药物组合物治疗的恶性和转移性疾病包括但不限于本文描述的和本领域另外已知的恶性肿瘤、实体瘤和癌症(对于此类病症的综述,参见Fishman等人,Medicine,第2版,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia(1985))。如本文所公开的人源化TF抗体,可用于治疗除癌症以外的涉及血管生成的其它疾病和/或病症。这些疾病和/或病症包括但不限于良性肿瘤,例如血管瘤、听神经瘤、神经纤维瘤、沙眼和化脓性肉芽肿;动脉粥样硬化斑块;眼的血管生成疾病,例如糖尿病性视网膜病、早产儿视网膜病、黄斑变性、角膜移植排斥、新生血管性青光眼、晶状体后纤维组织形成、发红、成视网膜细胞瘤、葡萄膜炎和翼状胬肉(异常血管生长);类风湿性关节炎;银屑病;延迟伤口愈合;子宫内膜异位;血管发生;肉芽形成;肥厚性疤痕(瘢痕瘤);骨折不愈合;硬皮病;沙眼;血管粘连;心肌血管生成;冠状动脉侧枝;脑侧支;动静脉畸形;缺血性肢体血管生成;Osler-Webber综合征;斑块新血管形成;毛细血管扩张;血友病关节;血管纤维瘤;纤维肌性发育不良;伤口肉芽形成;克罗恩氏病(Crohn's disease);和动脉粥样硬化。

[0323] 本公开还提供了一种治疗患者的转移性癌症的方法,所述方法包括向需要此类治疗的患者施用治疗有效量的如本文所公开的人源化组织因子抗体、其抗原结合片段、抗体-药物缀合物或药物组合物。转移瘤的治疗可以通过如本文所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段在动物模型中预防肿瘤转移的能力而显示。例如,自发转移模型和肺转移肿瘤模型是本领域已知的转移模型。在自发转移肿瘤模型中,为动物皮下注射形成原发性肿瘤块的肿瘤细胞。随后,一些肿瘤细胞自发迁移到动物的其它部分,包括肺部。参见Zisman,A.等人,Cancer Research 63:4952-59(2003);Lev,D.C.等人,Clin.Exp.Metas.20:515-23(2003)。在肺转移肿瘤模型中,将肿瘤细胞的悬浮液注射到小鼠尾静脉中,并且评价受者动物肺部中转移瘤的形成。参见Tian F.等人,Cancer Research 63:8284-92(2003);Ogawa,K.等人,Int.J.Cancer 91:797-802(2001)。在这些模型中,在转移瘤的治疗中有效的抗体在施用于受者动物后,预防转移瘤发生或使形成的转移瘤的数目与给予阴性对照的受者动物中形成的转移瘤数目相比减少。

[0324] 如本文所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段、ADC或药物组合物可用于治疗过度增殖性疾病、病症和/或疾患,包括赘生物。抗体可通过直接或间接相互作用抑制病症

的增殖。例如,通过增加免疫应答,特别是增加过度增殖性病症的抗原质量或通过使T细胞增殖、分化或动员,可以治疗和/或诊断过度增殖性疾病、病症和/或疾患。这种免疫应答可以通过增强现有的免疫应答,或通过启动新的免疫应答而增加。

[0325] 可以通过所公开的TF抗体治疗和/或诊断的过度增殖性疾病、病症和/或疾患的实例,包括但不限于,位于结肠、肺部、腹部、骨、乳房、消化系统、肝脏、胰腺、腹膜、内分泌腺体(肾上腺、甲状旁腺、垂体、睾丸、卵巢、胸腺、甲状腺)、眼、头和颈、神经系统(中枢和外周神经系统)、淋巴系统、骨盆、皮肤、软组织、脾、胸和泌尿生殖系统中的赘生物。

[0326] 类似地,可以通过本发明的人源化TF抗体治疗和/或诊断其它过度增殖性疾病、病症和/或疾患。此类过度增殖性疾病、病症和/或疾患的实例包括但不限于,高丙球蛋白血症、淋巴增殖性疾病、病症和/或疾患、副蛋白血症、紫癜、结节病、塞扎里综合症(Sezary Syndrome)、华氏巨球蛋白血症(Waldenström's Macroglobulinemia)、高雪氏病(Gaucher's Disease)、组织细胞增多症以及位于上面列出的器官系统中的任何其它增殖性疾病。

[0327] 本公开还提供了通过施用所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段对与新血管形成相关的疾病、病症和/或疾患的治疗。内源性刺激物和血管生成抑制剂之间的天然存在的平衡是其中抑制性影响占优势的平衡。Rastinejad等人,Cell 56:345-355(1989)。在正常生理条件下发生新血管形成的那些罕见情况下,诸如伤口愈合、器官再生、胚胎发育和雌性生殖过程,血管生成是受严格调节的并且在空间和时间上分隔。在病理性血管发生的条件下,例如表征实体瘤生长的条件下,这些调节控制失败。不受调节的血管生成变成病理性的,并维持许多肿瘤和非肿瘤性疾病的进展。许多严重的疾病由异常的新血管形成占主导,包括实体瘤生长和转移、关节炎、一些类型的眼部疾病、病症和/或疾患及牛皮癣。参见例如,Moses等人,Biotech.9:630-634(1991);Folkman等人,N.Engl.J.Med.,333:1757-1763(1995);Auerbach等人,J.Microvasc.Res.29:401-411(1985);Folkman,Advances in Cancer Research,编辑Klein和Weinhouse,Academic Press,New York(1985),第175-203页;Patz,Am.J.Ophthalmol.94:715-743(1982);以及Folkman等人,Science 221:719-725(1983)。在许多病理条件下,血管生成的过程促进所述疾病状态。例如,已经积累了显著的数据,表明实体瘤的生长依赖于血管生成。Folkman和Klagsbrun,Science 235:442-447(1987)。

[0328] 可在治疗上使用如本文所公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段的其它方式包括但不限于抗体的定向细胞毒性,例如由补体(CDC)或效应细胞(ADCC)介导的细胞毒性,或抗体的间接细胞毒性,例如ADC。

[0329] 本文公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段也可有利地与其它单克隆或嵌合抗体,或与例如用于增加与抗体相互作用的效应细胞的数目或活性的淋巴因子或造血生长因子(例如IL-2、IL-3和IL-7)组合使用,或如上所述与细胞毒性剂诸如放射性同位素或其它细胞毒性剂缀合。

[0330] 本文公开的人源化组织因子抗体或其抗原结合片段可以单独施用或其它类型的治疗(例如,放射疗法、化学疗法、激素疗法、免疫疗法、抗肿瘤剂和抗逆转录病毒剂)组合施用。

[0331] 制剂和治疗性施用

[0332] 本公开提供了通过向有需要的受试者施用有效量的人源化TF抗体或其抗原结合

片段、ADC或药物组合物(全部如本文所公开的)的治疗方法。在一些实施方案中,人源化TF抗体是基本上纯化的。在一些实施方案中,人源化TF抗体与细胞毒性剂缀合(例如,作为ADC)。本文描述了制剂和施用方法。

[0333] 各种递送系统是本领域已知的,并且可以用于施用如本文所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段、ADC或药物组合物,例如,包封在脂质体、微粒、微胶囊中;能够表达该化合物的重组细胞;受体介导的内吞作用(参见,例如,Wu和Wu, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432 (1987));将核酸构建为逆转录病毒或其它载体的一部分,等等。施用模式包括皮内、肌肉、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。施用可以是任何便利的途径,例如通过输注或推注,或通过上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收。可以全身或局部施用。另外,可能期望通过任何合适的途径将如本文所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段、ADC或药物组合物引入中枢神经系统,所述途径包括心室内和鞘内注射;心室内注射可以通过例如附接到贮器(例如奥马耶贮器(Ommaya reservoir))心室内导管促进。也可以采用肺部施用,例如通过使用吸入器或雾化器,和用雾化剂配制。

[0334] 在一些实施方案中,可能期望将如本文所公开的人源化TF抗体或其抗原结合片段、ADC或药物组合物局部施用于需要治疗的区域;这可以通过以下方式实现,例如通过在手术期间局部输注;在手术后例如连同伤口敷料一起局部施加;通过注射;借助于导管;借助于栓剂;或借助于植入物,所述植入物为多孔、无孔或凝胶状材料,包括膜,诸如硅橡胶膜或纤维。当施用蛋白质,包括抗体时,必须小心使用蛋白质不会吸附到其中的材料。

[0335] 在其它实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体或ADC,可以在囊泡,尤其是脂质体中递送(参见,Langer, *Science* 249:1527-1533 (1990); Treat等人,在 *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer* 中, Lopez-Berestein和Fidler编辑, Liss, New York (1989), 第353-365页; Lopez-Berestein, 出处同上, 第317-327页;通常参见出处同上)。

[0336] 在其它实施方案中,如本文所公开的人源化TF抗体或ADC可以在控释系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵(参见Langer, 同上; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald等人, *Surgery* 88:507 (1980); Saudek等人, *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989))。在其它实施方案中,可以使用聚合物材料(参见 *Medical Applications of Controlled Release*, Langer和Wise编辑, CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen和Ball编辑, Wiley, New York (1984); Ranger和Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23:61 (1983); 还参见Levy等人, *Science* 228:190 (1985); During等人, *Ann. Neurol.* 25:351 (1989); Howard等人, *J. Neurosurg.* 71:105 (1989))。在其它实施方案中,控释系统可以放置在治疗靶标(即脑部)附近,从而只需要全身剂量的一小部分(参见,例如,Goodson在 *Medical Applications of Controlled Release* 中, 同上, 第2卷, 第115-138页 (1984))。Langer(同上)讨论了其它控释系统。

[0337] 本公开还提供了药物组合物。此类药物组合物包含治疗有效量的如本文所公开的人源化TF抗体或ADC和药学上可接受的载剂。在一些实施方案中,术语“药学上可接受的”表示物质或组合物必须在化学上和/或毒理学上与构成制剂的其它成分和/或用其治疗的哺乳动物是可相容的。

[0338] 术语“载剂”是指使用其来施用治疗剂的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。此类药物载剂可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。在一些实施方案中,水可以用作当药物组合物静脉内施用的载剂。盐水溶液及葡萄糖和甘油水溶液也可用作液体载剂,尤其是用于注射液。合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、稻米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。药物组合物,如果需要的话,还可以含有少量的润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。

[0339] 药物组合物可以呈溶液、悬浮液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、持续释放制剂等形式。可将组合物与传统粘合剂和载剂诸如甘油三酯一起配制成栓剂。口服制剂可以包括标准载剂诸如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载剂的实例在E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中有描述。此类组合物将含有治疗有效量的化合物(优选呈纯化形式),连同适量的载剂,以便提供用于向患者适当施用的形式。制剂应适合施用模式。

[0340] 在一些实施方案中,依照常规程序将组合物配制为适于向人静脉施用的药物组合物。通常,用于静脉施用的组合物是在无菌等渗含水缓冲液中的溶液。必要时,该组合物还可包含增溶剂和局部麻醉剂诸如利多卡因(lignocaine)以减轻注射部位的疼痛。通常,将成分分开提供或以单位剂型混合在一起,例如在密闭容器,诸如指示活性剂的量的安瓿或小药囊中作为干燥冻干粉或无水浓缩物的形式。在要通过输注施用组合物的情况下,可以用装有药用级的无菌水或盐水的输注瓶分配组合物。在要通过注射施用组合物的情况下,可以提供一安瓿的注射用无菌水或盐水,以便可以在施用之前将成分混合。

[0341] 在治疗病症例如癌症中将是治疗有效的如本文所公开的人源化TF抗体、其抗原结合片段、药物组合物或ADC的治疗有效量,可以通过标准临床技术来确定。另外,体外测定可任选地用于帮助鉴定最佳剂量范围。要在制剂中采用的精确剂量也将取决于施用途径,和疾病或病症的严重性,并且应该根据医师的判断和每个患者的情况来决定。可由源自体外或动物模型测试系统的剂量-响应曲线来外推有效剂量。

[0342] 对于人源化抗体,施用给患者的剂量通常为0.1mg/kg至100mg/kg患者体重。然而,对于放射性标记的抗体,施用剂量可以更低,例如0.01mg/kg至1mg/kg患者体重,并且对于毒素-免疫缀合物,施用剂量甚至可以更低,例如0.001mg/kg患者体重。在一些实施方案中,施用给患者的剂量介于0.001mg/kg和100mg/kg患者体重之间。在其它实施方案中,施用给患者的剂量介于0.01mg/kg和50mg/kg患者体重之间。在其它实施方案中,施用给患者的剂量介于0.1mg/kg和20mg/kg患者体重之间。还有其它实施方案中,施用给患者的剂量介于1mg/kg和10mg/kg患者体重之间。

[0343] 通常,人抗体由于对外来多肽的免疫应答在人体内的半衰期比来自其它物种的抗体更长。因此,较低剂量的人抗体和较低频率施用通常是可能的。此外,本发明抗体的施用剂量和频率可通过修饰(例如,脂化)增强抗体的摄取和组织渗透(例如,进入脑部)而降低。

[0344] 所有本文描述的各种实施方案或选项可以任何和所有变型组合。

[0345] 检测和诊断用途

[0346] 如本文所述的人源化TF抗体或其抗原结合片段可用于使用本领域技术人员已知的经典方法测定生物样品中的TF蛋白水平,所述经典方法包括免疫测定,诸如酶联免疫吸

附测定(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹法。合适的抗体测定标记是本领域已知的并且包括酶标记,诸如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,诸如碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标记,诸如鲁米诺;和荧光标记,诸如荧光素和罗丹明,和生物素。此类标记可以用于标记本文描述的抗体或其抗原结合片段。可替代地,可以标记识别本文所述的抗TF抗体或其抗原结合片段的第二抗体或其抗原结合片段,并与抗TF抗体或其抗原结合片段组合使用,以检测TF蛋白水平。

[0347] 测定TF蛋白的表达水平旨在包括直接(例如,通过测定或估计绝对蛋白水平)或相对地(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白水平比较)定性或定量地测量或估计第一生物样品中TF蛋白的水平。可以测量或估计第一生物样品中的TF多肽表达水平,并与标准TF蛋白水平比较,该标准取自从未患该病症的个体获得的第二生物样品,或通过来自从未患该病症的个体群体的水平求平均值而确定。如本领域中所理解的,一旦“标准”TF多肽水平已知,其就可以重复用作比较的标准。

