

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03815703.9

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 7/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 2 日

[11] 授权公告号 CN 100563709C

[22] 申请日 2003.4.30 [21] 申请号 03815703.9

[30] 优先权

[32] 2002. 5. 1 [33] US [31] 60/376,566

[86] 国际申请 PCT/US2003/013521 2003.4.30

[87] 国际公布 WO2003/093422 英 2003.11.13

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.31

[73] 专利权人 舍林股份公司

地址 德国柏林

[72] 发明人 戴维·莱特 柯克·麦克莱恩

[56] 参考文献

US5874407A 1999.2.23

US5506134 A 1996.4.9

生物素化抗细胞因子单克隆抗体的制备.
白丽. 免疫学杂志, 第 17 卷第 3 期. 2001

实时生物分子相互作用分析技术用于链霉亲和素-生物素化抗体的层层组装研究. 裴任军, 崔小强, 杨秀荣, 汪尔康. 高等学校学报, 第 23 卷第 2 期. 2002

审查员 陈红霞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 2 页 说明书 43 页 附图 8 页

[54] 发明名称

作为抗凝剂的新的靶向组织因子的抗体

[57] 摘要

本发明涉及一种新的抗体, 其与因子 VIIa/组织因子 (FVIIa/TF) 复合物的结合比与单独组织因子 (TF) 的结合的亲合力更高, 其不与 FVII 及 FX 竞争性地结合 TF, 并抑制 FX 活化。抗体结合于受伤部位并阻止血栓形成的启动。抗体可用于治疗多种血栓性病变, 包括但不限于深静脉血栓、弥漫性血管内凝血以及急性冠脉综合征。

- 1、一种抗凝血抗体，其由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列组成。
- 2、权利要求 1 的抗体，其中所述抗体是针对组织因子产生的、与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比与单独 TF 结合的亲和力更高的单链抗体，且其中所述抗体不与 FVII 及 FX 竞争结合 TF。
- 3、一种抗凝血抗体，其由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列组成，其中所述抗体是糖基化的。
- 4、一种抗凝血抗体，其由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列组成，其中所述抗体通过加入聚乙二醇而修饰。
- 5、一种抗凝血抗体，其由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列组成，其中所述抗体是用于结合链霉亲和素的生物素化的抗体。
- 6、一种药物组合物，其包含权利要求 1 的抗体，该组合物包含药物可接受的赋形剂以及治疗有效量的所述抗体。
- 7、权利要求 1 的抗体在制备用于预防血栓形成的药物中的应用。
- 8、权利要求 7 的应用，其中所述药物预防缺血性卒中、血管成形术后的血栓并发症或微血管手术中的血栓形成。
- 9、权利要求 1 的抗体在制备用于减少和治疗深静脉血栓形成、弥漫性血管内凝血、急性冠脉综合征或具有凝血病表现的癌症的药物中的应用。
- 10、一种试剂盒，包括权利要求 1 的抗体。
- 11、一种试剂盒，包括编码权利要求 1 的抗体的 DNA 序列。
- 12、一种基因治疗组合物，包含与治疗有效量的基因治疗载体组

合的 SEQ ID NO: 2 的多核苷酸序列，其编码由 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列组成的抗体。

13、一种编码权利要求 1 的抗体的多核苷酸序列，其中所述多核苷酸序列由 SEQ ID NO: 2 组成。

作为抗凝剂的新的靶向组织因子的抗体

背景技术

保持血管内促凝血和抗凝血活性之间的适当平衡对于正常的止血是必要的 (Davie, E.W. et al. (1991) *Biochemistry*, 30 (43): 10363-10370)。扰乱该平衡使之倾向于凝血将造成血栓形成, 这会引起心脏病发作、卒中、肺栓塞和静脉血栓形成。需要更有效和更安全的抗凝血剂来治疗特殊的血栓性疾病。

组织因子 (“TF”) 是一种跨膜糖蛋白, 它是凝血级联系统的主要启动物 (Nemerson, Y. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1): 180-184)。在正常的生理条件下, 活性 TF 不和血液接触。在血管受损期间, 暴露于血液的内皮下 TF 及胶原导致凝血因子和血小板的活化并随后形成血栓。所暴露的 TF 作为因子 VIIa (“FVIIa”) 催化激活因子 IX (“FIX”) 和因子 X (“FX”) 的辅因子 (cofactor), 这两种因子分别是内源性 tenase 和凝血酶原酶复合物的关键成分。这导致 FXa 和凝血酶的快速形成。然后凝血酶将纤维蛋白原降解为纤维蛋白, 纤维蛋白随后聚合形成纤维蛋白凝块。在多种临床情况中, 对 TF 表达的不正确的诱导将造成威胁生命的血栓形成和/或引起病理性并发症。相信斑块破裂后的 TF 的暴露是造成引起急性心肌梗死和卒中的血栓性阻塞的原因。在这些情况中, 凝血因子所激活的促炎信号途径也引起水肿形成以及增加梗死面积。与血管成形术相关的血管损伤造成 SMC 上 TF 的上调, 相信这诱导了与再狭窄所相关的细胞信号途径。在癌症和革兰氏阴性细菌脓毒症中, TF 的过度表达造成威胁生命的血栓形成以及炎症途径的激活。

FVIIa/TF 复合物涉及于多种血栓性疾病的发病机制, TF 的循环

水平是某些患者的危险因素。FVIIa 和 TF 在血管损伤中保持止血以及触发血栓形成上发挥着独特的作用。TF 正常地表达于外膜，但 TF 的表达在血管性疾病中被上调并被不适当地表达于中膜及新生内膜。TF 在动脉粥样硬化的斑块中的表达增加，并且被一薄层的纤维帽将其与血液分隔，该纤维帽可以破裂并暴露 TF。例如球囊血管成形术、支架植入或动脉内膜切除术的外科手术破坏血管壁并暴露出其下的 TF。在动脉粥样硬化的、富脂薄壁的斑块中，自发性破裂或内皮侵蚀造成 TF 的暴露和血栓形成，引起不稳定型心绞痛和心肌梗死。TF 可以在细胞来源的微粒中循环，在不稳定型心绞痛中循环 TF 的水平是增高的，这说明这种循环 TF 可以引起血栓形成(Soejima, H. et al. (1999) *Circulation* 99 (22): 2908-2913)。癌症通常与高凝状态相关，这是因为 TF 在肿瘤细胞上的过度表达，这使得肿瘤患者容易发生深静脉血栓形成，肺栓塞和低度弥漫性血管内凝血（“DIC”）。DIC 造成了引起多器官衰竭的微血管纤维素的沉积。

靶向 TF 的基于蛋白质的抗凝剂包括 TF 中和抗体、活性位点抑制因子 VIIa(“FVIIai”)、组织因子途径抑制物(“TFPI”)以及线虫抗凝蛋白(“NAPC2”)。来自血栓形成的急性动脉损伤模型的结果表明基于蛋白的 FVIIa/TF 抑制剂是有效的抗血栓物质，而且与肝素、直接凝血酶抑制物、血小板抑制物和 FXa 抑制物比较，它的出血更少(Himber, J. et al. (2001) *Thromb. Haemost.* 85: 475-481; Harker, L. A. et al. (1995) *Thromb. Haemost.* 74(1): 464-472)。另外，FVIIa/TF 的抑制在预防球囊损伤后的新生内膜增厚以及血管狭窄上优于其它的抗凝剂(例如肝素，FXa 抑制物)(Jang, Y. et al. (1995) *Circulation* 92 (10): 3041-3050)。

在脓毒症的实验模型中，对 TF、FVIIa 或 FVIIa/TF 复合物的抑制是预防 DIC 和减少死亡率的有效的抗血栓方法。TFPI 类似物预防了兔的组织促凝血酶原激酶和内毒素所诱导的 DIC(Day, K. C. et al.

(1990) Blood 76 : 1538-1545; Bregengard, C. et al. (1993) Blood Coagul Fibrinolysis 4 : 699-706)。抗 FVIIa 单克隆抗体(Biamond, B. J. et al. (1995) Thromb. Haemost. 73: 223- 230)或(Levi, M. et al. (1994) J. Clin. Invest. 93: 114-120)预防了猴的内毒素所诱导的 DIC。在 E.coli 诱导的狒狒的脓毒症模型中, TF 中和抗体、FVIIai 和 TFPI 抑制了 DIC 并减少了死亡率(Creasey, A. A. et al. (1993) J. Clin. Invest. 91: 2850- 2860; Taylor, F. B. et al. (1991a) Blood 78 : 364-368; Taylor, F. B. et al. (1991 b) Circ. Shock 33 : 127-134; Taylor, F. B. (1996) Haemostasis Suppl. 126 : 83-91)。已知游离的 FXa 和 FVIIa/TF/FXa 复合物都诱导了与脓毒症患者的死亡率增加所相关的促炎性细胞因子的生成(Riewald, M. et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 7742-7747)。令人感兴趣的是, FVIIai 表明能降低狒狒模型中的血浆 IL-6 和 IL-8 的水平(Taylor, F. B. et al. (1998) Blood 91 : 1609-1615), 这说明 FVIIa/TF 抑制物可能具有其它抗凝机制所不具备的其它的抗炎作用。

一些能作为有效抗凝剂的并能结合并中和 TF 或 FVIIa/TF 复合物或这两者的抗体已经被描述(见, 例如, Carson, S. D. et al. (1985) Blood 66 (1) : 152-156; Tanaka, H. et al. (1985) Thromb. Res. 40 (6): 745-756; Kirchhofer, D. et al. (2000) Thromb Haemost. 84 (6): 1072-1081; Kirchhofer, D. et al. (2001) Biochemistry 40 (3): 675-682; Faelber, K. et al. (2001) J. Mol. Biol. 313: 83-97; 以及美国专利 Nos.5,506,134, 5,986,065 和 6,274,142)。本发明的 TF 靶向抗体是有效的抗凝剂, 它具有超出以往描述的 TF 抗体的改良的特性。特别的, 本发明的抗体与 FVIIa/TF 复合物的结合比与单独 TF 的结合具有更强的亲和力, 并且不与 FVII 或 FX 竞争性结合 TF。

发明简述

本发明提供了作用为抗凝剂的抗体, 其与因子 VIIa/组织因子

(FVIIa/TF)复合物的结合比与单独组织因子(TF)的结合的亲和力更高。在一个实施方案中,本发明的抗体在微量量热法测试中与FVIIa/TF复合物结合的亲和力比与单独TF的结合的亲和力至少高2倍。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体与FVIIa/TF复合物结合的亲和力比与单独TF的结合的亲和力至少高5倍。在一个更优选的实施方案中,本发明的抗体与FVIIa/TF复合物结合的亲和力比与单独TF结合的亲和力至少高10倍。在另一个实施方案中,本发明的抗体不与一种或多种选自由因子VII(“FVII”)、IX(“FIX”)和X(“FX”)组成的一组中的凝血因子竞争结合TF。在一个优选的实施方案中,本发明的抗体不与FVII以及FX竞争结合TF。在一个更优选的实施方案中,本发明的抗体与FVIIa/TF复合物结合的亲和力比与单独TF结合的亲和力更高且不与FVII及FX竞争结合TF。

本发明的抗凝血抗体在损伤部位靶向并结合FVIIa/TF复合物,以及抑制因子X(“FX”)的激活,从而阻止血栓形成,从而有效地作为治疗某些疾病的抗凝剂,这些疾病包括但不限于脓毒症、弥漫性血管内凝血、缺血性卒中、深静脉血栓形成、急性冠脉综合征、血管成形术后血栓并发症以及进行性的凝血病。另外,抗体也可应用于微血管手术、皮肤和静脉移植物,以及器官移植。

在另一个方面,本发明提供了包括目标抗体的药物组合物。

在另一个方面,本发明提供了一种预防患者血栓形成的方法,包括对上述患者施用治疗有效量的本发明的抗体,从而抑制凝血酶的形成而不直接影响其它的凝血参数,例如血小板的活化和聚集。

在另一方面,本发明涉及一种用于减少及治疗患者的深静脉血栓(“DVT”)或弥漫性血管内凝血(“DIC”)或急性冠脉综合征或具有凝血病表现的癌症的方法,包括对上述患者施用治疗有效剂量的本发明的抗体。

在另一方面,本发明涉及一种调节患者的炎症反应的方法,包括

对上述患者施用治疗有效剂量的本发明的抗体。

仍在另一方面,可用本发明的抗体在与血液接触的医学器械表面形成一层非成血栓性(thrombogenic)的包膜。

仍在另一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包含有与 FVIIa/TF 复合物结合的本发明的抗体。或者,该试剂盒可以包括编码抗体成分的 DNA 序列。

本发明还阐述了制备本发明的重组的及合成的抗体的方法。

附图说明

图 1. TF 结合单链抗体在 sTF/FVIIa 肽水解检测中的活性。依照 FVIIa 对 sTF 的亲和力 ($K_{D(app)} \sim 10$ nM), 如实施例 4 中所描述的, 利用 FVIIa (5nM) 和 sTF (10nM) 平衡混合液进行 sTF/FVIIa 肽水解检测。按所述监测显色肽底物 S2266 的水解。显示了细菌表达的单链抗体和对照蛋白 FVIIai(被氯甲基酮肽(chloromethylketone peptide)所失活的 FVIIa, PPACK) 及 Mab # 4504 (American Diagnostica) 的终浓度。

图 2. scFv(TF)3e10 与 sTF 的结合增加了 sTF 与 FVIIa 的表观亲和力(apparent affinity)。在有或无 800nM 细菌表达的 scFv(TF)3e10 时, 利用 2nM FVIIa 如实施例 4 中所述进行 sTF/FVIIa 肽水解检测。将 sTF 滴定到测定物并测定显色肽底物 S2266 的裂解速度。用标准 4-parameter fit 计算出 sTF 的表观 K_D 。