[0348] 如本文所用,术语“生物样品”是指从受试者、细胞系、组织或潜在表达TF的其它细胞来源获得的任何生物样品。用于从动物(例如,人)获得组织活检和体液的方法在本领域是众所周知的。生物样品包括外周血单核血细胞。生物样品也可以是血液样品,其中循环肿瘤细胞(或“CTC”)可以表达TF并且可以被检测到。

[0349] 本文描述的人源化TF抗体可用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括技术人员众所周知的并且基于本说明书的体外和体内应用。用于体外评估和评价免疫系统状态和/或免疫应答的预后、诊断、监测和筛选测定和试剂盒可用于预测、诊断和监测以评价患者样品,该患者样品包括已知患有或怀疑患有免疫系统功能障碍或癌症的那些患者样品。这种类型的预后和诊断监测和评估已经在利用针对乳腺癌中的HER2蛋白的抗体的实践中(HercepTestTM, Dako),其中所述测定还用于评价患者使用 Herceptin[®] 进行的抗体疗法。体内应用包括定向细胞疗法和免疫系统调节以及免疫应答的放射性成像。

[0350] 在一些实施方案中,本文描述的人源化TF抗体及其抗原结合片段可以携带可检测或功能标记。当使用荧光标记时,可以使用当前可用的显微镜和荧光激活细胞分选仪分析(FACS)或两种方法的组合或本领域已知的其它程序来鉴定和定量特异性结合成员。本文描述的人源化TF抗体及其抗原结合片段可以携带荧光标记。示例性的荧光标记包括,例如反应性和缀合的探针,例如氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗TF抗体可携带放射性标记,诸如同位素 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{117}Lu 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{198}Au 、 ^{211}At 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{186}Re 。当使用放射性标记时,本领域已知的当前可用的计数程序可用于鉴定和定量抗TF抗体或其抗原结合片段与TF(例如,人TF)的特异性结合。在标记是酶的情况下,检测可以通过本领域已知的目前使用的比色、分光光度、荧光分光光度、电流分析或气体定量技术中的任何一种来完成。这可以通过在允许抗体或其抗原结合片段与TF之间形成复合物的条件下,使样品或对照样品与人源化TF抗体或其抗原结合片段接触来实现。在样品和对照中检测和比较抗体或其抗原结合片段与TF之间形成的任何复合物。根据本文描述的抗体或其抗原结合片段对TF的特异性结合,可以使用抗体或其抗原结合片段特异性检测细胞表面上的TF表达。本文描述的抗体或其抗原结合片段也可以用于经由免疫亲和纯化来纯化TF。

[0351] 本文还包括可以制备成测试试剂盒形式的测定系统,用于定量分析例如TF存在的程度。该系统或测试试剂盒可以包括标记组分,例如标记抗体或其抗原结合片段,以及一种或多种附加的免疫化学试剂

[0352] 在一些方面,本文提供了一种用于在体外检测样品中的TF的方法,其包括使所述样品与抗体或其抗原结合片段接触。在一些方面,本文提供了本文提供的抗体或其抗原结合片段用于在体外检测样品中的TF的用途。一方面,本文提供了本文提供的抗体或其抗原结合片段或药物组合物用于检测受试者体内或从受试者获得的样品中的TF。一方面,本文提供了本文提供的抗体或其抗原结合片段或药物组合物以用作诊断剂。在一些实施方案中,所述抗体包含可检测标记。在优选的实施方案中,TF是人TF并且受试者是人。

[0353] 以下实施例说明了本公开,但不得解释为进一步限制。

[0354] 实施例

[0355] 产生亲本鼠TF抗体(“TF278抗体”)的方法及其活性的评估在美国专利号7,993,644中有描述,所述美国专利通过引用整体并入本丈。进行实施例1-8中的测定以试图鉴定鼠TF278抗体的合适的人源化变体。将鉴定出的人源化变体命名为B278-LC_HC_,其中对不同的LC可变区和HC可变区分配了编号和唯一SEQ ID NO。例如,人源化变体B278-LC7HC6包含轻链可变区7(SEQ ID NO:12)和重链可变区6(SEQ ID NO:9)。

[0356] 实施例1:人源化抗TF抗体变体的表达

[0357] I. 抗体人源化

[0358] 使用源自鼠亲本序列的可变区产生全长人源化抗体的设计。如先前所述,通过将CDR序列移植到合适的人抗体供体序列上,使可变链人源化(EP 239,400;PCT公开WO 91/09967;美国专利号5,225,539;5,530,101;和5,585,089,其各自通过引用整体并入)。使用合适的人抗体供体序列的恒定结构域来产生全长人源化抗体。

[0359] Fusion Antibodies(UK)使用DNASTAR NovaFold蛋白质结构预测软件提供人源化抗体的3D结构预测并选择最佳的人供体序列。DNASTAR NovaFold是基于密歇根大学开发的软件包I-Tasser的蛋白质结构预测软件。NovaFold利用组合了线程和从头折叠技术的I-Tasser算法来构建结构先前未知的蛋白质的准确、完整的3D原子模型。

[0360] 对于每条可变链,使用不同的人供体序列制备至少四种变体。这样产生至少16种用于表达的人源化抗体的矩阵。

[0361] 合成编码抗体变体的DNA序列,然后亚克隆到哺乳动物表达载体中。抗体变体在CHO细胞中瞬时表达,纯化并且在所述测定中进行测试。

[0362] II. CHO细胞的瞬时转染

[0363] 将悬浮适应性CHO细胞(Thermo Fisher,UK)以 $2.0-3.0 \times 10^5$ 个细胞/ml,在150rpm、8%CO₂、37℃下在500ml通气锥形瓶(Erlenmeyer flask)(Corning,Netherlands)中补充有8mM L-谷氨酰胺(Thermo Fisher,UK)和次黄嘌呤/Thimidine(10ml/L,Invitrogen,UK)的Pro CHO4无血清培养基(Lonza,Belgium)中进行常规培养。使用Purelink HiPure Plasmid Maxiprep试剂盒(Thermo Fisher,UK),按照制造商的说明制备每个构建体的Maxiprep。使用Nano Drop精简版分光光度计,按照制造商的说明,对载体DNA定量。

[0364] 在500ml通气锥形瓶(Corning,Netherlands)中补充有8mM L-谷氨酰胺(Thermo Fisher,UK)和次黄嘌呤/Thimidine(10ml/L,Thermo Fisher,UK)的Pro CHO5无血清培养基

(Lonza,Belgium)中,用1.25 μ g/ml质粒DNA瞬时转染最终密度为 1.0×10^6 个细胞/ml的CHO-S细胞。将转染的培养物在37℃、8%CO₂和135rpm下孵育7-9天,之后通过在4000rpm、4℃下离心40分钟而收获。

[0365] III. 人源化B278抗体的纯化

[0366] 离心后,将所有培养基通过0.8 μ M醋酸纤维素过滤器过滤。每批均使用Amersham Biosciences AKTA色谱系统纯化。使用1ml HiTrap蛋白A柱进行所有人源化抗体纯化。所有纯化均使用FusionAntibodies内部洗涤和洗脱缓冲液进行。

[0367] 在蛋白A柱上样后,用甘氨酸/Tris pH 3.0缓冲液洗脱任何结合的抗体。所有洗脱的1ml级分用100 μ l Tris缓冲液(pH 8.5)中和。选择对应于洗脱峰的洗脱级分在PBS中进行过夜透析。

[0368] IV. 使用BCA测定来测定蛋白质浓度

[0369] 按照制造商的说明,使用Micro BCA蛋白测定试剂盒(Thermo Scientific,UK)进行二辛可宁酸测定(BCA),并且在Tecan酶标仪上在570nm下读取结果。表4示出了所指示的人源化TF抗体变体的表达产量。BCA测定的结果显示,测试的四种B278变体产生合适水平(>1mg/ml)的变体TF抗体(LC3HC5、LC5HC6、LC7HC4和LC7HC6)。

[0370] 表4. 人源化B278变体抗体的表达产量的汇总

[0371]

变体	转染体积	体积 (ml)	浓度 (mg/ml)	产量 (mg)	注解
LC0 HC0	200ml	2.0	1.915	3.83	
LC3 HC5	200ml	3.0	1.665	5.0	
LC3 HC6	100ml	2.4	0.568	1.36	
LC5 HC4	200ml	2.0	0.696	1.39	
LC5 HC5	100ml	1.5	0.774	1.16	
LC5 HC6	200ml	3.1	3.687	11.3	
LC6 HC4	100ml	不适用	不适用	不适用	无重复峰值
LC6HC4 #2	200ml	1.2	0.265	0.318	

[0372]	LC6 HC5	100ml	2.4	0.079	0.19	
	LC6 HC6	100ml	2.5	0.268	0.67	
	LC7 HC4	200ml	2.0	0.748	1.496	
	LC7 HC4#2	600ml	2.5	1.974	4.935	
	LC7 HC5	100ml	2.0	2.11	4.22	
	LC7 HC6	100ml	1.4	0.776	1.09	
	LC7 HC6 #2	500ml	3.0	5.097	15.29	
	LC8 HC4	200ml	不适用	不适用	不适用	无重复峰值
	LC8 HC4 #2	200ml	2.4	0.139	0.333	
	LC8 HC5	100ml	2.1	0.63	1.32	
	LC8 HC6	100ml	1.6	0.178	0.28	

[0373] 实施例2:人源化B278变体的SDS-PAGE分析

[0374] 通过还原性SDS-PAGE (4-20%丙烯酰胺凝胶) 和非还原性SDS-PAGE (4-20%丙烯酰胺凝胶) 分析纯化的人源化B278抗体。

[0375] 还原性SDS-PAGE样品制备。对于还原性SDS-PAGE,将纯化抗体的样品在5×处理缓冲液 (250mM Tris HCl (pH 6.8)、10% SDS、30% 甘油、0.5M二硫苏糖醇和0.02%溴酚蓝) 中加热10分钟达到95℃。

[0376] 非还原性SDS-PAGE样品制备。对于非还原性SDS-PAGE,将纯化抗体的样品稀释于无还原剂 (二硫苏糖醇) 的5×处理缓冲液中并在70℃下加热10分钟。

[0377] 方法。将样品 (5μg) 上样到4-20% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,并在200伏下运行65分钟。按照制造商的说明,通过用快速考马斯染色剂 (Genexon; GEN-QC-STAIN-1L) 染色使条带显现。凝胶上的蛋白梯来自SeeBlue Plus 2预先染色的蛋白质标准品 (Invitrogen, CA, 目录号LC5925)。

[0378] 凝胶染色和脱色:在SDS PAGE后,将凝胶在考马斯亮蓝染色剂 (考马斯亮蓝0.1% (w/v)、甲醇50% (v/v)、醋酸10% (v/v) 和纯净水50% (v/v)) 中染色过夜。将凝胶在脱色溶液 (甲醇10% (v/v)、醋酸10% (v/v) 和纯净水80% (v/v)) 中脱色,直至蛋白条带清晰可见。使条带在灯箱上显现并且使用Gel logic 1500成像系统,使用Care Stream MI成像软件成像。

[0379] 结果。代表性的还原性和非还原性SDS-PAGE结果分别示于图6和7中。每个泳道上样的样品如下:泳道1:SeeBlue plus 2 (Invitrogen, CA), 泳道2:B278-LC3HC5变体, 泳道3:B278-LC3HC6变体, 泳道4:B278-LC5HC4变体, 泳道5:B278-LC5HC5变体, 泳道6:B278-LC5HC6变体, 泳道7:B278-LC6HC4变体#2, 泳道8:B278-LC6HC5变体, 泳道9:B278-LC6HC6变体, 泳道10:B278-LC7HC4变体, 泳道11:B278-LC7HC4变体#2; 泳道12:B278-LC7HC5变体, 泳道13:B278-LC7HC6变体, 泳道14:B278-LC7HC6变体#2, 泳道15:B278-LC8HC4变体#2, 泳道16:

B278-LC8HC5变体,泳道17:B278-LC8HC6变体,泳道18:SeeBlue plus 2(Invitrogen)。

[0380] 结论。还原性SDS-PAGE的结果表明,对于B278的所有人源化变体检测到的主要条带是单独的重链和轻链。非还原性SDS-PAGE的结果表明,在B278的所有人源化变体中检测到的主要蛋白条带是在大约148千道尔顿迁移的完整抗体。

[0381] 实施例3:人源化B278变体与重组人凝血因子III(组织因子)的结合的ELISA分析

[0382] 通过ELISA分析来评估TF抗体B278的人源化变体(包括B278-LC7HC4、LC7HC5、LC7HC6、LC8HC4、LC8HC5和LC8HC6变体)与重组人凝血因子III(组织因子)的结合。嵌合抗体B278-LC0HC0用作对照。简言之,将100ng/孔的重组人凝血因子III(R&D Systems,UK)在4℃下在包被缓冲液(0.5mM NaHCO₃,通过添加0.5mM Na₂CO₃使pH达到9.5)中固定到96孔Maxisorp板上过夜。去除包被缓冲液,并将板在PBS吐温(PBS-T)(0.05%(v/v)吐温20)中洗涤一次。每孔添加200μl的3.0%(w/v)半脱脂乳的PBS溶液,并将板在室温下搅拌2小时。将板用PBS-T洗涤三次。

[0383] 将TF抗体B278的纯化人源化变体(LC7HC4;LC7HC5;LC7HC6;LC8HC4;LC8HC5;LC8HC6)在孵育缓冲液(PBS、1%(w/v)BSA)中从1,000ng/ml连续稀释至0.97ng/ml,并且每孔添加100μl。

[0384] 在室温下搅拌两小时后,将板用PBS-T洗涤三次。添加100μl/孔的山羊抗人HR(Fc特异性)(Sigma,UK)(1:60,000PBS),并将板在室温下边搅拌边孵育一小时。将板用PBS-T洗涤三次并且在PBS中洗涤一次。添加100μl/孔的3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物溶液并在37℃下孵育10分钟。每孔添加50μl的1M HCl,并立即在450nm下在Tecan Sunrise酶标仪上对板进行读数。图8中展示了示例性结果。

[0385] 结论。测试的六种变体中有三种以与嵌合LC0HC0 B278抗体类似的EC₅₀结合。

[0386] 实施例4:尺寸排阻色谱(SEC)分析

[0387] 样品制备。使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)(pH 7.4)将所有样品稀释到最终浓度为1mg/mL。

[0388] SEC-HPLC。使用SEC-HPLC进行样品的分离,并在280nm下进行UV检测。在Waters® ACQUITY H-ClassBio仪器上,在环境温度(AT)下使用TSKgel® G3000SWXL 5μm 7.8 x 300mm柱进行分离。作为洗脱剂,使用pH 6.5的0.165M磷酸钠进行等度洗脱。应用0.6mL/min的流量并将50μL的样品体积上样到分析柱上。

[0389] 数据分析。使用Waters® ACQUITY H-ClassBio仪器和Empower3™软件模块进行数据生成、演示和评价。

[0390] 结果。对样品B278-LC7HC6变体(PS-F09-2016-012)进行分析,并获得高品质的色谱图。色谱图显示出一个主峰和一种较高分子量的物质。结果示于图9A和9B(B278-LC7HC6变体的重复)。样品B278-LC7HC6(PS-F09-2016-012)的综合结果示于下表5中。

[0391] 结论。SEC-HPLC分析的结果表明,B278-LC7 HC6变体是非常均质的,只有极少量的聚集物存在于制剂中。

[0392] 表5.样品B278-LC7HC6的综合结果

	峰[#]	重复[#]	RT [min]	相对峰面积[%]
[0393]	1	1	12.78	0.63
		2	12.79	0.71
	2	1	15.18	99.37
		2	15.15	99.29

[0394] 实施例5:疏水作用色谱 (HIC) 分析

[0395] 样品制备。使用磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4) 将所有样品稀释到最终浓度为1mg/mL。

[0396] HIC分析。使用HIC进行样品的分离,并在280nm下进行UV检测。使用 **Shimadzu®** Prominence仪器进行分离。在环境温度 (AT) 下在 **TSKgel®** Butyl-NPR 2.5 μ m 4.6 x 35mm 柱上进行分离。作为洗脱剂,以0-100%B的二元梯度,在20分钟内以0.4mL/min的流量施加 A:1.5M硫酸铵、25mM磷酸钠 (pH 6.95) 和B:25mM磷酸钠 (pH 6.95)、20%异丙醇。将20 μ L体积的1mg/mL溶液注射到分析柱上。

[0397] 数据分析。使用 **Waters®** ACQUITY H-ClassBio仪器和Empower3™软件模块进行数据生成、演示和评价。

[0398] 结果。对样品B278-LC7HC6进行分析,并获得高品质的色谱图。色谱图显示一个主峰和一个次要信号。色谱图示于图10A和10B中 (一式两份) 并且综合结果示于表6中。

[0399] 表6. 样品B278-LC7HC6的综合结果

	峰[#]	重复[#]	RT [min]	相对峰面积[%]
[0400]	1	1	10.61	0.69
		2	10.61	0.63
	2	1	11.22	99.31
		2	11.24	99.37

[0401] 实施例6:Biacore™/SPR结合

[0402] 抗hTF MAb的Biacore™分析使用Biacore X (Biacore Inc., Uppsala, Sweden) 评价抗hTF MAb的结合特性。简言之,使CM5 Biacore生物传感器芯片停靠到仪器上并且在室温下用55 μ L的1:1NHS/EDC试剂 (Biacore Inc.) 激活。将重组可溶性hTF和BSA (10 μ g/mL在0.05M乙酸盐缓冲液中, pH 4.5) 分别固定在流动池1和2中的活化芯片上。以5 μ L/min的流量进行固定,直至达到1000-2000RU的共振响应。然后通过注入55 μ L乙醇胺-HCl (pH 8.5) 封闭芯片,然后用50mM NaOH、1M NaCl洗涤五次。

[0403] 为了测量抗hTF MAb与固定到芯片上的可溶性hTF的结合,将30 μ L在Biacore运行缓冲液 (HBS-EP, Biacore Inc.) 中的不同浓度的抗hTF MAb以5 μ L/min的流量注射到传感器表面上。注射阶段完成后,在Biacore运行缓冲液中以相同流量监测解离360秒。在注射期间使用30 μ L的50mM NaOH-1M NaCl再生表面。使用BIAsimulation软件分析单独的传感图。Biacore/SPR结合分析的结果如图11A和11B以及表7所示。数据显示人源化B278-LC7HC6变体和嵌合B278对照抗体LC0HC0在与hTF的结合方面是相当的。

[0404] 表7. B278-LC7HC6变体和嵌合对照的Biacore™/SPR结合分析

[0405]

动力学整体拟合(朗缪尔 1:1)			
------------------	--	--	--

[0406]

	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (M)
Ab LC7HC6	2.8×10^4	7.0×10^{-4}	25.3×10^{-9}
Ab LC0HC0 (嵌合 B278)	4.3×10^4	1.1×10^{-3}	24.9×10^{-9}

[0407] 实施例7:用于评估构象稳定性的纳米差示扫描量热法(DSC)

[0408] 样品制备。对于所有样品而言,用配制缓冲液将浓度调节至2mg/mL。

[0409] 纳米-DSC分析。在NanoDSC微量热计(TA Instruments,DE)上进行分析。用DSCrun软件(TA Instruments,DE)以1°C/分钟的扫描速度记录从20°C至100°C的热谱图。并行记录缓冲液热谱图并从样品热谱图中减去。

[0410] 数据分析。用NanoAnalyze软件(TA Instruments,DE),使用双态拟合模型进行数据分析。图12中示出了样品B278-LC7HC6变体的示例性纳米-DSC热谱图(第一个重复)和拟合。表8中示出了DSC结果的汇总。

[0411] 结论。B278-LC7HC6样品的热谱图在68.4摄氏度下显示出高焓转变,并且在76.3和82.7摄氏度之间显示出两个较小的信号,这是IgG1单克隆抗体典型的。

[0412] 表8.DSC结果的汇总

[0413]

样品	T_m [°C]		ΔH [kJ/mol]	
	R1	R2	R1	R2
B278-LC7HC6	68.4	68.3	634	681
	78.0	76.3	474	360
	82.7	81.1	913	537

[0414] 实施例8:对组织因子介导的凝血的抑制

[0415] 通过使用Abcam的组织因子人显色活性测定试剂盒(#Ab108906)的改进方案测量组织因子介导的凝血的替代标志物因子X的激活。按照Abcam试剂盒手册制备测定试剂盒组成部分,用测定稀释剂将测试样品稀释至20、4、0.8和0.032 μ g/ml。按照试剂盒说明书将TF标准品(试剂盒组成部分)补足至200pM的浓度。

[0416] 将纯化的B278-LC7HC6变异亚克隆物2N2、1L6和5D6、对照抗体(包括嵌合形式LC0HC0、ADG4507(Sekisui Diagnostics)和ADG4508(Sekisui Diagnostics)),以1:1的比例与TF标准品预孵育,得到最终浓度10、2、0.4和0.016 μ g/ml的测试抗体和100pM TF标准品。

[0417] 将10 μ l测试溶液转移至测定板中,按照测定说明书,连同70 μ l测定混合物(50 μ l测定稀释剂、10 μ l FVII、10 μ l FX)。在测定板上一式两份地进行每个测试条件。在37°C下孵育30分钟后,添加FXa底物(20 μ l/孔),孵育20分钟并且在405nm下在荧光酶标仪上读数。图13中示出了测定的示例性结果。显示的405nm下的吸光度是FXa的显色底物裂解的读数,所述裂解仅在组织因子介导的因子VII激活之后发生,然后将FX激活为FXa。

[0418] 结论。如先前对于鼠形式的B278抗体所示,LC7HC6变体的嵌合形式(LC0HC0)和3种

亚克隆物不抑制TF介导的外源性凝血途径的启动,而两种对照抗体(ADG4507和ADG4508)显示出对因子X激活的显著抑制。

[0419] 实施例9:使用公开的人源化组织因子抗体鉴定ADC的测定

[0420] 进行本领域技术人员已知的一种或多种以下测定以试图鉴定用于具有本文公开的人源化B278 TF抗体的ADC构建体中的合适的接头-药物组合。下面列出了这些测定,并且在随后的实施例中进一步描述了几种测定:

- [0421] • 使用FACS测量ADC与癌细胞系的结合;
- [0422] • 测量对表达TF的癌细胞的增殖的抑制;
- [0423] • 用于评估ADC的均一性和聚集水平的尺寸排阻色谱法 (SEC) ;
- [0424] • 用于测量药物-抗体比率 (DAR) 的液相色谱法/质谱法 (LC/MS) ;
- [0425] • 在人异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤活性;
- [0426] • 在患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤模型中的抗肿瘤活性;
- [0427] • 药代动力学;
- [0428] • 毒理学;和
- [0429] • 对组织因子介导的凝血的抑制。

[0430] 实施例10:用于评估ADC均一性和聚集水平的SEC-HPLC

[0431] 类似于实施例4中描述的那些的方法也可用于评估ADC的均一性和聚集程度。

[0432] 实施例11:在人异种移植肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0433] 细胞培养条件。使肿瘤细胞在湿润气氛 (5% CO₂、95% 空气) 中在37℃下以单层生长。培养基是含有2mM L-谷氨酰胺 (参考:BE12-702F, Lonza, Verviers, Belgium) 的RPMI1640, 其中补充有10%胎牛血清 (参考:3302, Lonza)。使FaDu肿瘤细胞粘附到塑料瓶上。对于实验使用,通过在不含钙或镁的Hanks培养基 (参考:BE10-543F, Lonza) 中用胰蛋白酶-维尔烯 (versene) (参考:BE02-007E, Lonza) 处理5分钟,使肿瘤细胞从培养瓶上脱离,并通过添加完全培养基来进行中和。将细胞计数并通过0.25%台盼蓝排除测定评估其活力。

[0434] 动物。获得健康的免疫缺陷雌性小鼠,诸如来自Charles River或另一合适供应方的5-7周龄的SWISS Nude (Cr1:NU(Ico) -Foxn1nu) 并根据当地IACUC规定维持良好的健康状态。

[0435] 动物户FaDu (鳞状细胞癌) 肿瘤的诱导。通过向112只雌性动物的右肋腹皮下注射10x10⁶个在200μL RPMI 1640中的FaDu细胞来诱导肿瘤。在用γ-源 (2Gy, ⁶⁰Co, BioMep, Bretenières, France) 进行全身照射后24至72小时进行FaDuor A-431肿瘤细胞植入。

[0436] 治疗计划。当肿瘤大小达到100-200mm³的平均体积时,开始用本文所公开的ADC (例如, B278-LC7HC6-MMAE, 1mg/kg) 进行治疗。根据美国专利号7,659,241中描述的程序制备以MMAE作为细胞毒性有效载荷的ADC。根据动物的个体肿瘤体积将动物随机分成各8只动物的组。进行统计检验 (方差分析, ANOVA) 以检验组间的均一性。以指定剂量,在第0天,然后在第7天对荷瘤动物治疗两次。

[0437] 临床监测。记录动物体重测量值、肿瘤体积、临床和死亡率记录,以及ADC治疗。每天记录小鼠的活力和行为。每周测量体重两次。用卡尺每周测量肿瘤的长度和宽度两次并通过下式估计肿瘤的体积 (mm³) :

[0438]
$$\text{肿瘤体积} = \frac{\text{宽度}^2 \times \text{长度}}{2}$$

[0439] 实施例12:在患者来源的异种移植 (PDX) 肿瘤模型中的抗肿瘤活性

[0440] 肿瘤细胞制备。将含有来自PDX模型的肿瘤细胞的冷冻小瓶解冻,并准备用于注射到小鼠体内。将细胞在PBS中洗涤,计数并重悬于冷的PBS中,浓度为50,000至100,000个活细胞/100 μ l。将细胞悬浮液与等体积的Cultrex ECM混合。通过将ECM-细胞混合物抽取到装备有26G 7/8 (0.5mm x 22mm) 针头的冷冻1ml滑动尖端注射器中,准备细胞用于注射。将填充的注射器保持在冰上,以避免胞外基质 (ECM) 固化。

[0441] 肿瘤植入。在注射前将动物剃毛。一次固定一只小鼠,并用酒精擦拭片对注射部位消毒。将200 μ l细胞在ECM中的悬浮液皮下注射到小鼠的后肋腹。每个注射器最多为五只动物注射200 μ l的细胞悬浮液。通过刻耳号/耳标来标记小鼠,并且在观察肿瘤生长之前七天,使动物不受干扰。

[0442] 肿瘤测量。每周监测动物的可触知的肿瘤或外观或行为的任何变化,并每天监测发病或死亡的征兆。一旦肿瘤可触知,就用卡尺每周测量肿瘤3次。使用下列公式计算肿瘤体积:(最长径 $\times$ 最短径²)/2。一旦肿瘤具有适当的大小以开始研究,就每周测量肿瘤大小和体重2次。

[0443] 随机化。当平均肿瘤体积达到150-250mm³时,在第1天将小鼠随机分配至各治疗组(例如,B278-MMAE (1mg/kg)),并在第1天开始给药。根据美国专利号7,659,241中描述的程序制备以MMAE作为细胞毒性有效载荷的ADC。

[0444] 体重。在随机化和开始治疗后每周测量体重3次。如果观察到体重减轻 $>20\%$,则观察动物的征兆恢复长达72小时。如果没有恢复征兆,则出于人道原因将动物处死。

[0445] 临床观察。每周在测量肿瘤大小和体重时进行3次临床观察。

[0446] 最终处置。在研究结束时,对所有活的动物施安乐死。

[0447] 本公开已在上文中借助于说明指定功能的实施及其关系的功能构建块来描述。为了方便描述,本文已对这些功能构建块的边界进行任意界定。只要适当地执行指定功能和其关系,就可以界定替代边界。前面对特定实施方案的描述将完全地揭示本发明的一般性质,以使他人可以在不背离本公开的一般概念的情况下通过应用本领域的技术范围内的知识来容易地修改和/或改编此类特定实施方案以用于各种应用。因此,基于本文所提供的教导内容以及指导内容,此类改编以及修改意图在所公开的实施方案的等同方案的含义和范围内。应当理解,本文的措词或术语目的在于说明而非限制,使得技术人员将会根据本文提供的教导内容以及指导内容来对本说明书的术语或措词进行解释。