图 3. TF 结合单链抗体在凝血酶原时间(PT)检测中的活性。利用在磷脂小泡(phospholipid vesicle)中含有全长人 TF 的重组人组织促凝血激原激酶(Dade, Inc.) 如实施例 4 所述进行 PT 检测。显示了细菌表达的单链抗体以及对照蛋白 FVIIai 的终浓度。

图 4. scFv(TF)3e10 对 sTF 的表观结合亲和力的测定。利用 3nM sTF 和 2nM FVIIa 如实施例 4 中所述进行 sTF/FVIIa 肽水解检测。所

使用的 sTF 浓度低于与 FVIIa 结合的 K_D 。加入逐渐增加浓度的细菌表达的 scFv(TF)3e10, 并利用标准 4-parameter fit 用所增加的反应速度确定出该抗体对 sTF 的表观 K_D 。scFv(TF)3e10 对 sTF/FVIIa 复合物的亲和力($K_{D(app)} = 65 \text{ nM}$)要高于用 BIAcore 所测定的 scFv(TF)3e10 对 sTF 的亲和力($K_{D(app)} = 470 \text{ nM}$)。

图 5. scFv(TF)3e10 对 TF 和对 FVIIa/TF 复合物的结合亲和力的测定。利用在 CHO 细胞中所表达的 scFv(TF)3e10 如实施例 4 中所述进行微量量热法检测。该检测显示 scFv(TF)3e10 对 sTF/FVIIa 复合物(“复合物”)比对 sTF (“游离 TF”)具有高~20 倍的亲和力。

图 6. scFv(TF)3e10 剂量依赖性地抑制 FX 活化。利用逐渐增加浓度的细菌表达的 scFv(TF)3e10、250nM FX 以及磷脂表面的 FVIIa/TF 复合物(10 pM FVIIa)如实施例 4 中所示进行 FX 活化检测。IC₅₀ 代表达到 50%最大抑制所需的剂量。

图 7. scFv(TF)3e10 通过 FVIIa/TF 复合物非竞争性抑制 FX 活化。利用细菌表达的 scFv(TF)3e10、250nM 到 400nM FX 以及磷脂表面的 FVIIa/TF 复合物(10 pM FVIIa)如实施例 4 中所示进行 FX 活化检测。将逐渐增加浓度的 scFv(TF)3e10 滴定到测定物中(0 nM, 空心正方形; 0.25 nM, 空菱形; 0.74 nM, 空心三角形; 2.2 nM, 空圆形; 6.7 nM, 实心菱形; 20 nM, 实心三角形)。该 Lineweaver-Burk 曲线 ($1/[S]$, 其中 S(底物)=因子 X (μM); 对 $1/v$, 其中 v (速度) = 在 5 分钟间隔内所生成的 FXa 对 S2222 的水解的 mOD/min) 表明 scFv(TF)3e10 对于底物 FX 是非竞争性的抑制剂。预期相交在 (或邻近于) x 轴的所有线代表非竞争性抑制剂 (对于竞争性抑制剂, 所有线相交在 y 轴)。

图 8. scFv(TF)3e10 在弥漫性血管内凝血 (“DIC”) 的体内模型中是有效的。如实施例 6 中所述, 在兔的血栓栓塞模型中评价 CHO 细胞表达的 TF 抗体 scFv(TF)3e10 的 (A) 死亡率百分比, 以及 (B)

发病率-死亡率积分。(A)在载体治疗组,所用的 TF 剂量造成了 60% 的致死率 (LD_{60})。0.7nmol/kg scFv(TF)3e10 对死亡没有影响,但在 7.0nmol/kg 时将致死率减少到<40%。(B)在载体治疗组,体内剂量的 TF 造成的平均发病率-死亡率积分为 2.6。0.7nmol/kg scFv(TF)3e10 对死亡没有影响并对呼吸窘迫只有很小的或没有作用,但在 14nmol/kg 时,平均发病率-死亡率积分被减少到~1.5。

发明详述

本发明的抗凝血抗体是一种与因子 VIIa/组织因子 (FVIIa/TF) 复合物的结合比与单独组织因子 (TF) 的结合的亲和力更高的抗体。本发明的抗体与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比与单独结合 TF 的亲和力至少高 2 倍,优选至少高 5 倍,以及更优选至少高 10 倍。本发明的抗体也不与一种或多种选自因子 VII(“FVII”)、因子 IX(“FIX”)和因子 X(“FX”)组成的一组中的凝血因子竞争结合 TF。优选地,本发明的抗体不与 FVII 及 FX 竞争结合 TF。

定义:

在描述本发明时,如下定义下面的术语。

“重组蛋白或多肽”指通过重组 DNA 技术生成的蛋白或多肽,即从被编码所需多肽的外源性 DNA 构建体所转化的微生物或哺乳动物细胞所生成的蛋白或多肽。在大多数的细菌培养物中表达的蛋白或多肽不带聚糖。在酵母中表达的蛋白或多肽可能有着不同于在哺乳动物细胞中所表达的糖基化形式。

“天然”蛋白或多肽指从天然存在的资源中回收的蛋白或多肽。术语“天然抗体”包括天然存在的抗体及其片段。

DNA “编码序列”为当置于适当调节序列的控制下在宿主细胞中能被转录成 mRNA 并翻译成多肽的 DNA 序列。编码序列的范围由 5'-N-末端的起始密码子以及 3'-C-末端的翻译终止密码子确定。编码序

列可以包括原核序列、来自真核 mRNA 的 cDNA、来自真核 DNA 的基因组 DNA 序列以及合成的 DNA 序列。转录终止序列通常位于编码序列的 3'端。

“核苷酸序列”是脱氧核糖核苷酸（碱基腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶或胞嘧啶）的杂聚物。用源自合成 cDNA 的 DNA 片段以及短寡核苷酸接头（linker）可以装配成编码本发明的抗体的 DNA 序列，并生成一个能在重组表达载体中表达的合成基因。在讨论特殊的双链 DNA 分子的结构时，根据只给定 cDNA 的非转录链的 5'到 3'方向的序列的正常惯例来描述序列。

“重组表达载体”是用于扩增或表达编码本发明的抗体的 DNA 的可复制的 DNA 构建体。一个表达载体含有 DNA 控制序列和编码序列。DNA 控制序列包括启动子序列、核糖体结合位点、聚腺苷酸化信号、转录终止序列、上游调节结构域以及增强子。本文所定义的重组表达系统将在调节元件的诱导下表达抗体。

“转化的宿主细胞”指已经被外源 DNA 转化和转染的细胞。外源 DNA 可以是或可以不是整合到（共价连接于）构成细胞基因组的染色体 DNA。例如在原核细胞和酵母中，外源 DNA 可以保持于例如质粒的附加型元件（episomal element）中或稳定地整合到染色体 DNA 中。对于真核细胞，稳定的转化细胞是外源 DNA 已经整合到染色体复制体的细胞。通过真核细胞株或克隆生成含有外源 DNA 的子代细胞群的能力来验证这种稳定性。

当提及本发明的抗体时，如下面进一步描述术语“类似物”、“片段”、“衍生物”和“变体”指基本上保留有相同的生物学功能或活性的抗体的类似物、片段、衍生物和变体。

“类似物”包括其内包括有本发明的抗体的氨基酸序列的多肽原（pro-polypeptide）。通过天然的体内方法或通过例如酶或化学降解的本领域熟知的方法可以将本发明的活性抗体和构成前抗体

(pro-antibody) 分子的其它氨基酸分离开来。例如, 重组 scFV (TF)3e10 多肽(SEQ ID NO: 1)被表达为 282 个氨基酸的多肽原, 然后其在体内被处理释放出 264 个氨基酸的活性的成熟多肽。

“片段”为基本上保留了相似的功能活性的抗体的一部分, 如下面进一步描述的本文阐述的体外检测中所显示的。

“衍生物”包括对本发明的抗体的所有的修饰物, 其基本上保留了本文所阐述的功能并包括其它的结构和附加功能, 例如 PEG 化抗体具有更长的半衰期, 以及生物素化抗体, 如下进一步描述。衍生物也包括 N-或 O-连接的糖基化抗体, 其可以利用标准的重组 DNA 技术通过将 N-或 O-糖基化位点插入到抗体序列中生成。

“基本上相似的功能活性”以及“基本上相同的生物学功能或活性”都意味着当用相同的方法或检测法确定每个多肽的生物学活性时, 生物学活性的程度是被比较的多肽所表现出的生物学活性约 30% 到 100%或更多。例如, 具有与实施例 1 的抗体(SEQ ID NO: 1)基本上相似的功能活性的抗体为当在实施例 4 所述的 TF/FVIIa 肽水解及 FX 活化检测时表现出结合并中和 FVIIa/TF 复合物的能力的抗体。

确定两个多肽之间的“相似性”通过将一個多肽的氨基酸序列及其保守氨基酸取代与第二个多肽序列进行比较来确定。这些保守取代包括在 The Atlas of Protein Sequence and Structure 5 by Dayhoff (1978) 和 Argos (1989) EMBO J. 8: 779-785 中所描述的取代。例如, 属于下面组之一的氨基酸表示着保守变化:

- Ala、Pro、Gly、Gln、Asn、Ser、Thr;
- Cys、Ser、Tyr、Thr;
- Val、Ile、Leu、Met、Ala、Phe;
- Lys、Arg、His;
- Phe、Tyr、Trp、His; 及
- Asp、Glu。

本文“抗体”包括完整的免疫球蛋白(“Ig”)分子,及其片段,例如 Fab、F(ab')₂ 和 Fv,其能结合于所选的靶向蛋白的一个抗原表位,例如可溶性 TF(“sTF”)。典型地,形成一个表位需要至少 6、8、10 或 12 个连续的氨基酸。然而,涉及非连续氨基酸的表位可能需要更多的,例如至少 15、25 或 50 个氨基酸。

本文所用的所有其它技术术语和本发明所属领域的技术人员通常所使用的术语具有相同的含义。

本发明的抗体及其产生:

本发明的抗凝血抗体与因子 FVIIa/组织因子(FVIIa/TF)复合物的结合比与单独组织因子(TF)的结合的亲和力更高。在一个优选的实施方案中,如在微量量热法检测中所测定的,本发明的抗体与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比与单独 TF 结合的亲和力至少高 2 倍,更优选至少高 5 倍,以及更优选至少高 10 倍。在另一个本发明的优选的实施方案中,所述抗体也不与一种或多种选自由因子 VII (“FVII”)、IX(“FIX”)和 X(“FX”)组成的一组中的凝血因子竞争结合 TF。在一个更优选的实施方案中,本发明的抗体不与 FVII 及 FX 竞争结合 TF。在一个最优选的实施方案中,本发明的抗体与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比单独结合 TF 的更高并不与 FVII 及 FX 竞争结合 TF。

一般来说,在免疫化学检测法中,特异结合于一种所选的靶向蛋白(例如, FVIIa/TF 复合物或 TF)的抗体所提供的检测信号比其它蛋白所提供的检测信号至少高 5、10 或 20 倍。优选地,与所选的靶向蛋白特异结合的抗体在免疫化学检测中不能检测出其它蛋白,并可以从溶液中免疫沉淀出靶向蛋白。

可以用所选的靶向蛋白免疫哺乳动物,如小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴或人以生成多克隆抗体。如果需要,可以将靶向蛋白缀合到载体蛋白上,例如牛血清白蛋白、甲状腺球蛋白以及匙孔血蓝蛋白。根据宿

主的物种，可以用不同的佐剂增强免疫反应。这些佐剂包括但不限于 Freund 佐剂、无机胶（例如氢氧化铝）、表面活性物质（例如溶血卵磷脂、pluronic 多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔血蓝蛋白和二硝基苯酚）。在应用于人的佐剂中，BCG（卡介苗）和小棒杆菌（*Corynebacterium parvum*）是特别有用的。

利用任何能通过培养连续细胞株生产抗体分子的技术可以制备与所选的靶向蛋白特异性结合的单克隆抗体。这些技术包括但不限于杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术以及 EBV 杂交瘤技术(Kohler et al. (1985) *Nature* 256: 495-497; Kozbor et al. (1985) *J. Immunol. Methods* 81: 31-42; Cote et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030; 和 Cote et al. (1984) *Mol. Cell Biol.* 62: 109-120)。

此外，可以使用生成“嵌合抗体”所发展的技术，将鼠抗体基因剪接到人抗体基因中并获得具有适宜的抗原特异性和生物学活性的分子(Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6851-6855; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312: 604-608; Takeda et al. (1985) *Nature* 314: 452-454)。单克隆和其它抗体也可以被“人源化”以阻止患者在治疗性应用抗体时触发针对该抗体的免疫反应。这些抗体与直接应用的人抗体在序列上是足够相似的或可能需要改变一些关键的残基。通过用单个残基的定点突变取代不同于人序列的残基或通过移植完整的互补决定区可以将啮齿动物抗体和人序列之间的序列差异最小化。或者，利用如 GB2188638B 所述的重组方法可以生成人源化抗体。与所选的靶向蛋白特异结合的抗体可以含有部分或完全人源化的抗原结合位点，如在美国专利 5,565,332 中所述。

或者，利用本领域已知的方法可以采用所述用于生产单链抗体的技术生产与所选的靶向蛋白特异结合的单链抗体（“scFv”）。通过从随机组合 Ig 文库的链替换（chain shuffling）可以生成具有相对特异性但不同独特型组成的抗体(Burton (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

88: 11120-11123)。

利用例如 PCR 的 DNA 扩增方法用杂交瘤 cDNA 做为模板也可以构建单链抗体(Thirion et al (1996) Eur. J. Cancer Prev. 5: 507-511)。单链抗体可以是单或双特异性的, 以及可以是二价或四价的。例如, 在 Coloma and Morrison (1997) Natl. Biotechnol. 15: 159-163 中说明了四价、双特异单链抗体的构建。在 Mallendar and Voss (1994) J. Biol. Chem. 269: 199-216 中说明了二价、双特异单链抗体的构建。