[0448] 所有专利和出版物都通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物被具体地且单独地指明通过引用并入一样。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 欧罗赛铁克股份有限公司(EURO-CELTIQUE S.A.)
[0003]	<120> 靶向人组织因子的人源化抗体
[0004]	<130> 1861.427PC01/JMC/KRM
[0005]	<150> 62/591,168
[0006]	<151> 2017-11-27
[0007]	<160> 36
[0008]	<170> PatentIn version 3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 915
[0011]	<212> DNA
[0012]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0013]	<220>
[0014]	<223> 具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签的全长人组织因子的核苷酸序列
[0015]	<400> 1
[0016]	atggagaccc ctgcctggcc ccgggtcccg cgccccgaga ccgccgtcgc tcggacgctc 60
[0017]	ctgctcggct gggctcttcgc ccaggtggcc ggcgcttcag gcactacaaa tactgtggca 120
[0018]	gcatataatt taacttgga atcaactaat ttcaagacaa ttttgagtg ggaacccaaa 180
[0019]	cccgtaatc aagtctacac tgttcaaata agcactaagt caggagattg gaaaagcaaa 240
[0020]	tgtttttaca caacagacac agagtgtgac ctaccgacg agattgtgaa ggatgtgaag 300
[0021]	cagacgtact tggcacgggt cttctcctac ccggcaggga atgtggagag caccggttct 360
[0022]	gctggggagc ctctgtatga gaactcccca gagttcacac cttacctgga gacaaacctc 420
[0023]	ggacagccaa caattcagag ttttgaacag gtgggaacaa aagtgaatgt gaccgtagaa 480
[0024]	gatgaacgga ctttagtcag aaggaacaac actttcctaa gcctccggga tgtttttggc 540
[0025]	aaggacttaa tttatacact ttattattgg aaatcttcaa gttcaggaaa gaaaacagcc 600
[0026]	aaaacaaaca ctaatgagtt tttgattgat gtggataaag gagaaaacta ctgttttcagt 660
[0027]	gttcaagcag tgattccctc ccgaacagtt aaccggaaga gtacagacag cccggtagag 720
[0028]	tgtatgggcc aggagaaagg ggaattcaga gaaatattct acatcattgg agctgtggta 780
[0029]	tttgtggtea tcatccttgt catcatcctg gctatatctc tacacaagtg tagaaaggca 840
[0030]	ggagtggggc agagctggaa ggagaactcc cactgaatg tttcaagagg atcccacat 900
[0031]	caccatcacc attaa 915
[0032]	<210> 2
[0033]	<211> 304
[0034]	<212> PRT
[0035]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0036]	<220>
[0037]	<223> 具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签的全长人组织因子的氨基酸序列
[0038]	<400> 2
[0039]	Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val

[0040]	1	5	10	15
[0041]	Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala			
[0042]	20	25	30	
[0043]	Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser			
[0044]	35	40	45	
[0045]	Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln			
[0046]	50	55	60	
[0047]	Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys			
[0048]	65	70	75	80
[0049]	Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val			
[0050]	85	90	95	
[0051]	Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala			
[0052]	100	105	110	
[0053]	Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn			
[0054]	115	120	125	
[0055]	Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr			
[0056]	130	135	140	
[0057]	Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu			
[0058]	145	150	155	160
[0059]	Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg			
[0060]	165	170	175	
[0061]	Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser			
[0062]	180	185	190	
[0063]	Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu			
[0064]	195	200	205	
[0065]	Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val			
[0066]	210	215	220	
[0067]	Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu			
[0068]	225	230	235	240
[0069]	Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Ile Phe Tyr Ile Ile			
[0070]	245	250	255	
[0071]	Gly Ala Val Val Phe Val Val Ile Ile Leu Val Ile Ile Leu Ala Ile			
[0072]	260	265	270	
[0073]	Ser Leu His Lys Cys Arg Lys Ala Gly Val Gly Gln Ser Trp Lys Glu			
[0074]	275	280	285	
[0075]	Asn Ser Pro Leu Asn Val Ser Arg Gly Ser His His His His His His			
[0076]	290	295	300	
[0077]	<210> 3			
[0078]	<211> 783			
[0079]	<212> DNA			
[0080]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0081]	<220>			

[0082] <223> 具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的人组织因子的胞外结构域的核苷酸序列

[0083] <400> 3

[0084] atggagaccc ctgcctggcc ccgggtcccg cgccccgaga ccgccgtcgc tcggacgctc 60
 [0085] ctgctcggct gggctcttcgc ccagggtggcc ggcgcttcag gcactacaaa tactgtggca 120
 [0086] gcatataatt taacttggaa atcaactaat ttcaagacaa ttttgagtg ggaacccaaa 180
 [0087] cccgtcaatc aagtctacac tgttcaaata agcactaagt caggagattg gaaaagcaaa 240
 [0088] tgcttttaca caacagacac agagtgtgac ctcaccgacg agattgtgaa ggatgtgaag 300
 [0089] cagacgtact tggcacgggt cttctcctac ccggcaggga atgtggagag caccggttct 360
 [0090] gctggggagc ctctgtatga gaactcccca gagttcacac cttacctgga gacaaacctc 420
 [0091] ggacagccaa caattcagag ttttgaacag gtgggaacaa aagtgaatgt gaccgtagaa 480
 [0092] gatgaacgga ctttagtcag aaggaacaac actttcctaa gcctccggga tgtttttggc 540
 [0093] aaggacttaa tttatacact ttattattgg aaatcttcaa gttcaggaaa gaaaacagcc 600
 [0094] aaaacaaaca ctaatgagtt tttgattgat gtggataaag gagaaaacta ctgtttcagt 660
 [0095] gttcaagcag tgattccctc ccgaacagtt aaccggaaga gtacagacag cccggtagag 720
 [0096] tgtatgggcc aggagaaaagg ggaattcaga gaaagaggat ccacacatca ccatcacat 780
 [0097] taa 783

[0098] <210> 4

[0099] <211> 260

[0100] <212> PRT

[0101] <213> 人工序列(Artificial sequence)

[0102] <220>

[0103] <223> 具有32个氨基酸的N末端前导序列和9个氨基酸的C末端RGS-His6标签序列的人组织因子的胞外结构域的氨基酸序列

[0104] <400> 4

[0105] Met Glu Thr Pro Ala Trp Pro Arg Val Pro Arg Pro Glu Thr Ala Val
 [0106] 1 5 10 15
 [0107] Ala Arg Thr Leu Leu Leu Gly Trp Val Phe Ala Gln Val Ala Gly Ala
 [0108] 20 25 30
 [0109] Ser Gly Thr Thr Asn Thr Val Ala Ala Tyr Asn Leu Thr Trp Lys Ser
 [0110] 35 40 45
 [0111] Thr Asn Phe Lys Thr Ile Leu Glu Trp Glu Pro Lys Pro Val Asn Gln
 [0112] 50 55 60
 [0113] Val Tyr Thr Val Gln Ile Ser Thr Lys Ser Gly Asp Trp Lys Ser Lys
 [0114] 65 70 75 80
 [0115] Cys Phe Tyr Thr Thr Asp Thr Glu Cys Asp Leu Thr Asp Glu Ile Val
 [0116] 85 90 95
 [0117] Lys Asp Val Lys Gln Thr Tyr Leu Ala Arg Val Phe Ser Tyr Pro Ala
 [0118] 100 105 110
 [0119] Gly Asn Val Glu Ser Thr Gly Ser Ala Gly Glu Pro Leu Tyr Glu Asn
 [0120] 115 120 125
 [0121] Ser Pro Glu Phe Thr Pro Tyr Leu Glu Thr Asn Leu Gly Gln Pro Thr

[0122]	130	135	140
[0123]	Ile Gln Ser Phe Glu Gln Val Gly Thr Lys Val Asn Val Thr Val Glu		
[0124]	145	150	155 160
[0125]	Asp Glu Arg Thr Leu Val Arg Arg Asn Asn Thr Phe Leu Ser Leu Arg		
[0126]		165	170 175
[0127]	Asp Val Phe Gly Lys Asp Leu Ile Tyr Thr Leu Tyr Tyr Trp Lys Ser		
[0128]		180	185 190
[0129]	Ser Ser Ser Gly Lys Lys Thr Ala Lys Thr Asn Thr Asn Glu Phe Leu		
[0130]		195	200 205
[0131]	Ile Asp Val Asp Lys Gly Glu Asn Tyr Cys Phe Ser Val Gln Ala Val		
[0132]	210	215	220
[0133]	Ile Pro Ser Arg Thr Val Asn Arg Lys Ser Thr Asp Ser Pro Val Glu		
[0134]	225	230	235 240
[0135]	Cys Met Gly Gln Glu Lys Gly Glu Phe Arg Glu Arg Gly Ser His His		
[0136]		245	250 255
[0137]	His His His His		
[0138]		260	
[0139]	<210>	5	
[0140]	<211>	363	
[0141]	<212>	DNA	
[0142]	<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
[0143]	<220>		
[0144]	<223>	鼠抗体TF278的重链可变区的核苷酸序列	
[0145]	<400>	5	
[0146]	gaggtccagc tgcagcaatc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata	60	
[0147]	tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg	120	
[0148]	cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtgctag tactaagtac	180	
[0149]	aatgagaagt tcaaggcaa ggccacattc actgcagata catcctcaa cacagcctac	240	
[0150]	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagagattat	300	
[0151]	tactacggta gtagctacgg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctcg	360	
[0152]	agt		363
[0153]	<210>	6	
[0154]	<211>	121	
[0155]	<212>	PRT	
[0156]	<213>	人工序列 (Artificial sequence)	
[0157]	<220>		
[0158]	<223>	鼠抗体TF278的重链可变区的氨基酸序列	
[0159]	<400>	6	
[0160]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala		
[0161]	1	5	10 15
[0162]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr		
[0163]		20	25 30

[0164]	Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile	
[0165]	35	40 45
[0166]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
[0167]	50	55 60
[0168]	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
[0169]	65	70 75 80
[0170]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	
[0171]	85	90 95
[0172]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly	
[0173]	100	105 110
[0174]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0175]	115	120
[0176]	<210> 7	
[0177]	<211> 330	
[0178]	<212> DNA	
[0179]	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
[0180]	<220>	
[0181]	<223> 鼠抗体TF278的轻链可变区的核苷酸序列	
[0182]	<400> 7	
[0183]	caggetgttg tgactcagga atctgcactc accacatcac ctggtgaaac agtcacactc	60
[0184]	acttgtcgct caagtactgg ggctgttaca actagtaact atgccaactg ggtccaagaa	120
[0185]	aaaccagatc atttattcac tggcctaata ggtggtacca acaaccgagg tccaggtgtt	180
[0186]	cctgccagat tctcagctc cctgattgga gacaaggctg ccctcaccat cacaggggca	240
[0187]	cagactgagg atgaggcagt atatttctgt gctctatggt acagcaacca ttgggtgttc	300
[0188]	ggtggaggaa ccaaactgac tgtcctaggt	330
[0189]	<210> 8	
[0190]	<211> 110	
[0191]	<212> PRT	
[0192]	<213> 人工序列(Artificial sequence)	
[0193]	<220>	
[0194]	<223> 鼠抗体TF278的轻链可变区的氨基酸序列	
[0195]	<400> 8	
[0196]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu	
[0197]	1	5 10 15
[0198]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser	
[0199]	20	25 30
[0200]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly	
[0201]	35	40 45
[0202]	Leu Ile Gly Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe	
[0203]	50	55 60
[0204]	Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala	
[0205]	65	70 75 80

[0206]	Gln Thr Glu Asp Glu Ala Val Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0207]	85 90 95
[0208]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
[0209]	100 105 110
[0210]	<210> 9
[0211]	<211> 121
[0212]	<212> PRT
[0213]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0214]	<220>
[0215]	<223> 人源化TF抗体B278的重链可变区VH6的氨基酸序列
[0216]	<400> 9
[0217]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala
[0218]	1 5 10 15
[0219]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[0220]	20 25 30
[0221]	Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0222]	35 40 45
[0223]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0224]	50 55 60
[0225]	Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
[0226]	65 70 75 80
[0227]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0228]	85 90 95
[0229]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
[0230]	100 105 110
[0231]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0232]	115 120
[0233]	<210> 10
[0234]	<211> 121
[0235]	<212> PRT
[0236]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0237]	<220>
[0238]	<223> 人源化TF抗体B278的重链可变区VH4的氨基酸序列
[0239]	<400> 10
[0240]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0241]	1 5 10 15
[0242]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[0243]	20 25 30
[0244]	Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0245]	35 40 45
[0246]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0247]	50 55 60

[0248]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr
[0249]	65 70 75 80
[0250]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0251]	85 90 95
[0252]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
[0253]	100 105 110
[0254]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0255]	115 120
[0256]	<210> 11
[0257]	<211> 121
[0258]	<212> PRT
[0259]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0260]	<220>
[0261]	<223> 人源化TF抗体B278的重链可变区VH5的氨基酸序列
[0262]	<400> 11
[0263]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0264]	1 5 10 15
[0265]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[0266]	20 25 30
[0267]	Trp Ile Glu Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0268]	35 40 45
[0269]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0270]	50 55 60
[0271]	Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Val Tyr
[0272]	65 70 75 80
[0273]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0274]	85 90 95
[0275]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
[0276]	100 105 110
[0277]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0278]	115 120
[0279]	<210> 12
[0280]	<211> 110
[0281]	<212> PRT
[0282]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0283]	<220>
[0284]	<223> 人源化TF抗体B278的轻链可变区VL7的氨基酸序列
[0285]	<400> 12
[0286]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0287]	1 5 10 15
[0288]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0289]	20 25 30

[0290]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Leu Pro Lys Gly
[0291]	35 40 45
[0292]	Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Trp Thr Thr Ala Arg Phe
[0293]	50 55 60
[0294]	Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asp Lys Ala Val Leu Thr Leu Trp Gly Ala
[0295]	65 70 75 80
[0296]	His Thr Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0297]	85 90 95
[0298]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
[0299]	100 105 110
[0300]	<210> 13
[0301]	<211> 110
[0302]	<212> PRT
[0303]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0304]	<220>
[0305]	<223> 人源化TF抗体B278的轻链可变区VL3的氨基酸序列
[0306]	<400> 13
[0307]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0308]	1 5 10 15
[0309]	Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0310]	20 25 30
[0311]	Asn Tyr Ala Asn Trp Ile Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gly Pro Lys Thr
[0312]	35 40 45
[0313]	Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Trp Thr Thr Ala Arg Phe
[0314]	50 55 60
[0315]	Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asp Lys Ala Val Leu Thr Leu Trp Gly Ala
[0316]	65 70 75 80
[0317]	His Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0318]	85 90 95
[0319]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr His Leu Thr Val Gln Gly
[0320]	100 105 110
[0321]	<210> 14
[0322]	<211> 110
[0323]	<212> PRT
[0324]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0325]	<220>
[0326]	<223> 人源化TF抗体B278的轻链可变区VL5的氨基酸序列
[0327]	<400> 14
[0328]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0329]	1 5 10 15
[0330]	Ser Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0331]	20 25 30