利用人工或自动的核苷酸合成可以构建编码单链抗体的核苷酸序列, 利用标准的重组 DNA 方法可以将核苷酸序列克隆进表达构建体中, 并将其导入到细胞内表达编码序列。或者, 用例如丝状噬菌体展示技术可以直接生成单链抗体(Verhaar et al. (1995) Int.J.Cancer 61: 497-501; 和 Nicholls et al. (1993) J. Immunol. Meth. 165: 81-91)。

如文献中所阐述的, 通过诱导淋巴细胞群的体内生产或筛选 Ig 库或高度特异结合试剂组 (panel) 也可以生成与所选的靶向蛋白特异结合的抗体(Orlandi et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833-3837; Winter et al. (1991) Nature 349: 293-299)。

用任何本领域技术人员已知的克隆方法可以以 cDNA 或基因组的形式克隆出编码本发明的抗体的 DNA。见例如, Sambrook, J. F. et al. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989), 在此并入参考)。

对于所述抗体是单克隆抗体的情况, 一旦识别出编码 Fv 区域的 DNA 序列, 当 Fv 序列被表达时, 其表现出特异的结合活性, 用本领域技术人员已知的方法可以制备包含该 Fv 区域的抗体。因此, 例如 Chaudhary, V. K. et al. (1989) Nature 339 (6223): 394-397; Batra, J. K. et al. (1990) J. Biol. Chem. 265 (25): 15198-15202; Batra, J. K. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (21): 8545-8549; Chaudhary, V. K. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (3): 1066-1070, 在此一同并入参

考，它们描述了对多种单链抗体蛋白的制备。

在一个优选的方案中，本发明的 TF 结合抗体是利用噬菌体展示文库制备的单链抗体。单链抗体的表位结合区域由两个可变区域结构域构成：一个来自重链以及另一个来自轻链。在构建噬菌体展示文库的第一个步骤中，利用一组家族特异性引物从人骨髓、淋巴结和脾脏的合并的 mRNA (pooled mRNA) 中 PCR 克隆出可变区基因 (V_H (来自 IgM)、 V_K 和 V_L)。所得的 pCITE- V_H (3.8×10^9 个)、pZ604- V_K (1.6×10^7) 和 pZ604- V_L (3.2×10^7) 文库代表了永久性及其高多样性的 V 基因。从 pCITE- V_H 文库中扩增出 V_H 基因。从 pZ604- V_K 和 pZ604- V_L 文库中 PCR 扩增出在 5' 末端具有反向 J_H 和接头序列的 V_K 和 V_L 基因。然后将凝胶纯化的含有 V_H 、 V_K 和 V_L 的 PCR 产物一起剪接生成 scFv 基因库 (gene repertoire)。将 scFv 基因库克隆进噬粒载体 pZ603，并将连接产物电穿孔到感受态 TG1 大肠杆菌 (E.coli) 细胞中生成具有 5.2×10^9 个转化体的 scFv 噬菌体展示文库 HuPhabL3 (Kay, B. K. et al. (1996) *Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual*, Academic Press, San Diego CA; Marks, J. D. et al. (1991) *J. Mol. Biol.* 222 (3): 581-597; Sheets, M. D. et al. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (11): 6157-6162)。

从 scFv 噬菌体展示文库中选择并扩增 TF 结合噬菌体，然后用本领域熟知的淘选技术进行鉴定。将可溶性 TF 固定于塑料管内，可用无脂奶粉减少与塑料的非特异性结合。将 scFv 噬菌体群暴露于塑料管内所固定的 sTF，并充分洗涤以除去未结合的噬菌体。从塑料管中洗脱出 TF 结合 scFv 噬菌体，然后在溶液内通过感染 TG1 大肠杆菌细胞进行扩增。重复该淘选过程三次，并通过转化 TG1 细胞分离出所得到的 TF 结合 scFv 噬菌体。用将 sTF 固定于塑料的 96 孔皿使用标准的 ELISA 表达 TF 结合抗体的转化体。测序 ELISA 阳性转化体的单链抗体插入体的 DNA。根据 DNA 测序，在此鉴定出 6 种独特的

单链抗体, scFv(TF)2c1、scFv(TF)2c11、scFv(TF)2d3、scFv(TF)2h6、scFv(TF)3e10 和 scFv(TF)3h2, 将其表达并从大肠杆菌中纯化出来, 以及如实施例 5 中所述将其特征化。

本发明抗体的表达和纯化:

体外表达本发明重组抗体的方法, 包括大肠杆菌、杆状病毒、酵母、哺乳动物细胞或其它表达系统。在细菌内表达所克隆的基因的方法是熟知的。为了在原核系统内得到所克隆的基因的高水平表达, 必须要构建至少要含有指导 mRNA 转录终止的强启动子的表达载体。适合于这个目的的调节区域的实例为大肠杆菌的色氨酸生物合成途径的大肠杆菌 β -葡萄糖苷酶基因的启动子和操纵子区域, 或 λ 噬菌体的左侧启动子。在转化大肠杆菌的 DNA 载体内包含选择标记是有用的。这些标记的实例包括特异抗氨卡青霉素、四环素或氯霉素的基因。

从能用于表达本发明抗体及其类似物、片段、衍生物或变体的更高级的真核细胞系统中可选择出多种细胞系统。所列举的哺乳动物细胞株包括但不限于 RPMI 7932、VERO 和 HeLa 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞株、W138、BHK、COS-7、C127 或 MDCK 细胞株。一个优选的哺乳动物细胞株是 CHL-1。当使用 CHL-1 时, 所含的潮霉素作为真核选择标记。CHL-1 细胞来源于 RPMI 7032 黑素瘤细胞, 这是一种容易获得的人细胞株。根据布达佩斯条约约定, CHL-1 细胞株已经于 1987 年 6 月 18 日被保藏于 ATCC, 保藏号#CRL 9446。在本发明中适合使用的细胞可从 ATCC 商业化获得。所列举的细胞株包括草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 和家蚕 (*Bombyx mori*)。

原核系统大肠杆菌不能进行翻译后修饰, 例如糖基化。另外, 当具有复杂二硫键形式的蛋白在大肠杆菌中表达时, 蛋白经常地被错误地折叠。在原核系统中, 所表达的蛋白或以所谓的包涵体的非可溶性形式存在于细胞质中, 发现于在细胞裂解后的可溶性组分中, 或通过添加适宜分泌信号序列被直接地分泌到周质中。如果所表达的蛋白

位于非可溶的包涵体内,那么通常需要对包涵体进行可溶性化以及之后的再折叠。

本领域技术人员已知许多原核表达载体,如 pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)、pKK233-2 (Clontech, Palo Alto, CA, USA)和 pGEM1(Promega Biotech, Madison, WI, USA),这些都是可商业化获得的。

在重组微生物表达系统中常用的启动子包括 β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(Chang, A. C. et al. (1978) Nature 275 (5681): 617-624; Goeddel, D. V. et al. (1979) Nature 281 (5732): 544-548)、色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, D. V. et al. (1980) Nucl. Acids Res. 8 (18): 4057-4074)以及 tac 启动子(Maniatis, T. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982))。另一种有用的细菌表达系统采用了 λ 噬菌体 pL 启动子和 clts857 热诱导阻抑物(Bernard, H. U. et al. (1979) Gene 5(1): 59-76; Love, C. A. et al. (1996) Gene 176 (1-2): 49-53)。也可以在例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的酵母宿主中表达重组抗体。这通常具有进行各种翻译后修饰的能力。所表达的抗体可以被分泌到没有许多其它蛋白质存在的培养上清中,使得纯化更为容易。用于表达本发明抗体的酵母载体具有某些必需的特性。载体的元件通常来源于酵母和细菌,以容许质粒在两者中扩增。细菌元件包括复制起点以及选择标记。酵母元件包括复制序列起点(ARS)、选择标记、启动子和转录终止子。

在酵母载体中用于表达的适宜启动子包括 TRP1 基因、ADHI 或 ADHII 基因、酸性磷酸酶(PH03 或 PH05)基因、异细胞色素(isocytochrome)基因启动子或糖酵解途径中所包含的启动子,例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GADPH)、3-磷酸甘油酸激酶(PGK)、己糖激酶、丙酮酸激酶、丙糖磷酸异构酶和磷酸葡萄糖异构酶启动子(Hitzeman, R. A. et al. (1980) J. Biol. Chem. 255 (24): 12073-12080;

Hess, B. et al. (1968) J. Adv. Enzyme Reg. 7: 149-167; 和 Holland, M. J. and Holland, J. P. (1978) Biochemistry 17 (23): 4900-4907)。

商业化可获得的酵母载体包括 pYES2、pPIC9 (Invitrogen, San Diego, CA)、Yepc-pADH2a、pYcDE-1 (Washington Research, Seattle, WA)、pBC102-K22(ATCC#67255)和 YpGX265GAL4 (ATCC# 67233)。可以采用包括但不限于 COS-7、L 细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa、BHK、CHL-1、NSO 和 HEK293 的哺乳动物细胞株表达本发明的重组抗体。在哺乳动物细胞内生成的重组蛋白质正常地是可溶的并被糖基化的, 以及具有真实的 N 末端。哺乳动物表达载体可以包括非转录元件, 如复制起点、启动子和增强子以及 5'或 3' 非翻译序列, 如核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、受体位点和剪接供体以及转录终止序列。在哺乳动物表达载体中所用的启动子通常是例如病毒启动子, 如多形瘤、腺病毒、HTLV、猿猴病毒 40 (SV40) 和人巨细胞病毒 (CMV)。

根据所选择的表达系统以及宿主, 通过使用不同组合的用于蛋白质纯化的传统层析可以获得均一的重组抗体。这些层析包括: 免疫亲和层析、反相层析、阳离子交换层析、阴离子交换层析、疏水作用层析、凝胶过滤层析以及 HPLC, 如果表达系统将抗体分泌到生长培养基中, 就可以从培养基中直接纯化蛋白质。如果抗体是非分泌的, 就从细胞裂解物中分离。用任何传统的方法包括冻融循环、超声波、机械裂解或使用细胞裂解试剂, 可以进行细胞裂解。

将基于 pCANTAB5 (Pharmacia) 的质粒构建体用于本发明单链抗体的细菌表达。例如, 含有单链抗体 scFV(TF)3e10 的质粒为 pZ612/3e10, 它编码附有 e-tag 序列的单链抗体序列, e-tag 序列可用于纯化蛋白。scFV(TF)3e10 抗体的氨基酸序列对应于 SEQ ID NO: 1 (实施例 1), 以及编码 scFV(TF)3e10 的 DNA 序列对应于 SEQ ID NO: 2。

将基于 pTHR525 的质粒构建体（见美国专利 No.5,827,824）用于本发明单链抗体的哺乳动物表达。例如，设计引物使得在细菌表达质粒内生成横跨 pro-scFv(TF)3e10 氨基酸序列的 DNA 片段，包括 N 末端信号序列以及 C 末端 e-tag 序列。进行 PCR 生成插入到哺乳动物表达质粒内的 DNA 片段，其含有氨苄青霉素抗性基因以及潮霉素和 DHFR 选择标记。用 MPSV LTR 启动子驱动本发明单链抗体的表达。

在本发明的一个优选的实施方案中，用哺乳动物表达构建体转染 CHO DXB11 细胞。用 400 μ g/ml 潮霉素 B 的 HAMS/F12 培养基选择稳定群。表达水平大约 500 μ g/L。为了增加表达水平，用 100nM 氨甲蝶呤的 α MEM 培养基选择群。该群的大约表达水平是 5mg/L。

可以用本领域熟知的方法纯化本发明的抗体。例如，通过流过结合有 TF 的柱可以亲和纯化抗体。然后用具有高浓度盐的缓冲液可以将结合 TF 的抗体从柱上洗脱下来。

本文所述的单链抗体在蛋白质的 C 末端含有 e-tag 序列。抗 e-tag 亲和柱购自 American/Pharmacia Biotech。用 0.22 μ m 滤膜滤过细胞培养基，并以 2ml/min 速度装入到 5ml 的 e-tag 柱中。用 0.2M 磷酸缓冲液 0.05%NaN₃，pH 7.0 冲洗柱，然后收集到含有 0.1 体积的 1M Tris 缓冲液，pH8.2 的试管内以中和洗脱缓冲液。或者，将滤过后的培养基装入到蛋白质 A 柱中。在这种情况下，用 50mM 柠檬酸，300mM NaCl，pH 6.5 洗涤柱子并用 pH3.0 的相同缓冲液洗脱。在两种情况中，之后都将纯化的样品装入到 Sephadex 200 柱中，将抗体的单体与二聚体形式分离开来。

本发明抗体的选择：

一旦抗体被生成、表达以及纯化，为了鉴定本发明的抗体，可以用实施例 4 中所述的 BIAcore、sTF 依赖性因子 VIIa 检测（sTF/FVIIa 肽水解检测）、FX 活化检测以及 PT 检测进一步地将抗体特征化。

在本发明的一个优选的实施方案中，用 TF/FVIIa 肽水解检测选

择以比单独结合 TF 更高的亲和力与 FVIIa/TF 复合物结合的 TF 结合 scFv 抗体。在这个检测中, 预计与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比与 TF 结合的更高的 TF 抗体能增加 $K_{D(app)}$ 。图 2 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 增加 $K_{D(app)}$ 约 5 倍。用微量量热法检测测定与单独结合 TF 相比, TF 抗体对 FVIIa/TF 复合物的亲和力。图 5 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 与 FVIIa/TF 复合物以及游离 TF 结合的 K_D 分别是 600nM 和 33nM, 这对应的是与单独结合 TF 比较, 抗体与 FVIIa/TF 复合物具有高大约 20 倍的亲和力。本发明的抗体对 FVIIa/TF 复合物比对 TF 有高至少 2 倍、优选至少 5 倍以及更优选至少 10 倍的亲和力。