[0332]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Thr Pro Thr Ser
[0333]	35 40 45
[0334]	Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe
[0335]	50 55 60
[0336]	Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asp Lys Ala Val Leu Thr Leu Trp Gly Ala
[0337]	65 70 75 80
[0338]	His Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0339]	85 90 95
[0340]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
[0341]	100 105 110
[0342]	<210> 15
[0343]	<211> 110
[0344]	<212> PRT
[0345]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0346]	<220>
[0347]	<223> 人源化TF抗体B278的轻链可变区VL6的氨基酸序列
[0348]	<400> 15
[0349]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly
[0350]	1 5 10 15
[0351]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0352]	20 25 30
[0353]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Glu Lys Pro Gly His Gly Phe Lys Gly
[0354]	35 40 45
[0355]	Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Trp Thr Thr Ala Arg Phe
[0356]	50 55 60
[0357]	Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asp Lys Ala Val Leu Thr Leu Trp Gly Ala
[0358]	65 70 75 80
[0359]	His Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0360]	85 90 95
[0361]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
[0362]	100 105 110
[0363]	<210> 16
[0364]	<211> 110
[0365]	<212> PRT
[0366]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0367]	<220>
[0368]	<223> 人源化TF抗体B278的轻链可变区VL8的氨基酸序列
[0369]	<400> 16
[0370]	Gln Ser Ala Leu Ile Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0371]	1 5 10 15
[0372]	Ser Val Thr Ile Ser Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0373]	20 25 30

[0374]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln His Pro Gly Thr Val Pro Lys Pro
[0375]	35 40 45
[0376]	Met Ile Tyr Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe
[0377]	50 55 60
[0378]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Met Thr Ile Ser Gly Leu
[0379]	65 70 75 80
[0380]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0381]	85 90 95
[0382]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
[0383]	100 105 110
[0384]	<210> 17
[0385]	<211> 451
[0386]	<212> PRT
[0387]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0388]	<220>
[0389]	<223> 全长重链HC6的氨基酸序列
[0390]	<400> 17
[0391]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Met Lys Pro Gly Ala
[0392]	1 5 10 15
[0393]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
[0394]	20 25 30
[0395]	Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0396]	35 40 45
[0397]	Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Ala Ser Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0398]	50 55 60
[0399]	Lys Gly Arg Val Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
[0400]	65 70 75 80
[0401]	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0402]	85 90 95
[0403]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly
[0404]	100 105 110
[0405]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
[0406]	115 120 125
[0407]	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
[0408]	130 135 140
[0409]	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
[0410]	145 150 155 160
[0411]	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
[0412]	165 170 175
[0413]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
[0414]	180 185 190
[0415]	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His

[0416]	195	200	205
[0417]	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
[0418]	210	215	220
[0419]	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
[0420]	225	230	235
[0421]	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[0422]	245	250	255
[0423]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
[0424]	260	265	270
[0425]	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
[0426]	275	280	285
[0427]	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
[0428]	290	295	300
[0429]	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
[0430]	305	310	315
[0431]	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[0432]	325	330	335
[0433]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
[0434]	340	345	350
[0435]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
[0436]	355	360	365
[0437]	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
[0438]	370	375	380
[0439]	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
[0440]	385	390	395
[0441]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
[0442]	405	410	415
[0443]	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
[0444]	420	425	430
[0445]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
[0446]	435	440	445
[0447]	Pro Gly Lys		
[0448]	450		
[0449]	<210> 18		
[0450]	<211> 215		
[0451]	<212> PRT		
[0452]	<213> 人工序列(Artificial sequence)		
[0453]	<220>		
[0454]	<223> 全长轻链LC7的氨基酸序列		
[0455]	<400> 18		
[0456]	Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly		
[0457]	1	5	10
			15

[0458]	Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
[0459]	20 25 30
[0460]	Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Leu Pro Lys Gly
[0461]	35 40 45
[0462]	Leu Ile Ser Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro Trp Thr Thr Ala Arg Phe
[0463]	50 55 60
[0464]	Ser Gly Ser Ile Leu Gly Asp Lys Ala Val Leu Thr Leu Trp Gly Ala
[0465]	65 70 75 80
[0466]	His Thr Glu Asp Glu Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
[0467]	85 90 95
[0468]	His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
[0469]	100 105 110
[0470]	Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu
[0471]	115 120 125
[0472]	Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro
[0473]	130 135 140
[0474]	Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala
[0475]	145 150 155 160
[0476]	Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala
[0477]	165 170 175
[0478]	Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg
[0479]	180 185 190
[0480]	Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr
[0481]	195 200 205
[0482]	Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0483]	210 215
[0484]	<210> 19
[0485]	<211> 10
[0486]	<212> PRT
[0487]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0488]	<220>
[0489]	<223> VH-CDR1
[0490]	<400> 19
[0491]	Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
[0492]	1 5 10
[0493]	<210> 20
[0494]	<211> 17
[0495]	<212> PRT
[0496]	<213> 人工序列(Artificial sequence)
[0497]	<220>
[0498]	<223> VH-CDR2
[0499]	<400> 20

[0500]	Glu Ile Leu Pro Gly Ser AlaSer Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys														
[0501]	1	5				10					15				
[0502]	Gly														
[0503]	<210>	21													
[0504]	<211>	14													
[0505]	<212>	PRT													
[0506]	<213>	人工序列(Artificial sequence)													
[0507]	<220>														
[0508]	<223>	VH-CDR3													
[0509]	<400>	21													
[0510]	Ala Arg Asp Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr														
[0511]	1	5				10									
[0512]	<210>	22													
[0513]	<211>	14													
[0514]	<212>	PRT													
[0515]	<213>	人工序列(Artificial sequence)													
[0516]	<220>														
[0517]	<223>	VL-CDR1													
[0518]	<400>	22													
[0519]	Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn														
[0520]	1	5				10									
[0521]	<210>	23													
[0522]	<211>	7													
[0523]	<212>	PRT													
[0524]	<213>	人工序列(Artificial sequence)													
[0525]	<220>														
[0526]	<223>	VL-CDR2													
[0527]	<400>	23													
[0528]	Gly Thr Asn Asn Arg Gly Pro														
[0529]	1	5													
[0530]	<210>	24													
[0531]	<211>	9													
[0532]	<212>	PRT													
[0533]	<213>	人工序列(Artificial sequence)													
[0534]	<220>														
[0535]	<223>	VL-CDR3													
[0536]	<400>	24													
[0537]	Ala Leu Trp Tyr Ser Asn His Trp Val														
[0538]	1	5													
[0539]	<210>	25													
[0540]	<211>	363													
[0541]	<212>	DNA													

[0542]	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
[0543]	<220>		
[0544]	<223>	人源化TF抗体B278的重链可变区的核苷酸序列	
[0545]	<400>	25	
[0546]		gaggtccagc tgcaacagtc gggagcagag gtgatgaagc ccgagcctc agtgaagatt	60
[0547]		agctgcaaag cctcgggata cactttctcg tcatactgga ttgaatgggt caaacaggcc	120
[0548]		cccgccaag gactggagtg gattggcgaa atccttcctg ggagcgctc gaccaagtac	180
[0549]		aacgagaagt tcaaggagc cgtgacattc accgccgata ccagcaccaa cactgcctac	240
[0550]		atggagctta gtcattgcg gtccgaggat accgctgtgt actactgtgc gcgggactac	300
[0551]		tattacggct ctcatacgg cttcgcatac tggggacagg gtaccttgggt cacggtgtcc	360
[0552]		tcc	363
[0553]	<210>	26	
[0554]	<211>	330	
[0555]	<212>	DNA	
[0556]	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
[0557]	<220>		
[0558]	<223>	人源化TF抗体B278的轻链可变区的核苷酸序列	
[0559]	<400>	26	
[0560]		caggctgtgg tcaactcagga gccttcgctg actgtcagcc cgggcggtac cgtgaccctg	60
[0561]		acctgtcgt cctcaactgg agcagtgacc acctccaact acgcgaactg ggtgcagcag	120
[0562]		aaaccggcc aacttcctaa gggactgac tccggcacta acaacagggg accttgacc	180
[0563]		accgcccgggt tctccggttc catccttggg gacaaggcgg tgctgacact gtggggggcc	240
[0564]		cacacggagg acgaggccgt ctactactgc gcgctctggt actccaacca ttgggtgttt	300
[0565]		ggcggaggca ctaagttgac cgtgctgggc	330
[0566]	<210>	27	
[0567]	<211>	1356	
[0568]	<212>	DNA	
[0569]	<213>	人工序列(Artificial sequence)	
[0570]	<220>		
[0571]	<223>	人源化TF抗体的全长重链的核苷酸序列	
[0572]	<400>	27	
[0573]		gaggtccagc tgcaacagtc gggagcagag gtgatgaagc ccgagcctc agtgaagatt	60
[0574]		agctgcaaag cctcgggata cactttctcg tcatactgga ttgaatgggt caaacaggcc	120
[0575]		cccgccaag gactggagtg gattggcgaa atccttcctg ggagcgctc gaccaagtac	180
[0576]		aacgagaagt tcaaggagc cgtgacattc accgccgata ccagcaccaa cactgcctac	240
[0577]		atggagctta gtcattgcg gtccgaggat accgctgtgt actactgtgc gcgggactac	300
[0578]		tattacggct ctcatacgg cttcgcatac tggggtcagg gaaccttgggt cacggtgtcc	360
[0579]		tccgcgtcca ccaagggtcc ctccgtgttc cctctcgcgc cgtcctcaaa gtctacctcc	420
[0580]		ggtggaactg ccgcgctcgg ttgtctcgtg aaggactact tcccggagcc tgtgactgtc	480
[0581]		tcctggaact ccggggccct caccagcgga gtgcacactt tccccccgt gctgcaatcc	540
[0582]		tccggcctgt acagcctgtc ctccgtcgtg actgtgccta gtcctccct gggaaccag	600
[0583]		acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtcgacaa gaaggtcgaa	660

[0584]	ccgaagtcgt gcgacaagac tcatacgtgc cctccttgcc cggccccgga actgctggga	720
[0585]	ggcccatccg tggtcctggt cccaccaag cctaaggata ccctgatgat cagcagaaca	780
[0586]	ccggaagtga cctgtgtggt ggtggacgtc agccacgaag atccccaggt caagttcaat	840
[0587]	tggtacgtgg acgggggtga ggtgcacaac gcaaagacca agccccggga ggaacagtac	900
[0588]	aactccacct atcgcgtggt gtcggtgctg acgggtgctgc accaggactg gttgaacgga	960
[0589]	aaggagtata agtgcaaagt gtcgaacaag gccctgcccc ctcctatcga aaagaccatc	1020
[0590]	tccaaggcca agggccagcc gcgggaaccc caggtctaca ctctcccacc gagccgcgac	1080
[0591]	gaactgacta agaatcaagt gtcgtgact tgccctgtca agggcttcta cccgtccgac	1140
[0592]	atgccgtgg aatgggagag caacggccag ccgaaaaaca actacaagac caccctccc	1200
[0593]	gtgctggatt ccgacgggtc cttcttcctg tactcaaac tgaccgtgga taagtccaga	1260
[0594]	tggcagcagg gcaatgtctt ttcattgtcc gtgatgcacg aggtctgtca taaccactac	1320
[0595]	accagaagt cgctgtccct gtccccgggg aagtga	1356
[0596]	<210>	28
[0597]	<211>	648
[0598]	<212>	DNA
[0599]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0600]	<220>	
[0601]	<223>	人源化TF抗体的全长轻链的核苷酸序列
[0602]	<400>	28
[0603]	caggetgtgg tcaactcagga gccttcgtg actgtcagcc cgggtggcac cgtgacctg	60
[0604]	acctgtcgt cctcaactgg agcagtgacc acctccaact acgcgaactg ggtgcagcag	120
[0605]	aaacccggcc aacttcctaa gggactgatc tccggcacta acaacagggg accttgacc	180
[0606]	accgcccggg tctccggttc catccttggg gacaaggcgg tgctgacact gtggggggcc	240
[0607]	cacacggagg acgaggccgt ctactactgc gcgctctggt actccaacca ttgggtgttt	300
[0608]	ggcggaggca ctaagttgac cgtgctgggc cagcctaagg ccgcaccatc ggtgacctg	360
[0609]	ttcccgcga gtcggaaga actccagccc aacaaggcca ctctggtctg cctgatttcc	420
[0610]	gacttctatc ccggtgctgt gaccgtggct tggaaggccg atagctgcc cgtgaaggcc	480
[0611]	ggagtggaaa ccaccacccc gtccaacag tccaacaata agtacgccgc ctctctctac	540
[0612]	ttgacctca cgcccagca gtggaagtct caccgtcat actctgcca agtcacccac	600
[0613]	gaaggagca ctgtggaaaa gaccgtggca cccactgagt gctcgtga	648
[0614]	<210>	29
[0615]	<211>	57
[0616]	<212>	DNA
[0617]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0618]	<220>	
[0619]	<223>	合成
[0620]	<400>	29
[0621]	atgggatgga ctctcgtgtt cttttttctc ctctctgtca ctgccgggt gcattcg	57
[0622]	<210>	30
[0623]	<211>	19
[0624]	<212>	PRT
[0625]	<213>	人工序列(Artificial sequence)

[0626]	<220>	
[0627]	<223>	合成
[0628]	<400>	30
[0629]	Met Gly Trp Thr Leu Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly	
[0630]	1	5 10 15
[0631]	Val His Ser	
[0632]	<210>	31
[0633]	<211>	60
[0634]	<212>	DNA
[0635]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0636]	<220>	
[0637]	<223>	合成
[0638]	<400>	31
[0639]	atggtgtcaa gcgcgcagtt tctgggactg ctctgtctgt gttccaagg aaccagatgc 60	
[0640]	<210>	32
[0641]	<211>	20
[0642]	<212>	PRT
[0643]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0644]	<220>	
[0645]	<223>	合成
[0646]	<400>	32
[0647]	Met Val Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln	
[0648]	1	5 10 15
[0649]	Gly Thr Arg Cys	
[0650]		20
[0651]	<210>	33
[0652]	<211>	60
[0653]	<212>	DNA
[0654]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0655]	<220>	
[0656]	<223>	合成
[0657]	<400>	33
[0658]	atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgtctt gggttccagg atctactggc 60	
[0659]	<210>	34
[0660]	<211>	20
[0661]	<212>	PRT
[0662]	<213>	人工序列(Artificial sequence)
[0663]	<220>	
[0664]	<223>	合成
[0665]	<400>	34
[0666]	Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
[0667]	1	5 10 15

[0668]	Gly Ser Thr Gly	
[0669]	20	
[0670]	<210>	35
[0671]	<211>	363
[0672]	<212>	DNA
[0673]	<213>	人工序列 (Artificial sequence)
[0674]	<220>	
[0675]	<223>	人源化TF抗体B278的重链可变区的核苷酸序列
[0676]	<400>	35
[0677]	gaggtccagc tgcaacagtc gggagcagag gtgatgaagc ccggagcctc agtgaagatt	60
[0678]	agctgcaaag cctcgggata cactttctcg tcatactgga ttgaatgggt caaacaggcc	120
[0679]	cccgccaag gactggagtg gattggcgaa atccttcctg ggagcgctc gaccaagtac	180
[0680]	aacgagaagt tcaaggagc cgtagacattc accgccgata ccagcaccaa cactgcctac	240
[0681]	atggagctta gtcattgctg gtccgaggat accgctgtgt actactgtgc gcgggactac	300
[0682]	tattacggct cctcatacgg cttagcatac tggggtcagg gaaccttggt cacggtgtcc	360
[0683]	tcc	363
[0684]	<210>	36
[0685]	<211>	330
[0686]	<212>	DNA
[0687]	<213>	人工序列 (Artificial sequence)
[0688]	<220>	
[0689]	<223>	人源化TF抗体B278的轻链可变区的核苷酸序列
[0690]	<400>	36
[0691]	caggtgtgg tcaactcagga gccttcgctg actgtcagcc cgggtggcac cgtgaccctg	60
[0692]	acctgtcgt cctcaactgg agcagtgacc acctccaact acgcgaactg ggtgcagcag	120
[0693]	aaacccggcc aacttcctaa gggactgatc tccggcacta acaacagggg accttgacc	180
[0694]	accgcccggg tctccggttc catccttggg gacaaggcgg tgctgacact gtggggggcc	240
[0695]	cacacggagg acgaggccgt ctactactgc gcgctctggt actccaacca ttgggtgttt	300
[0696]	ggcggaggca ctaagttgac cgtgctgggc	330

ATGGAGACCCCTGCCTGGCCCCGGGTCCCGGGCCCGGAGACCGCGCTCGCTCGGACGCTC
 M E T P A W P R V P R P E T A V A R T L
 CTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCAGGTGGCCGGCTTCAGGCACTACAAATACTGTGGCA
 L L G W V F A Q V A G A S G T T N T V A
 GCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAATTTGGAGTGGGAACCCAAA
 A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K
 CCGTCAATCAAGCTACACTGTTCAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGAAAAGCAAA
 P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K
 TGCTTTTACACAACAGACACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAG
 C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K
 CAGACGTACTTGGCAGGGTCTTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGAGCACCGGTTCT
 Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S
 GCTGGGAGCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTC
 A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L
 GGACAGCCACAATTCAGAGTTTGAACAGGTGGGAACAAGTGAATGTGACCGTAGAA
 G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E
 GATGAACGGACTTTTAGTCAGAAGGAACAACACTTTCCCTAAGCCCTCCGGGATGTTTTTGGC
 D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G
 AAGGACTTAATTTATACACTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAGAAACAGCC
 K D L I Y T L Y Y W K S S S S G K K T A
 AAAACAACACTAATGAGTTTTTTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTACTGTTTCAGT
 K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S
 GTTCAAGCAGTGATTCCTCCGAAACAGTTAACCGGAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAG
 V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E
 TGTATGGCCAGGAGAAAGGGAATTCAGAGAAATATTCTACATCATTTGGAGCTGTGGTA
 C M G Q E K G E F R E I F Y I I G A V V
 TTTGTGTCATCCTTGTTCATCATCCTGGCTATATCTACACAAGTGTAGAAAGGCA
 F V V I I L V I I L A I S L H K C R K A
 GGAGTGGGCAGAGCTGGAAGCAGAACTCCCCACTGAATGTTCAAGAGGATCCCCACCAT
 G V G Q S W K E N S P L N V S R G S H H
 CACCATCACCATTA
 H H H H *

图1

ATGGAGACCCCTGCCTGGCCCGGGTCCCGGCCCCGAGACCGCGCTGCTCGGAGGCTC
 M E T P A W P R V P R P E T A V A R T L
 CTGCTCGGCTGGGTCTTCGCCCCAGGTGGCCCGCGCTTCAGGCACACTACAAATACTGTGGCA
 L L G W V F A Q V A G A S G T T N T V A
 GCATATAATTTAACTTGGAAATCAACTAATTTCAAGACAAATTTGGAGTGGGAACCCAAA
 A Y N L T W K S T N F K T I L E W E P K
 CCGTCAATCAAGTCTACACTGTTCAAAATAAGCACTAAGTCAGGAGATTGGAAAAGCAAA
 P V N Q V Y T V Q I S T K S G D W K S K
 TGCTTTTACACAACACAGACAGAGTGTGACCTCACCGACGAGATTGTGAAGGATGTGAAG
 C F Y T T D T E C D L T D E I V K D V K
 CAGACGTACTTGGCACGGGTCTTCTCCTACCCGGCAGGGAATGTGGAGACCGGTTCT
 Q T Y L A R V F S Y P A G N V E S T G S
 GCTGGGAGCCCTCTGTATGAGAACTCCCCAGAGTTCACACCTTACCTGGAGACAAACCTC
 A G E P L Y E N S P E F T P Y L E T N L
 GGACAGCCAAACAATTCAGAGTTTGAACAGGTGGGAACAAAAGTGAATGTGACCGTAGAA
 G Q P T I Q S F E Q V G T K V N V T V E
 GATGAACGGACTTTAGTCAGAAGGAACAACACACTTCCCTAAGCCTCCGGGATGTTTTTGGC
 D E R T L V R R N N T F L S L R D V F G
 AAGGACTTAATTATACACTTTATTATTGGAAATCTTCAAGTTCAGGAAAGAAAACAGCC
 K D L I Y T L Y Y W K S S S G K T A
 AAACAAACACTAATGAGTTTGTGATTGATGTGGATAAAGGAGAAAACACTACTGTTTCAGT
 K T N T N E F L I D V D K G E N Y C F S
 GTTCAAGCAGTGATCCCTCCCGAACAGTTAACGGAAAGAGTACAGACAGCCCGGTAGAG
 V Q A V I P S R T V N R K S T D S P V E
 TGTATGGCCAGGAGAAAGGGAATTCAGAGAAAGAGGATCCACCATCACCATCACCAT
 C M G Q E E K G E F R E R G S H H H H
 TAA
 *

图2

GAG GTC CAG CTG CAG CAA TCT GGA GCT GAG CTG ATG AAG
 E V Q L Q Q S G A E L M K
 CCT GGG GCC TCA GTG AAG ATA TCC TGC AAG GCT ACT GGC
 P G A S V K I S C K A T G
 TAC ACA TTC AGT AGC TAC TGG ATA GAG TGG GTA AAG CAG
 Y T F S S Y W I E W V K Q
 AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG ATT GGA GAG ATT TTA
 R P G H G L E W I G E I L
 CCT GGA AGT GCT AGT ACT AAG TAC AAT GAG AAG TTC AAG
 P G S A S T K Y N E K F K
 GGC AAG GGC ACA TTC ACT GCA GAT ACA TCC TCC AAC ACA
 G K A T E T A D T S S N T
 GCC TAC ATG CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT
 A Y M Q L S S L T S E D S
 GCC GTC TAT TAC TGT GCA AGA GAT TAT TAC TAC GGT AGT
 A V Y Y C A R D Y Y Y G S
 AGC TAC GGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC
 S Y G F A Y W G Q G T L V
 ACT GTC TCG AGT
 T V S S

图3A

```

CAG GCT GTT GTG ACT CAG GAA TCT GCA CTC ACC ACA TCA
Q  A  V  V  T  Q  E  S  A  I  T  T  S
CCT GGT GAA ACA GTC ACA CTC ACT TGT CGC TCA AGT ACT
P  G  E  T  V  T  L  T  C  R  S  S  T
GGG GCT GTT ACA ACT AGT AAC TAT GCC AAC TGG GTC CAA
G  A  V  T  T  S  N  Y  A  N  W  V  Q
GAA AAA CCA GAT CAT TTA TTC ACT GGC CTA ATA GGT GGT
E  K  P  D  H  L  F  T  G  L  I  G  G
ACC AAC AAC CGA GGT CCA GGT GTT CCT GCC AGA TTC TCA
T  N  N  R  G  P  G  V  P  A  R  F  S
GGC TCC CTG ATT GGA GAC AAG GCT GCC CTC ACC ATC ACA
G  S  L  I  G  D  K  A  A  L  T  I  T
GGG GCA CAG ACT GAG GAT GAG GCA GTA TAT TTC TGT GCT
G  A  Q  T  E  D  E  A  V  Y  F  C  A
CTA TGG TAC AGC AAC CAT TGG GTG TTC GGT GGA GGA ACC
L  W  Y  S  N  H  W  V  F  G  G  G  T
AAA CTG ACT GTC CTA GGT
K  L  T  V  L  G

```

图3B

GAGGTCAGCTGCAACAGTCGGGAGCAGAGGTGATGAAGCCCGGAGCCTCAGTGAAGATT
E V Q L Q Q S G A E V M K P G A S V K I
AGTGCAAAGCCTCGGATACACTTCTCGTCACTAGTGAATGGTCAACAGGCC
S C K A S G Y T F S S Y W I E W V K Q A
CCCGCCAAGGACTGGAGTGGATTGGCGAAATCCTTCTGGGAGCGCCTCGACCAAGTAC
P G Q G L E W I G E I L P G S A S T K Y
AACGAGAAGTTCAAGGACGCGTGACATTCAACCGCGATACCAGCACCAACTGCCTAC
N E K F K G R V T F T A D T S T N T A Y
ATGGAGCTTAGCTCATTTGCGGTCCGAGGATACCGCTGTGTACTACTGTGCGGGGACTAC
M E L S S L R S E D T A V Y Y C A R D Y
TATTACGGCTCCTCATACGGCTTCGCATACTGGGACAGGGTACCTTGGTCACGGTGTCC
Y Y G S S Y G F A Y W G Q G T L V T V S
TCC
S

图4A

```

CAGGCTGTGTCACCTCAGGAGCCCTTCGCTGACTGTGTCAGCCCGGGCGGTACCGTGACCCCTG
Q A V V T Q E P S L T V S P G T V T L
ACCTGTCGCTCCTCAACTGGAGCAGTGACCACTCCAACTACGCGAACTGGGTGCAGCAG
T C R S S T G A V T T S N Y A N W V Q Q
AAACCCGGCCAACTTCCTAAGGACTGATCTCCGGCACTAACACAGGGACCTTGGACC
K P G Q L P K G L I S G T N N R G P W T
ACGCGCGGTTCTCCGGTTCATCCTTGGGACAAAGCGGTGCTGACACTGTGGGGGCC
T A R F S G S I L G D K A V L T L W G A
CACACGGAGACGAGCCGTCTACTACTGCGCGCTCTGGTACTCCAACCATGGGTGTTT
H T E D E A V Y Y C A L W Y S N H W V F
GGCGAGGCACTAAGTTGACCGTGCTGGGC
G G G T K L T V L G

```

图4B

	1	VL-CDR1	50
VL0	(1)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCRSS	TGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLI
VL3	(1)	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSS	TGAVTTSNYANWVQKPGQGPKTLI
VL5	(1)	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSS	TGAVTTSNYANWVQKPGQTPTSLI
VL6	(1)	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSS	TGAVTTSNYANWVQKPGHGFKGLI
VL7	(1)	QAVVTQEPSLTVSPGGSVTLTCRSS	TGAVTTSNYANWVQKPGQLPKGLI
VL8	(1)	QSALIQPPSVSGSPGQSVTISCRSS	TGAVTTSNYANWVQHPGTVPKPMI
	51	VL-CDR2	VL-CDR3 100
VL0	(51)	GGTNNRGPV	PARFSGSLIGDKAALITGAQTEDEAVYFCALWYNHWWVF
VL3	(51)	SGTNNRGPWT	TARFSGSILGDKAVLTILWGAHADEADYYCALWYNHWWVF
VL5	(51)	SGTNNRGPWT	PARFSGSILGDKAVLTILWGAHADEADYFCALWYNHWWVF
VL6	(51)	SGTNNRGPWT	TARFSGSILGDKAVLTILWGAHADEADYFCALWYNHWWVF
VL7	(51)	SGTNNRGPWT	TARFSGSILGDKAVLTILWGAHTEDEAVYYCALWYNHWWVF
VL8	(51)	YGTNNRGPV	PDRFSGSKSGNTASMTISGLQAEDEADYFCALWYNHWWVF
	101		
VL0	(101)	GGGTKLTVLG	
VL3	(101)	GGGTHLTVQG	
VL5	(101)	GGGTKLTVLG	
VL6	(101)	GGGTKLTVLG	
VL7	(101)	GGGTKLTVLG	
VL8	(101)	GGGTKLTVLG	

图5A

	VH-CDR1		
	1	50	
VH0	(1)	EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRP	GHLEWIGE
VH4	(1)	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYWIEWVRQAPGQ	GLEWMGE
VH5	(1)	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSKASGYTFSSYWIEWVRQAPGQ	GLEWMGE
VH6	(1)	EVQLQQSGAEVMKPGASVKISCKASGYTFSSYWIEWVKQAPGQ	GLEWIGE
		VH-CDR2	
	51	100	
VH0	(51)	ILPGSASTKYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDS	AVYYCARDY
VH4	(51)	ILPGSASTKYNEKFKGRVTMTTRDTSTSTVYMELSLRS	EDTAVYYCARDY
VH5	(51)	ILPGSASTKYNEKFKGRVTMTADTSTNTVYMELSLRS	EDTAVYYCARDY
VH6	(51)	ILPGSASTKYNEKFKGRVTFTADTSTNTAYMELSLRS	EDTAVYYCARDY
		VH-CDR3	
	101	121	
VH0	(101)	YYGSSYGFAYWGQG	TLVTVSS
VH4	(101)	YYGSSYGFAYWGQG	TLVTVSS
VH5	(101)	YYGSSYGFAYWGQG	TLVTVSS
VH6	(101)	YYGSSYGFAYWGQG	TLVTVSS