用 sTF/FVIIa 肽水解检测选择出不与 FVII 竞争结合 TF 的 TF 结合 scFv 抗体。在这个检测中, 预计与 FVIIa 竞争结合 TF 的 TF 抗体能抑制显色底物 S2266 的水解。图 1 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 没有抑制并且事实上增加了 FVIIa 活性。

用 PT 检测和 FX 活化检测选择出抑制 FX 活化的 TF 结合 scFv 抗体。在 PT 检测中, 预计延长 PT 的 TF 抗体能抑制 FX 活化。图 3 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 延长了 PT, 这说明该抗体抑制了 FX 活化。在 FX 活化检测中, 预计抑制 FXa 活性的 TF 抗体能抑制显色底物 S2222 的水解。图 6 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 抑制了 FXa 活性。

用 FX 活化检测选择出不与 FX 竞争结合 TF 的 TF 结合 scFv 抗体。在这个检测中, 预计不与 FX 竞争的 TF 抗体能不依赖所应用的 FX 浓度抑制 FX 活化。图 7 显示单链抗体 scFv(TF)3e10 以 FX 浓度非依赖性方式抑制 FXa 活性。

在本发明的一个优选的实施方案中, 鉴定出的单链抗体 scFv(TF)3e10 具有对 TF 的单个 V_H/V_L 结合位点。scFv(TF)3e10 的氨基酸序列显示在实施例 1 中并对应于 SEQ ID NO: 1。编码 scFv(TF)3e10 的 DNA 序列对应于 SEQ ID NO: 2。

本发明抗体的类似物、片段、衍生物以及变体：

本发明抗体的类似物、片段、衍生物或变体可以是：(i) 其中一个或多个氨基酸残基被一个保守或非保守氨基酸残基（优选保守氨基酸残基）所取代，以及这些取代的氨基酸残基可以是或可以不是遗传密码子所编码的；或(ii) 其中一个或多个氨基酸残基包括一个取代基团；或(iii) 其中成熟的抗体与另外一种化合物融合，例如一种提高抗体的半衰期的化合物（例如聚乙二醇）；或(iv) 其中另外的氨基酸被融合进成熟的抗体中，例如前导或分泌序列或用于纯化成熟抗体的序列。这些类似物、片段、衍生物和变体被认为根据本说明是在本领域技术人员的范围内。

优选地，本发明的衍生物将包含在一个或多个预定的，优选非必需氨基酸残基上进行的保守氨基酸取代(下面进一步定义)。“非必需”氨基酸残基是在野生型蛋白质的序列上可以被改变但不改变生物学活性的残基，其中“必需”氨基酸对于生物学活性是必需的。“保守氨基酸取代”是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基所取代。在本领域已经识别了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、具有酸性侧链的氨基酸（例如，天冬氨酸，谷氨酸）、具有非带电荷的极性侧链的氨基酸（例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、具有非极性侧链的氨基酸（例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸）、具有 β 分支侧链的氨基酸（例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）以及具有芳香族侧链的氨基酸（例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。对保守氨基酸残基或对于在保守蛋白质结构域内的氨基酸残基不能进行非保守取代，除非进行所述取代是为了选择变体抗体，如下进一步描述。片段或生物学活性部分包括适于用作药物、研究试剂等的多肽片段。片段包括包含足够类似于或衍生自本发明抗体的氨基酸

序列的氨基酸序列并表现出多肽的至少一种活性的肽，但其包括比本文所述的全长多肽更少的氨基酸。

另外，本发明优选的衍生物包括已经与另一种化合物融合的成熟抗体，例如这种化合物可以提高多肽的半衰期和/或减少多肽潜在的免疫原性（例如，聚乙二醇，“PEG”）。PEG 可用于增加水溶性、大小、减慢肾脏清除（kidney clearance）率以及减少对抗体的免疫原性。见例如美国专利 6,214,966。对于 PEG 化，利用本领域技术人员已知的任何方法都可以完成抗体与 PEG 的融合。例如，首先通过将一个半胱氨酸突变引入到抗体内，随后通过 PEG-马来酰亚胺的位点特异性衍生可以完成 PEG 化。可以将半胱氨酸添加到肽的 C 末端，见例如 Tsutsumi et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (15): 8548-8553。可以对抗体进行的另一个修饰涉及生物素化。在某些情况下，将抗体生物素化可能是有用的，使得它容易与链霉亲和素相互作用。蛋白生物素化的方法在本领域是熟知的。此外，可以将 N-或 O-糖基化位点引入到抗体序列中，使得体内可以进行抗体的转录后 N-或 O-连接的糖基化。

本发明抗体的变体包括具有与原始抗体的氨基酸序列足够相似的氨基酸序列的多肽。术语“足够相似”指相对于第二个氨基酸序列，第一个氨基酸序列含有足够的或最小数目的相同或等价的氨基酸残基，使得第一个和第二个氨基酸序列具有共同结构域和/或共同的功能活性。例如，本文将含有至少约 45%，优选约 75%到 98%相同的共同结构域的氨基酸序列定义为足够相似。优选地，变体与本发明优选的抗体的氨基酸序列足够相似。变体包括在严格条件下与本发明的多核苷酸或其互补物杂交的多核苷酸所编码的抗体变体。这些变体通常保留了本发明抗体的功能活性。可以用多核苷酸的片段文库生成用于筛选和随后选择的片段的多样化群（variegated population）。例如，在其中每分子只发生约 1 次缺口的条件下，通过

用核酸酶处理多核苷酸的双链 PCR 片段,变性双链 DNA 和复性 DNA 形成可以形成包括来自不同缺口产物的有义/反义对的双链 DNA、通过用 S1 核酸酶处理从新形成的双链体中去除单链部分并将所生成的片段文库连接到表达载体中从而可以生成片段文库。通过这个方法,可以生成编码本发明抗体的不同大小的 N 末端和内部片段(internal fragment)的表达文库。

变体包括因为诱变而在氨基酸序列上有所不同的抗体。例如,根据本领域熟知的重组 DNA 技术可以进行诱变以修饰 Ig 轻链和重链的 V_L 及 V_H 结构域以生成变体,该变体与 FVIIa/TF 复合物的结合比与游离 TF 的结合具有更高的结合亲和力。特别优选的变体包括在 V_L 和 V_H 结构域的互补决定区内进行修饰的抗体。

变体还包括因诱变引起的氨基酸残基的插入或缺失而在氨基酸序列上有所不同的抗体。例如,根据本领域熟知的重组 DNA 技术可以进行诱变以在 Ig 轻链和重链的 V_H 或 V_L 结构域的 N-末端或 C-末端部分插入或缺失氨基酸以生成保持了基本上相似的功能活性的变体。特别优选的变体包括在 V_H 和 V_L 结构域之间的 V_H - V_L 接头内插入或缺失氨基酸残基的单链抗体。实施例 1 中所描述的单链抗体中的 V_H - V_L 接头序列的长度为 5 个氨基酸残基。显而易见的是也可以使用其它的从 0 到 20 个氨基酸长度的短的接头序列,其中抗体保留了基本上相似的功能活性。对现有的 V_H - V_L 接头的修饰可以针对于提高二聚体形式的单链抗体的稳定性。

在一个实施方案中,通过在核酸水平的组合诱变生成变体的多样化文库(variegated library)并通过多样化基因文库将其编码。例如通过将合成寡核苷酸的混合物酶连接到基因序列使得潜在的变体氨基酸序列的简并组(degenerate set)表达为独立的多肽,或一组含有一组在此的序列的更大的融合蛋白质(例如噬菌体展示),这样可生成变体的多样化文库。有多种方法可用于从简并寡核苷酸序列生成潜在

变体文库。可以在自动 DNA 合成仪中进行简并基因序列的化学合成,然后将合成基因连接到合适的表达载体中。应用基因的简并组可以提供编码所需的潜在变序列组的所有序列的混合物。合成简并寡核苷酸的方法在本领域是已知的(见,例如 Narang (1983) Tetrahedron 39: 3; Itakura et al. (1984a) Annu. Rev. Biochem. 53: 323; Itakura et al. (1984b) Science 198: 1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11: 477)。

在本领域已知有一些技术可用于筛选通过点突变或截短所形成的组合文库的基因产物,以及用于筛选 cDNA 文库的具有所选择的性能的基因产物。这些技术适于快速筛选通过抗体的组合诱变所形成的基因文库的 TF-或 FVIIa/TF 复合物结合活性或 FX 活化抑制活性。通常用于筛选大基因文库的最广泛使用的能进行高通量分析的技术典型地包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所形成的载体文库转化合适的细胞并在对所需活性的检测有助于分离编码所检测的产物的基因的载体的条件下表达组合基因。递归整体诱变(recursive ensemble mutagenesis, REM),一种增强文库内功能性突变频率的技术,可以和筛选检测一起用于鉴定所需的变体。

实施例 1 描述了一个 TF 结合单链抗体 scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO: 1)的氨基酸序列,并描绘了 V_H-V_L 接头以及 V_H 和 V_L 结构域。利用实施例 4 中所描述的 sTF/FVIIa 肽水解或 FX 活化检测通过筛选本发明抗体的例如插入、截短或点突变的突变体组合文库可以鉴定具有 TF 或 FVIIa/TF 复合物结合活性或抑制 FX 活化的变体。本发明抗体包括实施例 1 和 3 的抗体(SEQ ID NOs: 1 和 3),以及那些在序列上与它们有着非实质性差异的抗体。“非实质性差异”包括基本上保持了本发明抗体的至少一种生物学功能,例如抑制 FX 活化的能力的任何的序列、取代或缺失变体。这些功能等价物可以优选包括与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 的单链抗体的 V_L 或 V_H 区域结构域有着至少约 90%相同性的抗体,以及更优选与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID

NO: 3 的单链抗体的 V_L 或 V_H 区域结构域有着至少 95% 的相同性, 以及仍更优选与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 的单链抗体的 V_L 或 V_H 区域结构域有着至少 97% 的相同性, 以及还包括这些具有基本上相同的生物学活性的抗体的部分。然而, 本发明说明书中包括的表现出如本文进一步描述的功能等加性的在氨基酸序列上具有与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 的抗体非实质性差异的任何抗体。

药物组合物:

本发明还提供了能给予患者以达到治疗作用的药物组合物。通过组合具有所需纯化程度的本发明抗体以及药物治疗有效量的生理可接受的载体可以制备用于施用的本发明的药物组合物。

本发明抗体可以用于进行静脉内给药或皮下给药或鞘内 (intrathecal) 给药的药物组合物。因此, 上述抗体优选与可接受的无菌药物载体组合, 如 5% 葡萄糖、乳酸林格液、生理盐水、无菌水或设计用于静脉内注入的其它任何商业化制备的生理性缓冲溶液。可以理解, 载体溶液和组合物的剂量及给予的选择会因为治疗对象和特殊的临床背景的不同而有所不同, 并为标准的医学操作所决定。

根据本发明的方法, 可以给予有效量的这些药物组合物抑制对象中与凝血酶的过度生成相关的病理性后果。

可以丸式静脉内注射 (bolus intravenous injection)、持续静脉内注射或联合两种途径施与抗体。或者, 或另外, 可以从肌内部位将与适宜的赋形剂相混合的抗体带入到循环中。通过测定取自患者的一系列血液样本的活化部分促凝血酶原激酶时间 (activated partial thromboplastin time, PT) 可以监测抗体的全身治疗。当抗体在循环中达到了足够的水平时, 在这个检测中观察到凝血时间延长了。

本发明的重组抗体和药物组合物可用于肠外、局部、静脉内、口服或局灶给药。依照给药的方法, 可以以多种单位剂量的形式给予药物组合物。例如, 可以以包括但不限于片剂、胶囊、粉末、溶液和乳

剂的形式给予单位剂量形式。

本发明的重组抗体和药物组合物对于静脉内给药是特别有效的。用于给药的组合物常包括溶解于药物可接受的载体，优选水溶液载体中的单链抗体溶液。可以使用多种水溶液载体，例如缓冲盐水等等。这些溶液是无菌的并且通常不含非所需的物质。可以用传统的、熟知的消毒技术消毒组合物。

本领域技术人员可以轻易地确定用于静脉内给药的常用的药物组合物。给予的量明显是蛋白质特异性的并且依赖于它的疗效以及药物动力学的情况。用于制备肠外给予的组合物实际方法对于本领域技术人员是已知的或显而易见的，并且在例如 Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa (1980)的出版物中被更为详细地描述。

含有本发明抗体的组合物或它的鸡尾酒配方（也就是组合有其它蛋白质）可以用作为治疗性处理。在治疗性应用中，将能治愈或至少部分地阻止出血的有效量的组合物给予患出血异常或疾病的患者。能达到这一点的足够量被定义为“治疗有效量”。对此应用的有效量将依赖于疾病的严重程度以及患者的一般健康状况。

组合物的单次或多次给药依赖于所需的及患者所耐受的剂量和频率。在任何时候，组合物应当提供能有效地治疗患者的足够量的本发明的蛋白质。

以治疗有效量给予本发明抗体或它们的药物可接受的组合物，治疗有效量依赖于多种因素而变化，包括所采用的特异抗体的活性；抗体作用的代谢稳定性及时间长短；患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食；给药的方式和时间；排泄速率；药物组合；特殊疾病状态的严重程度；以及患者正进行治疗。通常，每天的治疗有效量为每天从约 0.14mg 到约 14.3mg/kg 体重的本发明抗体或其药物可接受的组合物；优选为每天约 0.7mg 到约 10mg/kg 体重；以及最优选每天

约 1.4mg 到约 7.2mg/kg 体重。例如，给予一个 70kg 的人，剂量范围为每天从约 10mg 到约 1g 的本发明抗体或其药物可接受的组合物；优选每天约 50mg 到约 700mg；以及最优选每天约 100mg 到约 500mg。

细胞和基因治疗：

依照本发明也可以利用被称为“细胞治疗”的方法通过体内表达本发明的抗体来利用这些抗体。因此，例如，可以用编码抗体的多核苷酸(DNA 或 RNA)体外 (ex vivo) 工程化细胞，然后将工程化的细胞提供给需要用抗体治疗的患者。这些方法在本领域是熟知的。例如，利用本领域已知的方法通过使用含有编码本发明抗体的 RNA 的逆转录病毒颗粒可以工程化细胞。

依照本发明也可以利用被称为“基因治疗”的方法通过体内表达本发明的抗体来利用这些抗体。因此，例如，可以用编码抗体的多核苷酸(DNA 或 RNA)工程化病毒，然后将工程化的病毒提供给需要用抗体治疗的患者。这些方法在本领域是熟知的。例如，利用本领域已知的方法可以工程化含有编码本发明抗体的 DNA 的重组腺病毒。

使用细胞或基因治疗局部给予本发明的抗凝血抗体可以将治疗药物提供给位于血管内的内皮细胞的靶向部位。

体外和体内细胞及基因治疗的方法学都是被关注的。已知一些用于将潜在的治疗基因转移到特定的细胞群的方法。见，例如 Mulligan (1993) Science 260: 926-931。这些方法包括：

- 1) 直接基因转移。见，例如 Wolff et al. (1990) Science 247: 1465-1468;
- 2) 脂质体介导的 DNA 转移。见，例如 Caplen et al. (1995) Nature Med. 3: 39- 46; Crystal (1995) Nature Med. 1: 15-17; Gao and Huang(1991) Biochem. Biophys. Res. Comm. 179: 280-285;
- 3) 逆转录病毒介导的 DNA 转移。见，例如 Kay et al. (1993) Science 262: 117- 119; Anderson (1992) Science 256: 808-813;

4) DNA 病毒介导的 DNA 转移。这些 DNA 病毒包括腺病毒（优选基于 Ad2 或 Ad5 的载体）、疱疹病毒（优选基于单纯疱疹病毒的载体）、细小病毒（优选基于“缺陷的”或非自主的细小病毒的载体，更优选基于腺相关病毒的载体，最优选基于 AVV-2 的载体）。见，例如 Ali et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 367-384；美国专利 4,797,368，在此一起并入参考，以及美国专利 5,139,941，在此并入参考。

对用于转移感兴趣的基因的特殊载体系统的选择依赖于多种因素。一个重要的因素是靶细胞群的性能。尽管逆转录病毒载体已经被广泛地研究并用于许多基因治疗应用，但这些载体通常不适合用于感染非分裂细胞。另外，逆转录病毒具有致癌的潜能。然而，最近在慢病毒领域的进展可以克服这些局限中的一些局限。见 Naldini et al. (1996) *Science* 272: 263-267。

可能衍生上述逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于：Moloney 鼠白血病病毒、脾脏坏死病毒、逆转录病毒，例如 Rous 肉瘤病毒、Harvey 肉瘤病毒、禽类白血病病毒、长臂猿白血病病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓瘤病毒 (myeloproliferative sarcoma virus) 以及乳癌病毒。在一个实施方案中，逆转录病毒质粒载体来源于 Moloney 鼠白血病病毒。

腺病毒的优点是它们具有广泛的宿主范围，能感染静止的或终末分化的细胞，例如神经元或肝细胞，以及基本上表现为非致癌性。见，例如 Ali et al. (1994), *supra*, p.367。腺病毒不整合到宿主基因组中。因为它们存在于染色体外，极大地减少了插入诱变的危险。Ali et al. (1994), *supra*, p.373。

腺相关病毒具有与基于腺病毒的载体相似的优点。然而，AAV 定点整合到人的 19 号染色体 (Ali et al. (1994), *supra*, p. 377)。

在一个优选的实施方案中，用编码本发明抗体的 DNA 进行细胞

或基因治疗的疾病包括但不限于：深静脉血栓形成、弥漫性血管内凝血、急性冠脉综合征或具有凝血病表现的癌症。

根据该实施方案，在疾病诊断的同时或诊断后即刻，用编码本发明抗体的 DNA 的细胞或基因治疗提供给所需的患者。

根据该实施方案，本领域技术人员明白可以使用任何合适的含有编码本发明抗体的 DNA 或编码本发明抗体的类似物、片段、衍生物或变体的 DNA 的基因治疗载体。构建这样载体的技术是已知的。见，例如 Anderson, W. F. (1998) *Nature* 392: 25-30; Verma I. M. and Somia, N. (1998) *Nature* 389: 239-242。用已知的技术可以实现将含有抗体 DNA 的载体导入到靶向位点。

细胞或基因治疗载体包括一个或多个启动子。可以采用的合适的启动子包括但不限于：逆转录病毒 LTR; SV 40 启动子和在 Miller et al. (1989) *Biotechniques* 7 (9): 980-990 中所描述的人巨细胞病毒 (CVM) 启动子或其它任何的启动子(例如，细胞启动子例如真核细胞启动子，包括但不限于组蛋白、pol III 和 β -肌动蛋白启动子)。可以采用的其它病毒启动子包括但不限于：腺病毒启动子、胸苷激酶 (TK) 启动子以及 B19 细小病毒启动子。根据本文所包含的教导，选择合适的启动子对于本领域技术人员是显而易见的。

编码本发明抗体的核酸序列是在适宜的启动子的控制下。可以采用的适宜的启动子包括但不限于腺病毒启动子，例如腺病毒主要晚期启动子；或异源启动子，例如巨细胞病毒 (CMV) 启动子；呼吸道合胞病毒 (RSV) 启动子；可诱导启动子，例如 MMT 启动子、金属硫蛋白启动子；热休克启动子；白蛋白启动子；ApoAI 启动子；人球蛋白启动子；病毒胸苷激酶启动子，例如单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子；逆转录病毒 LTRs (包括上述修饰的逆转录病毒 LTRs)； β -肌动蛋白启动子以及人生长激素启动子。

用逆转录病毒质粒载体转导包装细胞株形成生产细胞株。可以被

转染的包装细胞的实例包括,但不限于 PE501、PA317、 ψ -2、 ψ -AM、PA12、T19-14X; 如在 Miller (1990) Human Gene Therapy 1: 5-14 中所描述的 VT-19-17-H2、 ψ CRE、 ψ CRIP、GP+/-86、GP+envAm12 和 DAN 细胞株, 在此将其全部内容一同并入参考。载体可以通过本领域任何已知的手段转导包装细胞。这些手段包括但不限于电穿孔、使用脂质体以及 CaPO_4 沉淀。在一个方法中, 可以将逆转录病毒质粒载体装入脂质体内, 或与脂质偶联, 然后给予宿主。生产细胞株生产感染性逆转录病毒载体颗粒, 其包括编码多肽的一个或多个核酸序列。然后可以用这些逆转录病毒载体颗粒体外或体内转导真核细胞。被转导的真核细胞将表达编码多肽的一个或多个核酸序列。可以被转化的真核细胞包括但不限于: 胚胎干细胞、胚胎癌细胞以及造血干细胞、肝细胞、成纤维细胞、成肌细胞、角质细胞、内皮细胞和支气管上皮细胞。

一种不同于基因治疗的方法是“经核治疗 (transkaryotic therapy)”, 其中体外 (ex vivo) 处理患者的细胞以诱导静止的染色体基因在重新导入到患者体内后生产感兴趣的蛋白。经核治疗假定个体具有活化所需的基因的正常互补体 (normal complement)。经核治疗包括将能激活新生基因的启动子或其它外源调节序列体外 (ex vivo) 导入到患者细胞的染色体 DNA 内, 培养并选择出活化的蛋白生产细胞, 然后将活化的细胞重新导入到患者体内, 目的是之后这些细胞在体内被完全地建立。然后“基因活化”细胞生产感兴趣的蛋白质显著长的一段时间, 可能是患者的终生。美国专利 5,641,670 和 5,733,761 详细阐述了这个概念, 在此将其全部内容一起并入参考。

试剂盒:

本发明进一步涉及用于研究或诊断目的的试剂盒。试剂盒通常包括一个或多个含有本发明抗体的容器 (container)。在一个优选的实施方案中, 所述试剂盒包含有适合于用第二种分子衍生化的形式的单

链抗体的容器。在一个更优选的实施方案中，所述试剂盒包含有 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 3 的抗体的容器。

在另一个实施方案中，试剂盒可以含有编码本发明抗体的 DNA 序列。优选在适于转染宿主细胞并被宿主细胞所表达的质粒中提供编码这些抗体的 DNA 序列。质粒可以含有调节宿主细胞内 DNA 表达的启动子（通常是可诱导启动子）。质粒也可以含有适宜的限制性位点以有助于其它 DNA 序列插入到质粒内以生成多种抗体。质粒也可以含有许多其它的有助于所编码的蛋白质克隆与表达的元件。这些元件对于本领域技术人员是熟知的，包括例如选择标记、起始密码子、终止密码子等等。在一个更优选的实施方案中，试剂盒包含有 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 4 的 DNA 序列的容器。

治疗适应症：

血栓形成起重要的致病作用的疾病包括心肌梗死、弥漫性血管内凝血、深静脉血栓形成、肺栓塞、缺血性卒中、感染性休克、急性呼吸窘迫综合征、不稳定绞痛和其它的动脉和静脉阻塞性病变。本发明的抗体在所有的这些情况以及病理性血栓形成的其它疾病中都是有用的。本发明的抗体可能有用的其它病理性病变包括具有凝血病表现的癌症以及炎症。也可以发现抗体可以用于皮肤和静脉移植物和器官移植。有用的意思是抗体能用于治疗，或预防疾病或阻止它进展到更严重的状态。本发明的抗体也给例如接受如心瓣膜的生物假体的患者提供了一种安全和有效的抗凝剂。这些抗体可以取代肝素和华法林治疗例如肺栓塞或急性心肌梗死。本发明的抗体也可以用于包被凝血是相关问题的医疗器械。

检测：

多种用于测定本发明抗体的体外抗凝活性的实验室检测是可利用的。利用例如活化部分凝血酶原激酶时间（“APTT”）、凝血酶凝血时间（“TCT”）和/或凝血酶原时间（“PT”）的血浆凝血时间检测

可以测定抗体的抗凝作用。这些检测区分了凝血抑制的不同机制并涉及蛋白 C 的活化。在任何一个检测中，凝血时间的延长都说明分子能抑制血浆内凝血。

用上述的检测鉴定具有抗凝剂活性的抗体，它们在纯化系统和血浆介质中都能结合 TF。然后用进一步的检测法评价本发明抗体的其它活性，如对凝血酶催化的纤维蛋白原生成纤维蛋白的抑制(Jakubowski, H. V. et al. (1986) J. Biol. Chem. 261 (8): 3876-3882)、对凝血酶活化因子 V 抑制(Esmon, C. T. et al. (1982). J. Biol. Chem. 257 (14): 7944-7947)、促进抗凝血酶 III 和肝素辅因子 II 对凝血酶的抑制(Esmon, N. L. et al. (1983) J. Biol. Chem. 258 (20): 12238-12242)、对凝血酶活化因子 XIII 的抑制(Polgar, J. et al. (1987) Thromb. Haemost. 58 (1): 140)、对凝血酶介导的蛋白 S 的失活的抑制(Thompson, E.A. and Salem, H. H. (1986) J. Clin. Inv. 78(1): 13-17)以及对凝血酶介导的血小板的活化和聚集的抑制(Esmon, N. L. et al. (1983), supra)。

用在实施例 4 中详细描述以下检测法测定本发明抗体的体外效价或体外结合亲和力：1) sTF/FVIIa 肽水解检测；2)因子 X 活化检测；3)PT 检测；及 4)微量量热法检测。

在进行本发明的操作时，当然要明白所引述的特定的缓冲液、培养基、试剂、细胞、培养条件等均是而非限制性的，而是应包括本领域技术人员在阅读任一所讨论的特定上下文中时能认识到的所有感兴趣的或有价值的相关材料。例如，用一种缓冲体系或培养基取代另一种经常是可能的，并仍能取得即使不相同也是相似的结果。本领域技术人员有着这些系统和方法学的足够多的知识，使得他们不进行过多的试验就能进行这样的取代并最优化在此所描述的方法和操作。

用下面的非限制性实施例进一步描述本发明，以帮助实施本发明。在应用实施例的阐述时，应理解的是相关领域的技术人员能够认识到本发明方法的其它不同的实施方案。

在先前的和下面的实施例中，除非有特殊的说明，所有的温度被非修正地设定为摄氏度，所有的部分和百分比为重量百分比。

一同参考上面所引用的所有申请、专利和出版物的全部阐述。

实施例 1

单链抗 TF 抗体构建体 scFv(TF)3e10

(-18)MLGVLVLGALALAGLVFPEMAQVNLRES
GGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTDAWMSWVRQA
PGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSLTDYYW
YGMDVWGQGTLVTVSAGGGGSGAPNFMLTQPH
SVSASPGKTVTISCTRSSGSVASYYVQWYQQR
PGSSPTTVIYEDNHRPSGVPDRFSGSIDTSSNSASL
TISGLKTEDEADYYCQSYDSNNLVVFGGGGTKLT
VLGAAAGAPVPYPDPLEPRAA(264)

单链抗 TF 抗体 scFv(TF)3e10 (SEQ ID NO: 1)由信号肽 (-18 到 -1)、V_H 结构域 (1 到 126)、V_H-V_L 接头 (127 到 131)、V_L 结构域 (132 到 246) 以及 e-tag 序列 (247 到 264) 组成。scFv(TF)3e10 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 编码 SEQ ID NO: 1 的氨基酸序列。