图5B

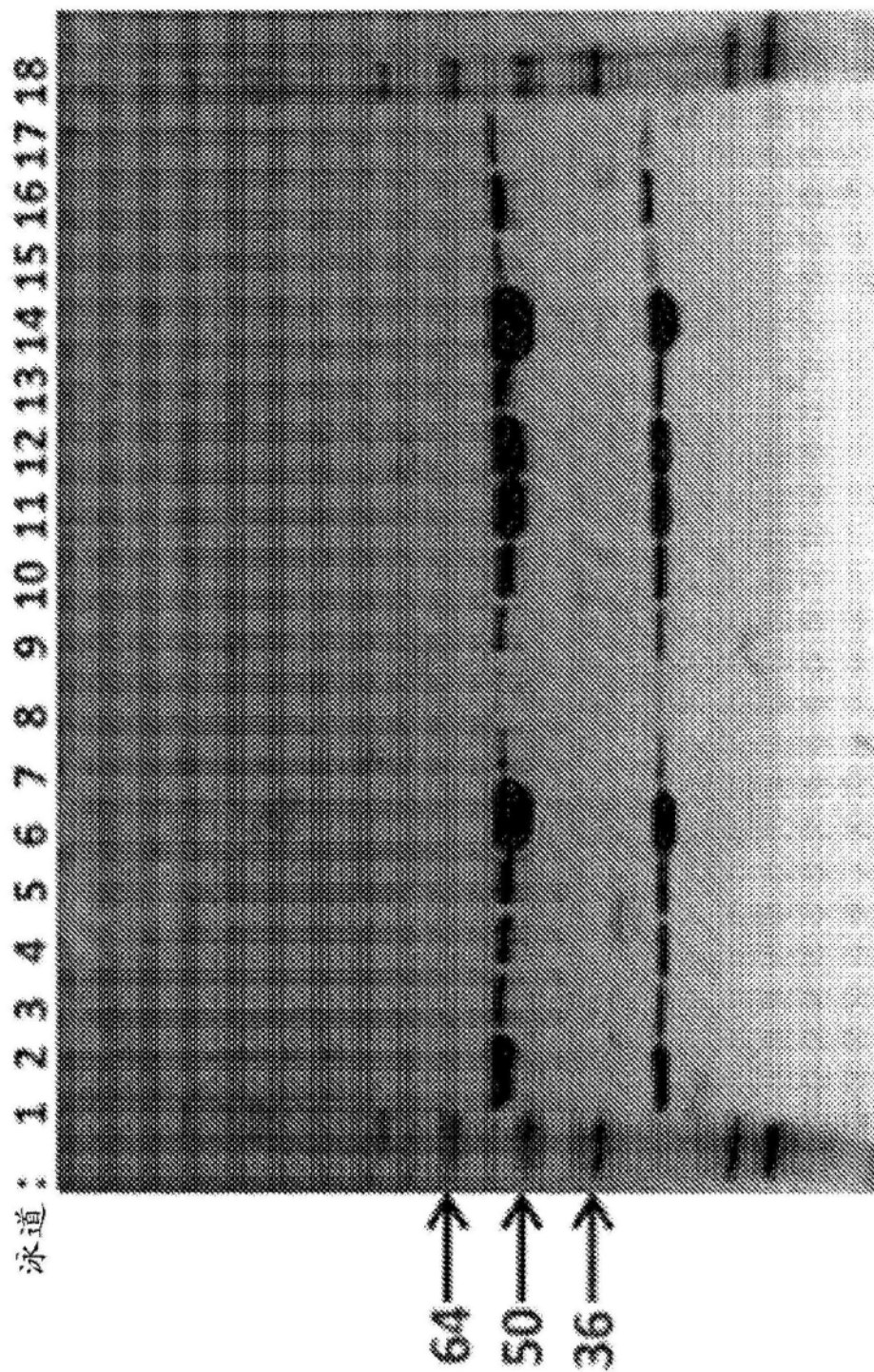


图6

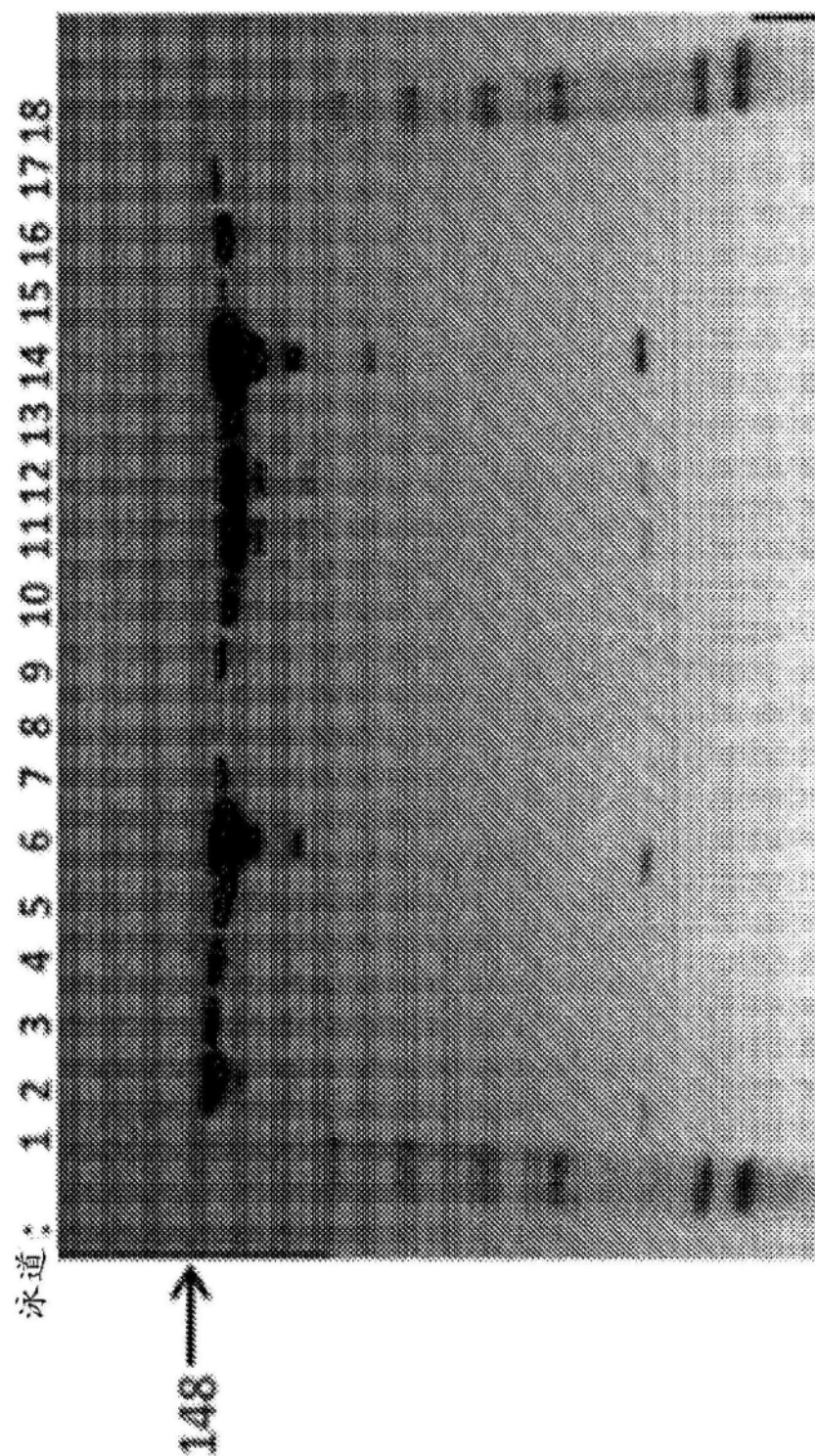


图7

B278-LC7和LC8变体及嵌合B278-LC0HC0与重组人凝血因子III的结合

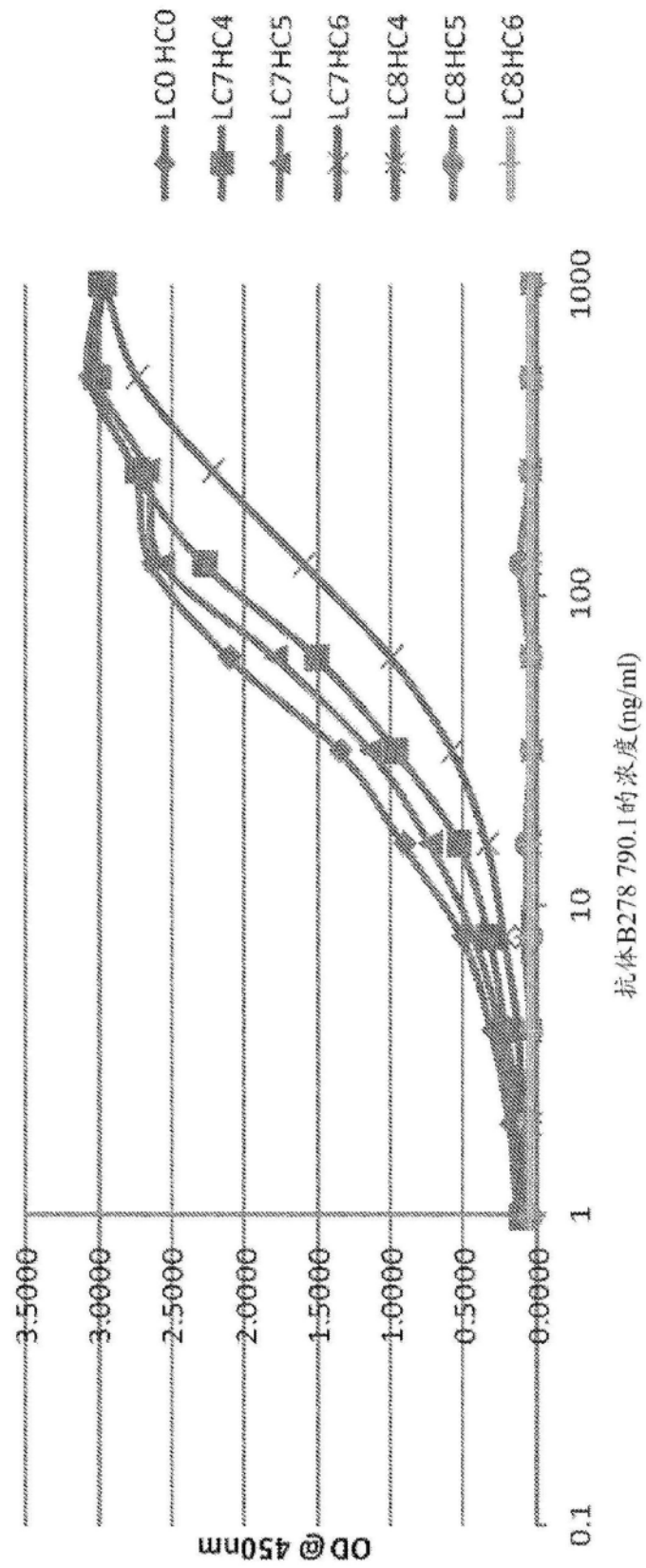


图8

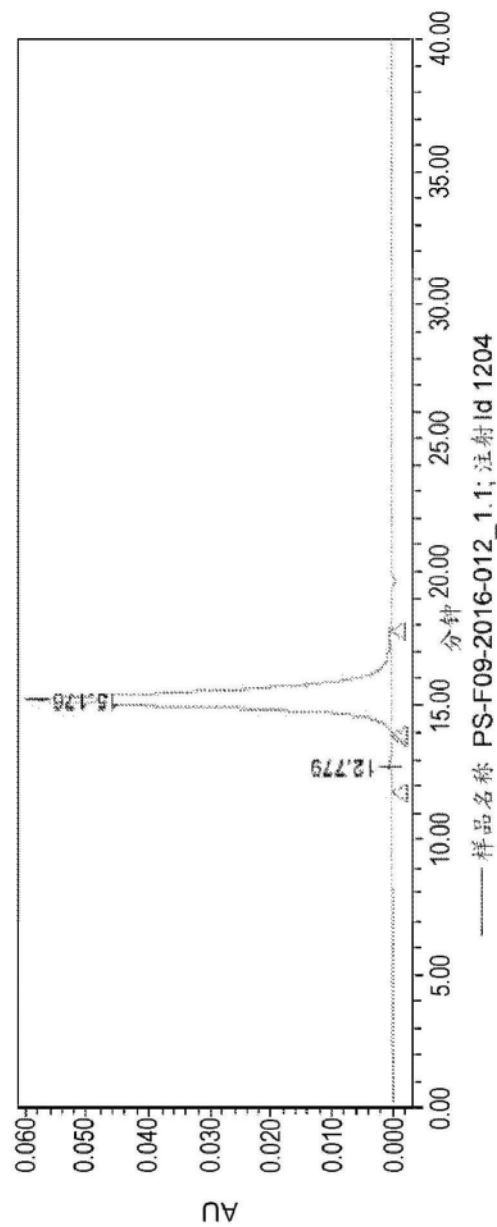


图9A

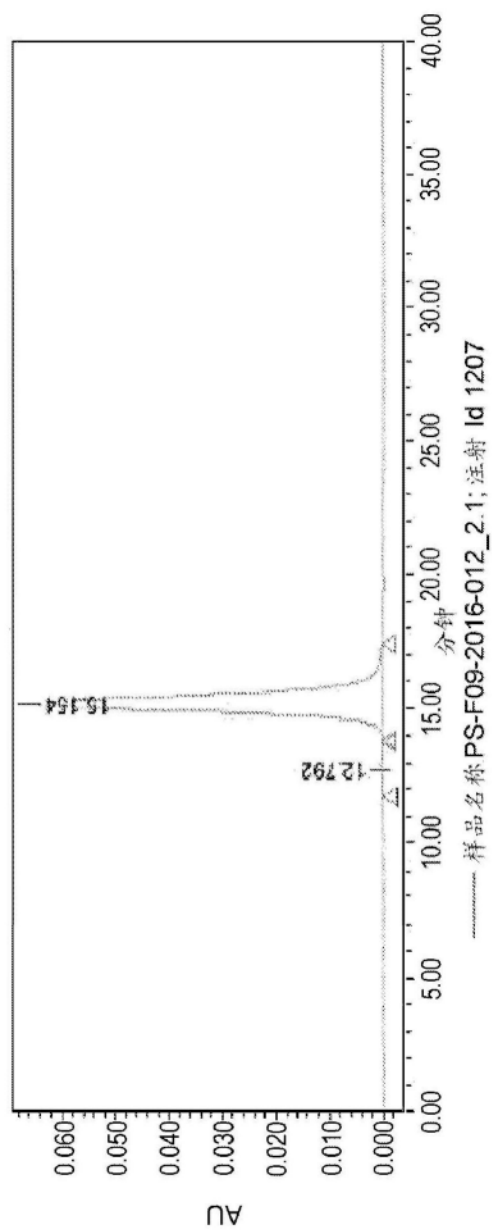


图9B