实施例 2

单链抗 TF 抗体构建体 scFv(TF)3e10Δ

(-18)MLGVLVLGALALAGLVFPEMAQVNLRES
GGTLVQPGGSLRLSCAASGFSFTDAWMSWVRQA
PGKELEWVSSISGSGGSTYYAGSVKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVLSLTDYYW
YGMDVWGQGTLVTVSAGGGGSGNFMLTQPHSVS
ASPGKTVTISCTRSSGSVASYYVQWYQQRPGSSP

TTVIYEDNHRPSGVPDRFSGSIDTSSNSASLTISG
LKTEDEADYYCQSYDSNNLVVFGGGTKLTVLG
(243)

单链抗 TF 抗体 scFv(TF)3e10 Δ (SEQ ID NO: 3)由信号肽 (-18 到-1)、V_H 结构域 (1 到 126)、V_H-V_L 接头 (127 到 131) 和 V_L 结构域 132 到 243)组成。scFv(TF)3e10 Δ 不同于 scFv(TF)3e10 的是在 V_L 结构域的 N 末端有 3 个氨基酸 (GAP) 的缺失以及缺失了 C 末端的 e-tag 序列。scFv(TF)3e10 Δ DNA 序列 (SEQ ID NO: 4) 编码 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列。

实施例 3

抗 TF 抗体在细菌和哺乳动物细胞内的表达

从 TF 结合噬菌体中鉴定出 6 种不同的单链抗体: scFv(TF)2c1、scFv(TF)2c11、scFv(TF)2d3、scFv(TF)2h6、scFv(TF)3e10 以及 scFv(TF)3h2, 将其在大肠杆菌内过表达, 并如上述用抗 e-tag 亲和柱将其亲和纯化。用 BIAcore 测定 6 种纯化的抗体对 sTF 的亲合力, 并在实施例 4 中所述的 sTF/FVIIa 肽水解检测、FX 活化检测、PT 以及微量量热法检测中将这些抗体特征化, 结果显示在实施例 5 中。

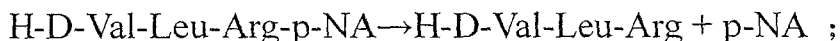
也在 CHO 细胞中表达 scFv(TF)3e10 抗体 (SEQ ID NO: 1)。表达质粒含有编码 scFv(TF)3e10 的 DNA 序列 (SEQ ID NO: 2) 以及潮霉素 B 和 DHFR 选择标记。初始选择在 400 μ g/ml 潮霉素中进行以选择一个群。然后对所得到的群进行 100nM 氨甲蝶呤选择。在这个选择期间, 从群中选择出具有包含选择标记和靶向基因的 DNA 区域的扩增拷贝的细胞。作为选择结果, 表达水平从近 0.3mg/L 增加到 6mg/L。

实施例 4

体外效力 (potency) 和结合亲和力检测

1. sTF/FVIIa 肽水解检测

下面描述本检测的原理。底物三肽 p-nitroanilide 的酰胺键被 sTF/FVIIa 复合物水解。在 405nm 监测所释放的生色产物 p-nitroanilide, 用摩尔消光系数 $9920\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 计算出每单位时间所形成的产物浓度。将初始速率加入到 4 参数方程: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$ 可确定 IC_{50} 值 (C)。



S2266 底物 三肽 生色团

试剂和溶液:

1. 检测缓冲液: 50 mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM CaCl_2 、0.1% BSA, pH 7.5
2. 人 FVIIa (HCVIIA-0060, Haematologic Technologies Inc): 10x 工作溶液-在使用前配成 20nM 检测缓冲液溶液。
3. 可溶性 TF (Berlex): 10x 工作溶液-在使用前配成 30nM 检测缓冲液溶液。
4. 显色底物 S2266 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.): 储存溶液: 10mM H_2O 溶液, 4°C 下储存。2.5x 工作溶液-在使用前配成 2.5mM 检测缓冲液溶液。
5. 抗体: 在使用前配成 2.5x 检测缓冲液稀释液。

检测条件:

室温下在 96 孔微量滴度板内进行检测。各种成分的最终浓度如下:

sTF 3nM;

抗体 从 1000 到 0.625nM 不等;

FVIIa 2nM;

S2266 1mM;

检测步骤:

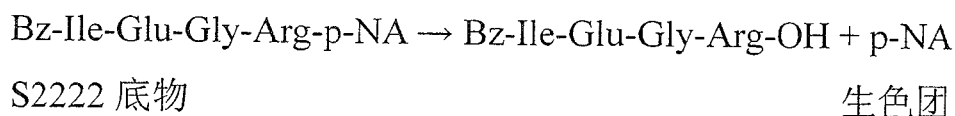
1. 将 0.1ml 2.5x AB (或缓冲液对照) 吸入到每个孔内。

2. 加入 0.025ml 10 x sTF, 在室温下轻晃孵育 10min。
3. 加入 0.025ml 10 x FVIIa, 在室温下轻晃孵育 10min。
4. 加入 0.1ml 2.5x S2266 底物, 马上将滴度板转移到读板器并在 405nm 每隔 10 秒钟测定酶动力学共 15 分钟。

该检测可用于测定本发明抗体与 sTF 或 FVIIa/TF 复合物结合的表现 K_D , 以及测定本发明抗体是否与 FVII 竞争结合 TF。

2. 因子 X 活化检测

下面描述本检测的原理。将 FVIIa 与重组人 TF 小泡 (vesicle) 一起孵育形成能活化底物 FX 的蛋白酶复合物。在存在 (或不存在) 不同浓度的抗体时形成该复合物, 然后引入底物 FX, 可以进行反应以形成产物, 活化的蛋白酶 FXa, 它能水解显色底物 S2222 的 p-nitroanilide 酰胺键。在 405nm 监测所释放出的生色团产物 p-nitroanilide, 用摩尔消光系数 $9920\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 计算出每单位时间所形成的产物浓度。将初始速率加入到 4 参数方程: $Y = (A-D)/(1 + (x/C)^B) + D$ 可确定 IC_{50} 值 (C)



试剂和溶液:

1. 检测缓冲液: 50mM Tris-HCl、150mM NaCl、5mM CaCl_2 、0.1% BSA, pH 7.5
2. 人 FVIIa (HCVIIA-0031, Haematologic Technologies Inc.): 4x 工作溶液-在使用前配成 100pM 检测缓冲液溶液。
3. 重组人 TF (来自 Innovin, Dade, 在我们实验室重构): 工作溶液-在使用前配成 1:480 检测缓冲液稀释液。
4. 人因子 X (HCX-0060, Haematologic Technologies Inc.): 4x 工作溶液-在使用前配成 1000nM 检测缓冲液溶液。

5. 显色底物 S2222 (Kabi Pharmacia Hepar Inc.):

储存溶液: 6mM H₂O 溶液, 4℃ 储存。

工作溶液-在使用前配成 0.78mM 底物的 3.57mM EDTA (用于终止反应)、150mM NaCl、50mM Tris-HCl, pH 7.5 的溶液。

6. 抗体:

在使用前配成 4x 检测缓冲液稀释液。

检测条件:

在室温下 96 孔微量滴度板内进行检测。各种成分的最终浓度如下:

rTF 小泡 1/4 的 1:480 稀释液;

抗体 从 1000 到 0.625nM 不等;

FVIIa 25pM;

FX 250nM;

S2222 0.546mM;

检测步骤:

1. 将 0.015ml 4xAB (或缓冲液对照) 吸入到每个孔内。
2. 加入 0.015ml 4xrTF 小泡。
3. 加入 0.015ml 4x FVIIa, 在室温下轻晃孵育 10min。
4. 加入 0.015ml 4x FX, 在室温下轻晃孵育 5min。
5. 加入 0.14ml S2222 底物, 马上将滴度板转移到读板器并在 405nm 每隔 10 秒钟测定酶动力学共 15 分钟。

本检测可以用于确定本发明抗体是否抑制 FVIIa/TF 复合物激活 FX, 以及确定本发明抗体是否与 FX 竞争结合 FVIIa/TF 复合物。

3. 凝血酶原时间 (PT) 检测

对于标准的 PT 反应, 将 90μl 适宜浓度的抗体或 PBS 添加到含有 20μl 促凝血酶原激酶 IS (Dade) 以及 90μl 25mM CaCl₂ 的比色杯中。将混合物在 37℃ 孵育 1 分钟, 然后加入 100μl 柠檬酸化的血浆

(Helena Laboratories)。或者, 将适宜体积的浓缩抗体加入到 100 μ l 重组的人促凝血酶原激酶(Ortho Recombiplastin)中, 并在近 2 分钟后, 加入 100 μ l 重组的人血浆。通过用 Electra 900C 凝血测定仪 (coagulometer) (Hemoliance) 进行的两次测定的平均值以及来自重复测定 ($n=3$ 或 4) 的平均值可测定每个凝血检测的凝血时间。生成每个抑制物的量效曲线 (dose response curve), 然后用回归分析计算出延长凝血时间两倍所必需的浓度 (nM)。

该检测可以用于评价本发明抗体对外源性凝血途径的作用。测定了双倍 PT 所需的抗体量, 以及可以与其它抗凝剂比较以评价本发明抗体的相对效力。

4. 微量量热法检测

用微量量热法 (等温滴定量热法) 检测测定本发明抗体单独与 TF 或与 FVIIa/TF 复合物的结合亲和力 (K_D)。利用 MicroCal VP-ITC 装置进行本检测。通过将 2.3 倍摩尔过量的 FVIIa 加入到 sTF 中形成 FVIIa/TF 复合物。用大小排阻层析确认 sTF 被完全结合。对于抗体对复合物的亲和力的测定, 将 1.2 μ M VIIa/TF 复合物加入到微量量热孔中并将 65 μ M 抗体加入到注射器中。对于抗体单独对 sTF 的亲和力的测定, 将 10 μ M sTF 加入到孔内并将 141 μ M 抗体加入到注射器中。用 MicroCal Origin 软件进行数据分析。数据适合于单个结合位点。

实施例 5

本发明抗 TF 抗体的体外特性

从完整的人单链抗体噬菌体展示文库中分离得到六种不同的 TF 结合抗体: scFv(TF)2c1、scFv(TF)2c11、scFv(TF)2d3、scFv(TF)2h6、scFv(TF)3e10 和 scFv(TF)3h2。用 BIAcore 测定的在大肠杆菌中表达的这些 sTF 结合抗体的亲和力在 35 和 470nM 之间。用实施例 4 中所述的 sTF/VIIa 肽水解检测确定这些抗体是否能阻断活性 VIIa/TF 复合物的形成。在这个检测中, VIIa 与 sTF 的结合所加快的对显色肽底物

S2266 的裂解速率大于 20 倍。抑制 FVIIa 与 TF 结合的抗体阻断了这种加速。五种单链抗体：scFv(TF)2c1、scFv(TF)2c11、scFv(TF)2d3、scFv(TF)2h6 和 scFv(TF)3h2 抑制了 S2266 的水解，说明它们抑制了 FVIIa 与 sTF 的结合（图 1）。相反，单链抗体 scFv(TF)3e10 不能抑制 sTF/VIIa 肽水解检测，而且事实上该抗体增加了 S2266 的水解速度，说明 scFv(TF)3e10 增加了 sTF 与 FVIIa 的亲和力。利用 sTF/VIIa 肽水解检测，scFv(TF)3e10 抗体增加了 FVIIa 对 sTF 的亲和力，使表观 K_D 降低 5 倍（图 2）。在缺乏 sTF 时，scFv(TF)3e10 不影响 FVIIa 的水解速度，说明该抗体不与 FVIIa 单独相互作用。利用 sTF/FVIIa 肽水解检测测定的 scFv(TF)3e10 抗体对 sTF 的 K_D 为 65.4nM（图 4）。用微量量热法检测比较了 scFv(TF)3e10 对 TF 与对 FVIIa/TF 复合物的亲和力。这些实验揭示哺乳动物细胞表达的 scFv(TF)3e10 与 TF/FVIIa 复合物的亲和力比与游离的 sTF 的亲和力高约 20 倍（33nM 对 600nM，图 5）。

用 FX 活化检测以及 PT 检测比较了 6 种表达于细菌的 TF 结合单链抗体。五种抑制了 sTF/FVIIa 复合物对 S2266 水解速度的抗体 scFv(TF)2c1、scFv(TF)2c11、scFv(TF)2d3、scFv(TF)2h6 及 scFv(TF)3h2 中没有一种抗体延长了 PT 超过 PBS 缓冲液对照（图 3）。相反，尽管 scFv(TF)3e10 抗体没有 BIAcore 所测定的最高亲和力，以及它增强了 FVIIa 对 sTF 的亲和力，但 scFv(TF)3e10 是该组中唯一能抑制 FX 活化（图 6 以及数据未示出）并在 PT 检测中延长凝血时间的抗体（图 3）。scFv(TF)3e10（二聚体）抗体在 FX 活化检测中的抑制作用的 IC_{50} 为 0.44nM（图 6）。最后，用 FX 活化检测确定 scFv(TF)3e10 抗体是否与 FX 竞争结合 FVIIa/TF 复合物。在底物 FX 的所有浓度下，scFv(TF)3e10 以相同的 $K_{D(app)}$ 剂量依赖性地抑制 FX 活化，说明 scFv(TF)3e10 与 FX 是非竞争性的并且不结合与 FX 所结合的 TF 或 FVIIa/TF 复合物的同一位点（图 7）。

根据与重组人可溶性 TF 的结合可以鉴定 scFv(TF)3e10 抗体。人与鼠或人与兔的 TF 之间的序列同源性分别为 58%和 71%。抗体与人 TF 的独特性表位结合干扰了 FVIIa/TF 复合物对 FX 的活化。这种抗体在生理上比与 FVII 或 FVIIa 竞争结合 TF 的抗体具有优越性。FVIIa 对可溶性 TF 的 K_D 为 $\sim 10\text{nM}$ (图 2), 该数值与已经发表的 FVIIa 与 sTF 结合(4.8nM , Neuenschwander, P. F.和 Morrissey, J. H. (1994) J. Biol. Chem. 269 (11): 8007-8013)或 FVII、FVIIa 及 DIP 失活的 FVIIai 与重建于中性磷脂酰胆碱小泡的全长 TF 结合(Bach R. et al. (1986) Biochemistry 25: 4007-4020)的数值一致。当磷脂小泡含有带电荷的磷脂酰丝氨酸时, 极大地增加了 FVII 或 FVIIa 与全长 TF 结合的亲和力(Bach R. et al (1986) supra), 这是由于 FVII 或 FVIIa 的 GLA 结构域与带电荷的膜表面的相互作用的结果(Neuenschwander, P. F. and Morrissey, J. H. (1994) supra)。在这些最理想的条件下, FVIIa 与全长 TF 的结合具有非常高的亲和力 (41 pM)。与 FVII 或 FVIIa 竞争结合的 TF 抗体将很难与这种高亲和力的 FVIIa/TF 复合物竞争。相反, scFv(TF)3e10 抗体不仅与 FVIIa/TF 复合物结合的亲和力比与 TF 结合的更高, 而且它不与 FVIIa 竞争结合 TF。不与 FVIIa 竞争的例如 scFv(TF)3e10 抗体抑制 FX 的活化不依赖于血浆的 FVII 浓度, 该浓度为 $\sim 10\text{nM}$ 。

scFv(TF)3e10 也优于与 FX 竞争结合 TF 的抗体。依照于图 7 所示的数据, FX 与 VIIa/TF 复合物的 K_m 在 0.061 和 $0.099\mu\text{M}$ 之间, 与已发表的数值一致 ($0.1\mu\text{M}$, Baugh, R. J. et al. (2000) J.Biol. Chem. 275 (37): 28826-28833)。人血浆中 FX 的浓度为 140nM (1.4 到 2 倍 K_m)。如图 7 所示不与 FX 竞争例如 scFv(TF)3e10 的抗体抑制 FX 的活化不依赖于血浆的 FX 浓度。

实施例 6

体内大鼠血栓栓塞模型

TF 结合单链抗体 scFv(TF)3e10 特异于灵长类 TF。在清醒的雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (350-400g, n>7/组) 上用人 TF(含有人重组 TF 的促凝血酶原激酶试剂, Ortho)触发形成了血栓栓塞模型。在这个弥漫性血管内凝血(DIC)模型中, 通过促凝血酶原激酶注射, TF 诱导了肺内纤维素沉积 (pulmonary fibrin deposition)、呼吸衰竭和死亡。将的哺乳动物细胞表达的 scFv(TF)3e10 或载体 (vehicle) 注射到尾静脉内, 15 分钟后接着丸式注射促凝血酶原激酶 (0.5ml/kg)。在载体治疗组中, 这种剂量的 TF 造成了 60%的死亡率 (LD_{60}), 通常发生在促凝血酶原激酶注射后的 5 分钟内。根据下面的发病率-死亡率评分系统对大鼠评分: 0=不受影响; 1=轻微呼吸窘迫 (在 30min 内恢复); 2=严重呼吸窘迫 (垂死的, 恢复需要超过 60min); 以及 3=死亡。用平均分数比较不同治疗组的效果。在图 8 中描述了应用这种体内检测的结果。本发明抗体在这个检测中能降低死亡和呼吸窘迫。

用通常或特殊描述的反应物和/或本发明的操作条件取代在上述实施例中所使用的反应物和/或操作条件可以重复出具有相似成功率的上述实施例。

虽然本发明已经通过生成的某些抗体构建体而举例说明, 但显而易见在不脱离本发明的精神和范围时可以对本发明进行变化和修饰。

序列表

<110> 舍林股份公司

<120> 作为抗凝剂的新的靶向组织因子的抗体

<130> 52295AWOM2

<150> US 60/376,566

<151> 2002-05-01

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 282

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Amino acid sequence of scFv(TF)3e10 antibody

<400> 1

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15

Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30

Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45

Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60

Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80

Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125

Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His
 145 150 155 160
 Ser Val Ser Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg
 165 170 175
 Ser Ser Gly Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg
 180 185 190
 Pro Gly Ser Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro
 195 200 205
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn
 210 215 220
 Ser Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly
 245 250 255
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ala Ala Ala Gly Ala Pro Val Pro
 260 265 270
 Tyr Pro Asp Pro Leu Glu Pro Arg Ala Ala
 275 280

<210> 2
 <211> 849
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence encoding scFv(TF) 3e10 antibody

<400> 2
 atgcttgggg tcttggtcct tggcgcgctg gccctggcag gcctggtcct ccccgagatg 60
 gcccggtca acttaaggga gtctggggga accttggtcc agcctggggg gtccctgaga 120
 ctctcctgtg cagcctctgg attcagtttc actgacgcct ggatgagctg ggtccgccag 180
 gctccaggga aggagctgga gtgggtctca agtattagtgt gtagtggtgg aagcacatac 240
 tacgcaggct ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300
 tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagta 360
 ttatcgctga ccgattacta ctggtacggc atggacgtct ggggccaaagg caccctggtc 420
 accgtctcgg ccggtggcgg cggatctggc gcgccaaatt ttatgctgac tcagccccac 480
 tctgtgtcgg cgtctccggg gaagacggta accatctcct gcacccgcag cagtggcagc 540
 gttgccagct actatgtgca gtggtaccag cagcgcccgg gcagttcccc caccactgtg 600
 atctatgagg ataaccacag accctctggg gtccctgatc ggttctcttg ctccatcgac 660

```

acctcctcca actctgcctc cctcaccatc tctggactga agactgagga cgaggctgac 720
tactactgtc agtcttatga tagcaacaac cttgtggttt tcggcggagg gaccaagctg 780
accgtcctag gtgcggcgcg aggagctccg gtgcgggata cggatccgct ggaaccgcgt 840
gccgcatga 849

```

```

<210> 3
<211> 261
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```
<220>
```

```
<223> Amino acid sequence of scFv(TF)3e10delta antibody
```

```

<400> 3
Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Val
1 5 10 15
Phe Pro Glu Met Ala Gln Val Asn Leu Arg Glu Ser Gly Gly Thr Leu
20 25 30
Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe
35 40 45
Ser Phe Thr Asp Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys
50 55 60
Glu Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr
65 70 75 80
Tyr Ala Gly Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85 90 95
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr
100 105 110
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Val Leu Ser Leu Thr Asp Tyr Tyr Trp
115 120 125
Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140
Gly Gly Gly Gly Ser Asn Phe Met Leu Thr Gln Pro His Ser Val Ser
145 150 155 160
Ala Ser Pro Gly Lys Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Arg Ser Ser Gly
165 170 175
Ser Val Ala Ser Tyr Tyr Val Gln Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Ser
180 185 190
Ser Pro Thr Thr Val Ile Tyr Glu Asp Asn His Arg Pro Ser Gly Val
195 200 205
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ile Asp Thr Ser Ser Asn Ser Ala Ser
210 215 220

```

Leu Thr Ile Ser Gly Leu Lys Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
225 230 235 240

Gln Ser Tyr Asp Ser Asn Asn Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys
245 250 255

Leu Thr Val Leu Gly
260

<210> 4
<211> 783
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> DNA sequence encoding scFv(TF)3e10delta antibody

<400> 4
atgcttgggg tcttggtcct tggcgcgctg gccctggcag gcctggtcct ccccgagatg 60
gcccaggtca acttaaggga gtctggggga accttggtcc agcctggggg gtccctgaga 120
ctctcctgtg cagcctctgg attcagtttc actgacgcct ggatgagctg ggtccgccag 180
gctccaggga aggagctgga gtgggtctca agtattagtg gtagtggtgg aagcacatac 240
tacgcaggct ccgtgaaggg ccggttcacc atctccagag acaattccaa gaacacgctg 300
tatctgcaaa tgaacagcct gagagccgag gacacggccg tatattactg tgcgagagta 360
ttatcgctga ccgattacta ctggtacggc atggacgtct ggggccaagg caccctggtc 420
accgtctcgg ccggtggcgg cggatctaatt tttatgctga ctacagccca ctctgtgtcg 480
gcgtctccgg ggaagacggt aaccatctcc tgcacccgca gcagtggcag cgttgccagc 540
tactatgtgc agtggtacca gcagcgcccg ggcagttccc ccaccactgt gatctatgag 600
gataaccaca gaccctctgg ggtccctgat cggttctctg gtcctatcga cacctcctcc 660
aactctgcct cctcaccat ctctggactg aagactgagg acgaggctga ctactactgt 720
cagtcttatg atagcaacaa ccttgtggtt ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta 780
ggt 783