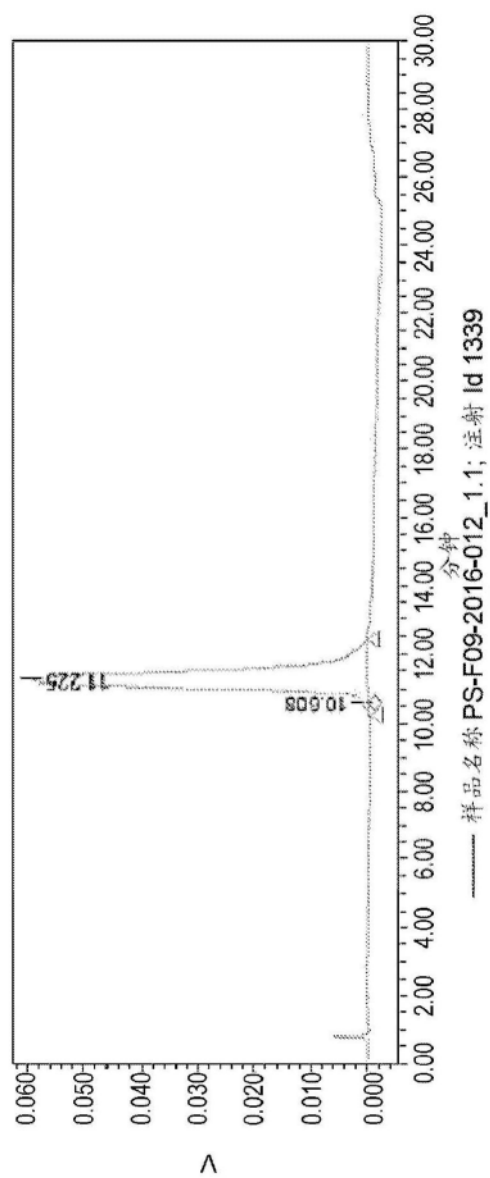


图10A

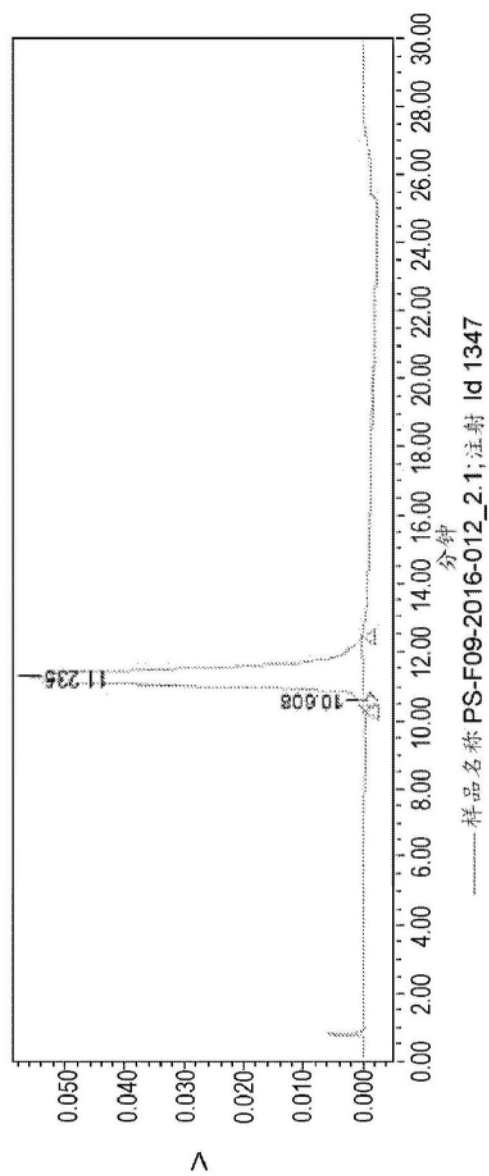


图10B

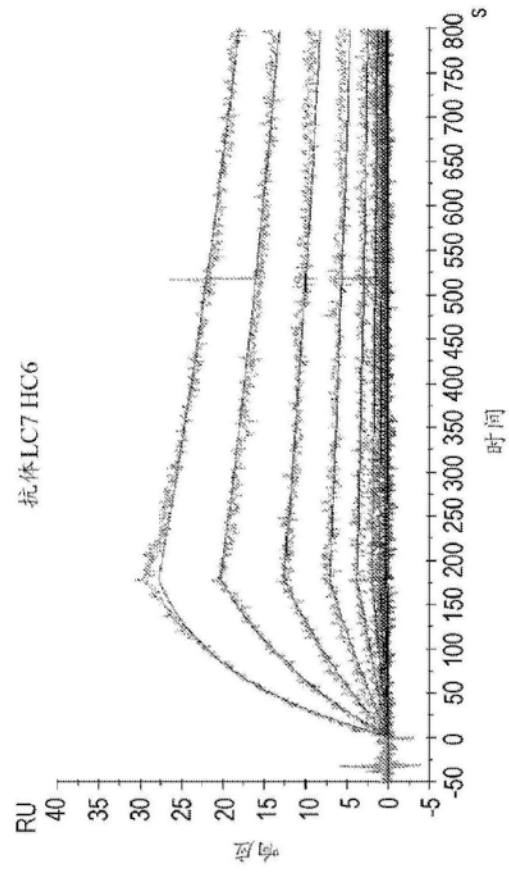


图11A

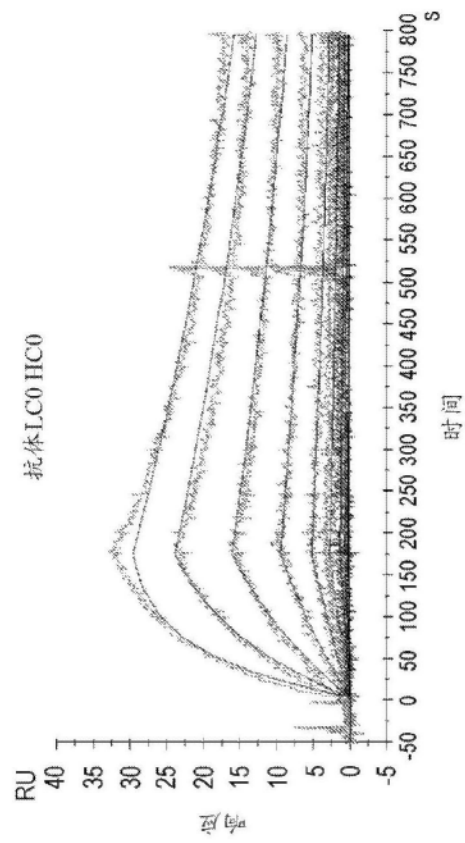


图11B

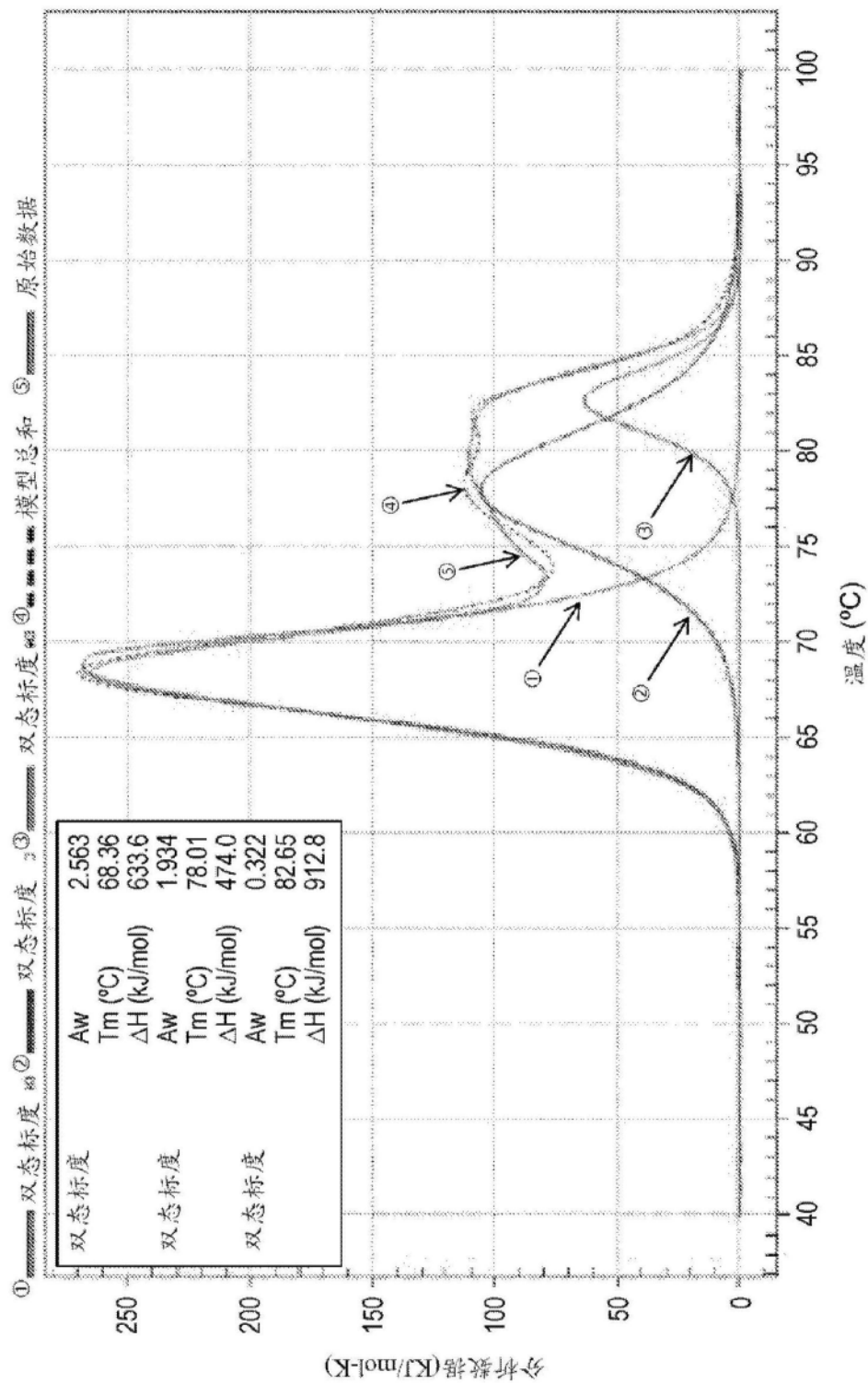


图12

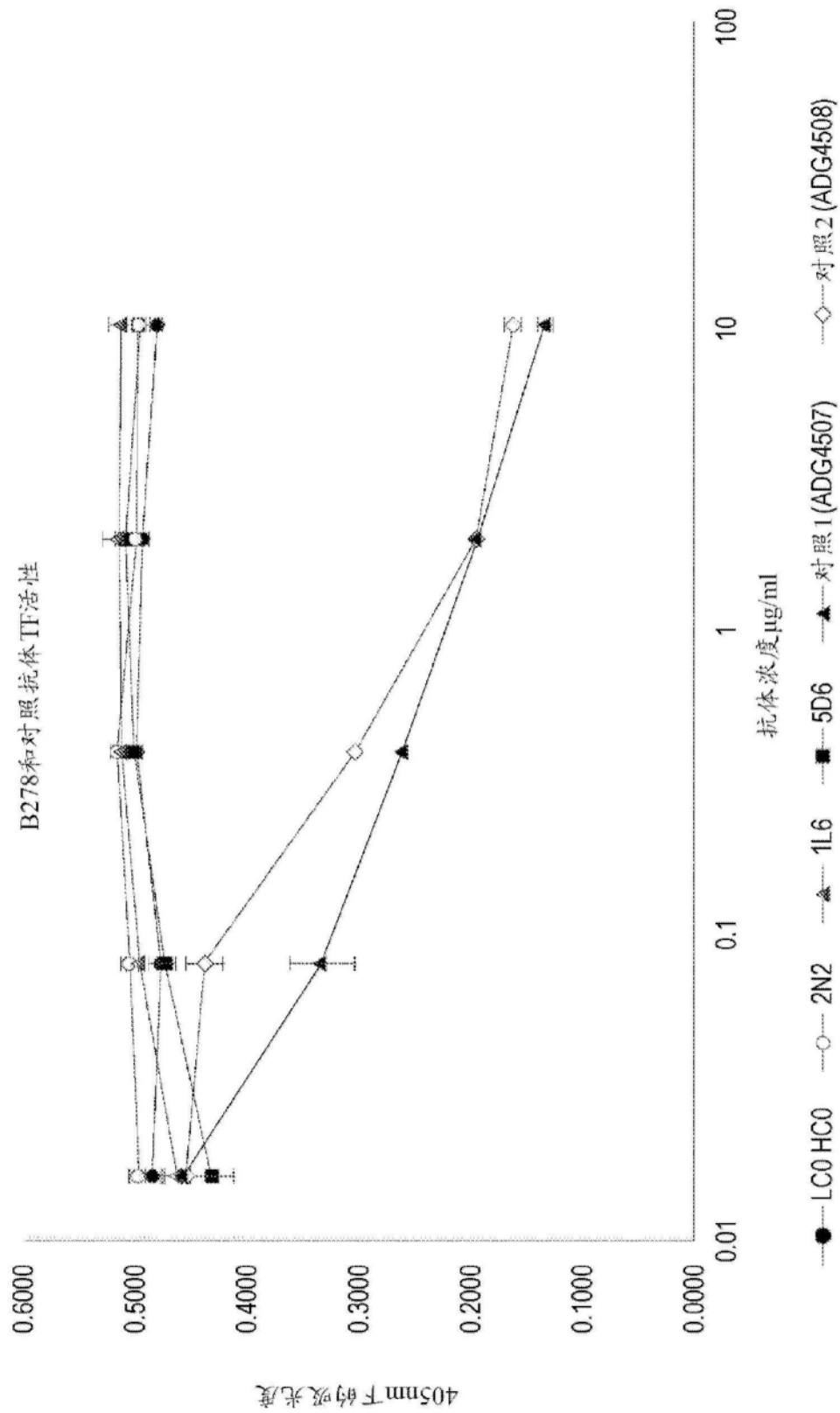


图13