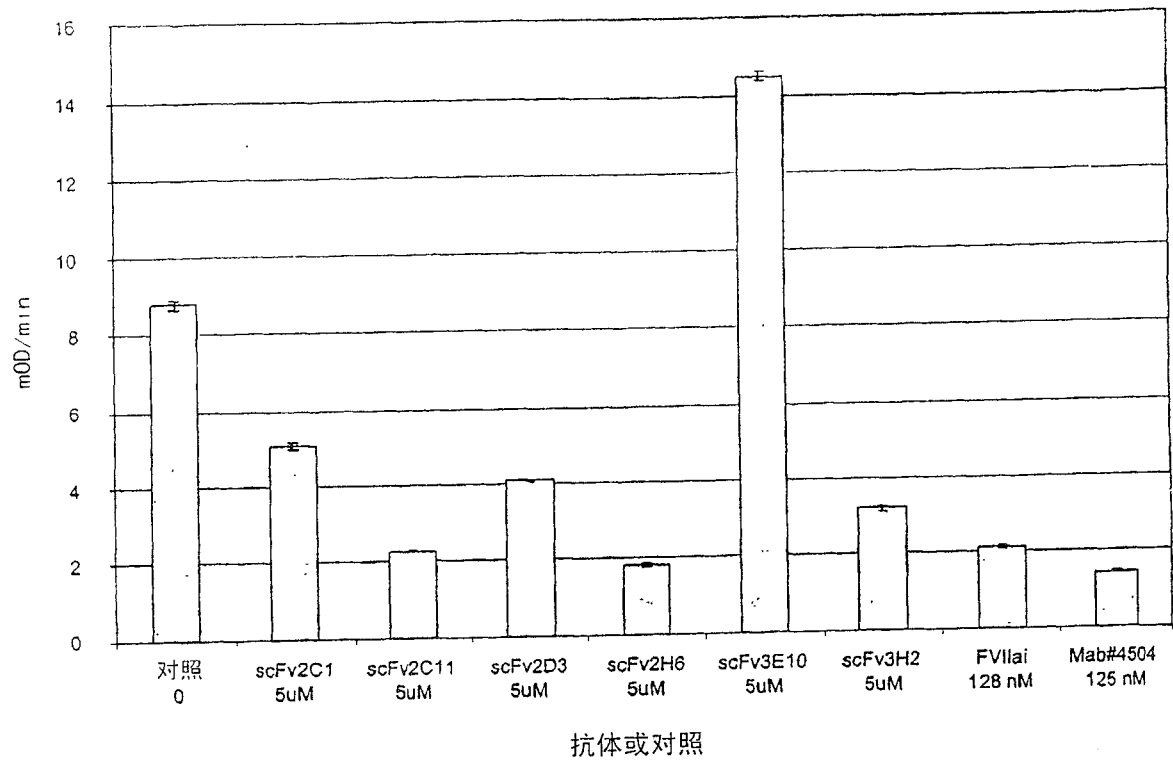


图1

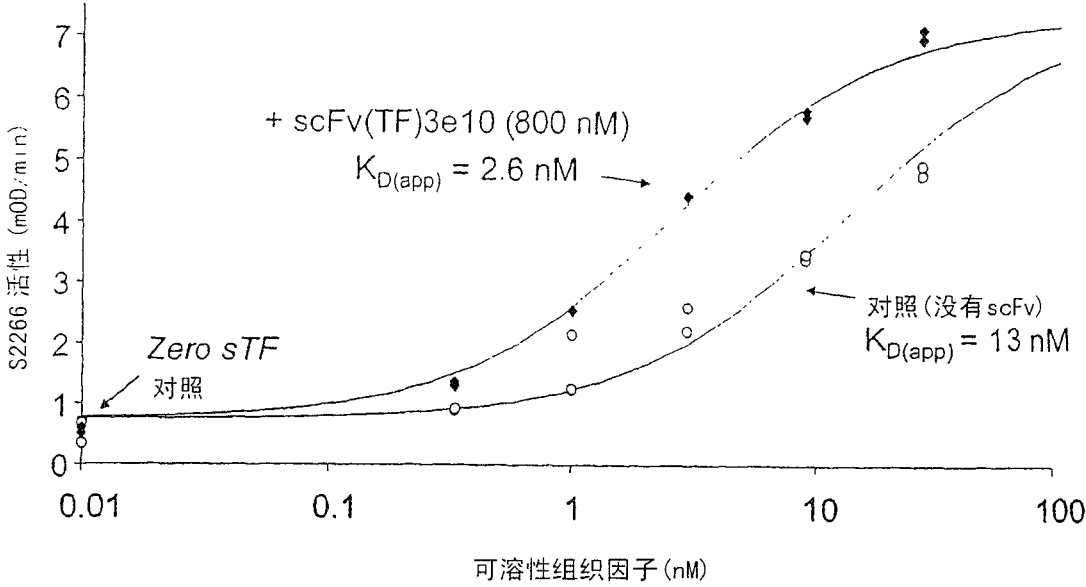


图2

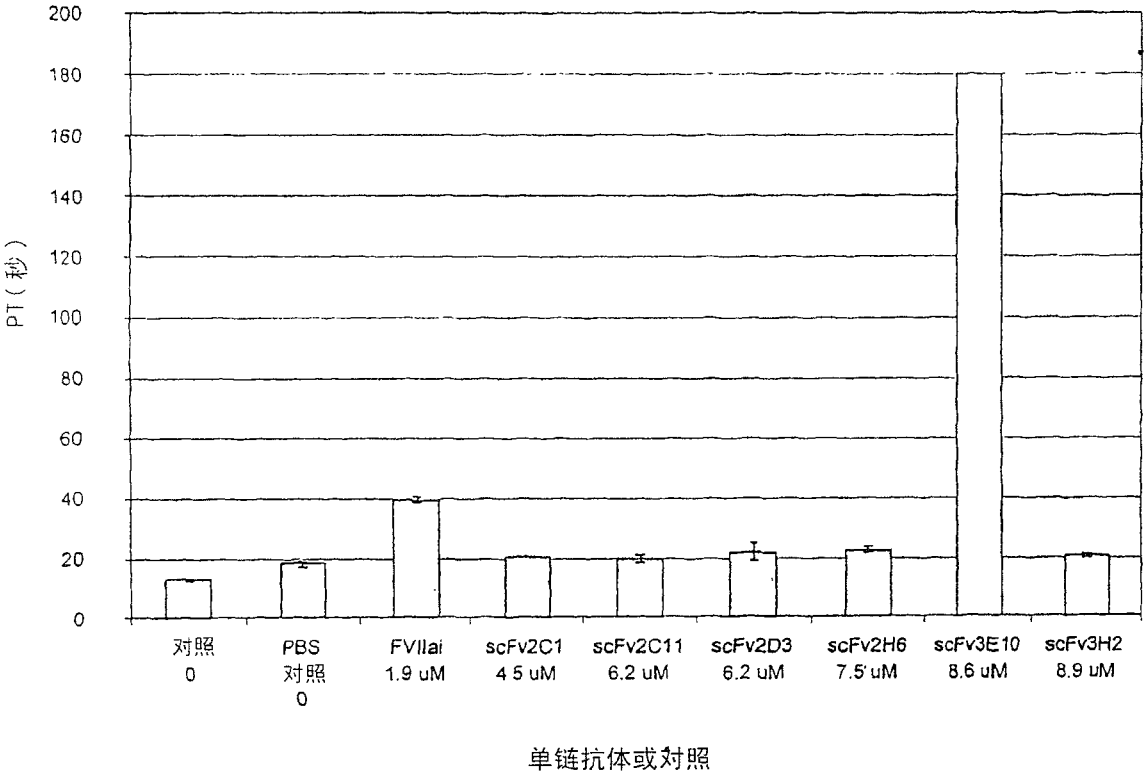


图3

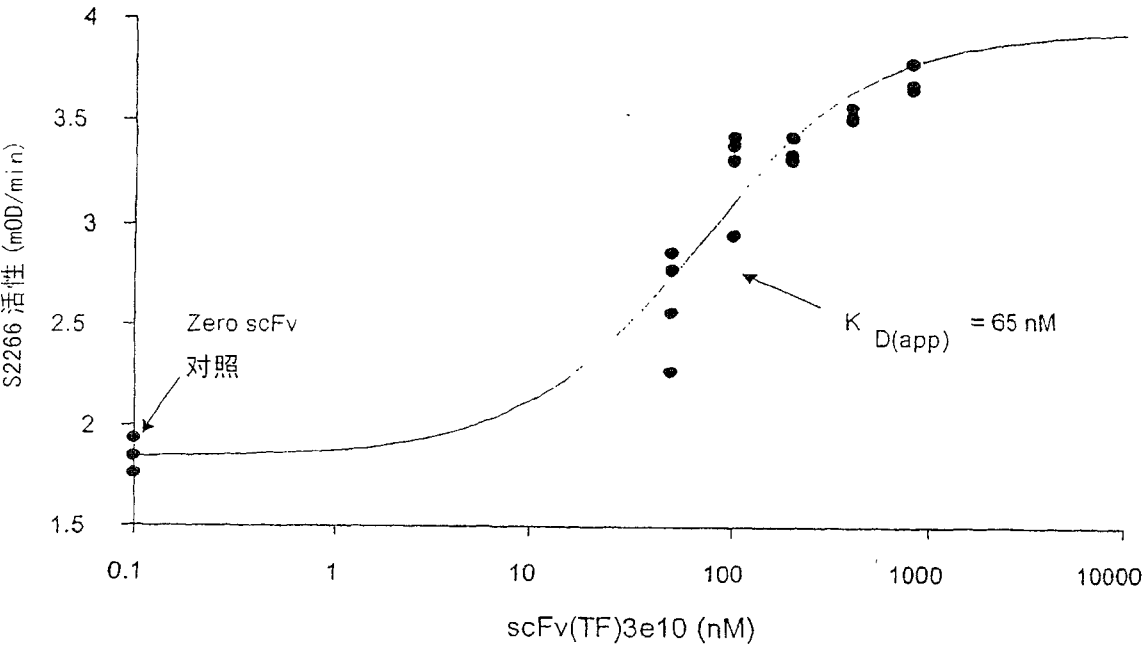


图4

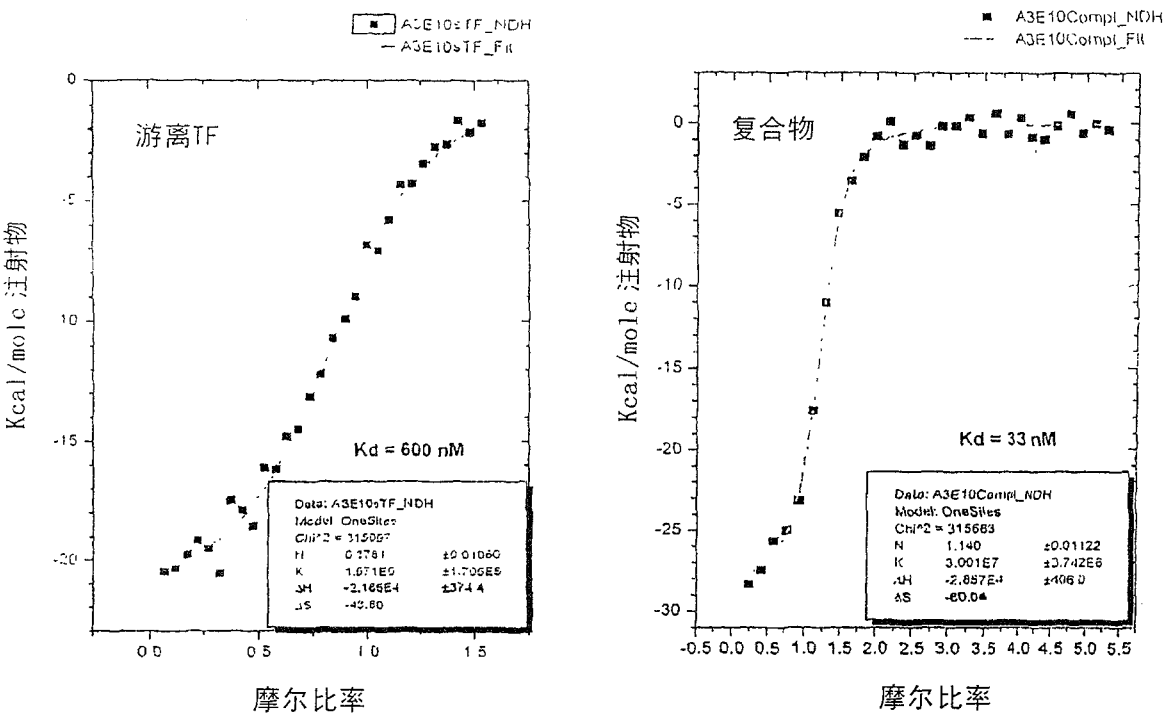


图5

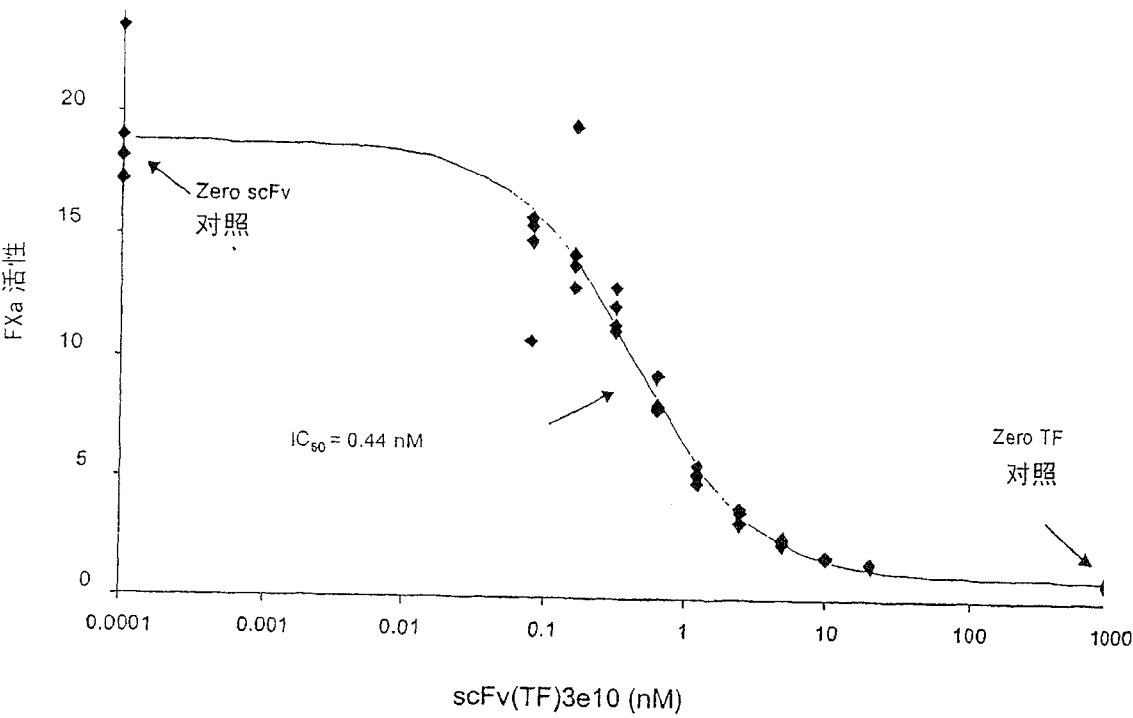


图6

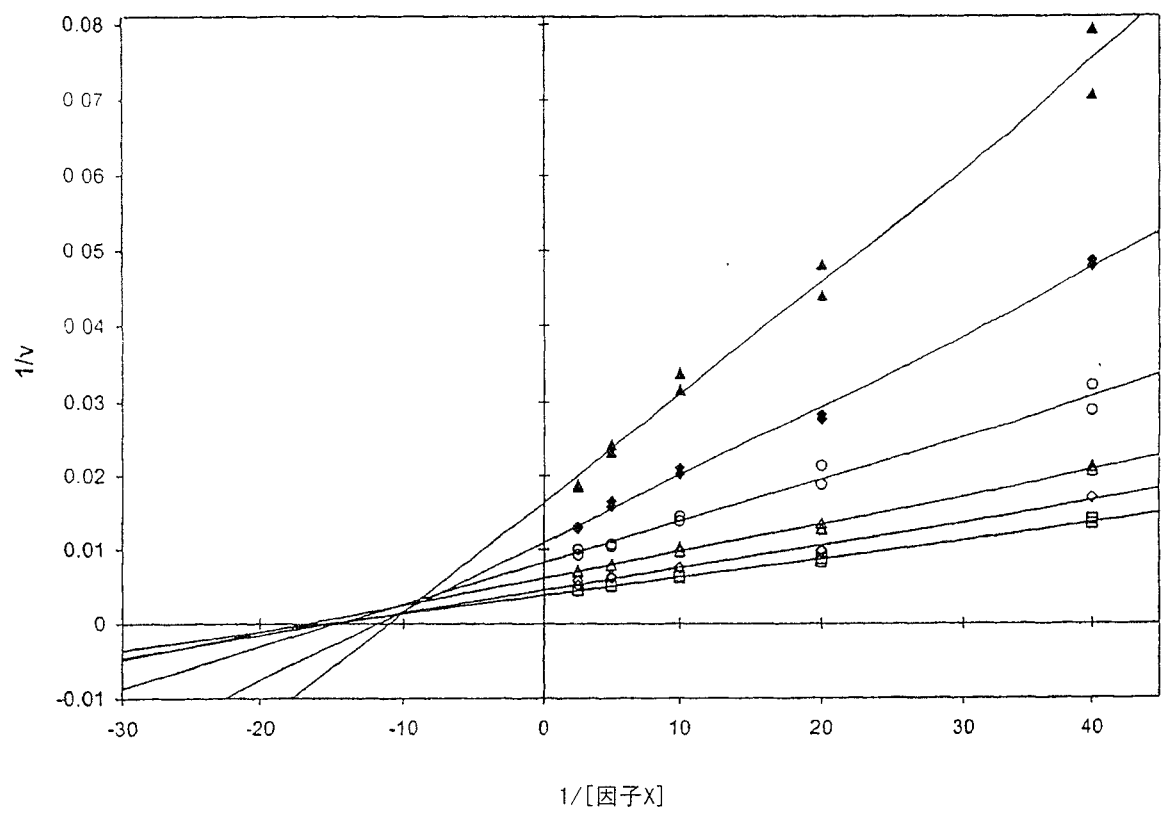


图7

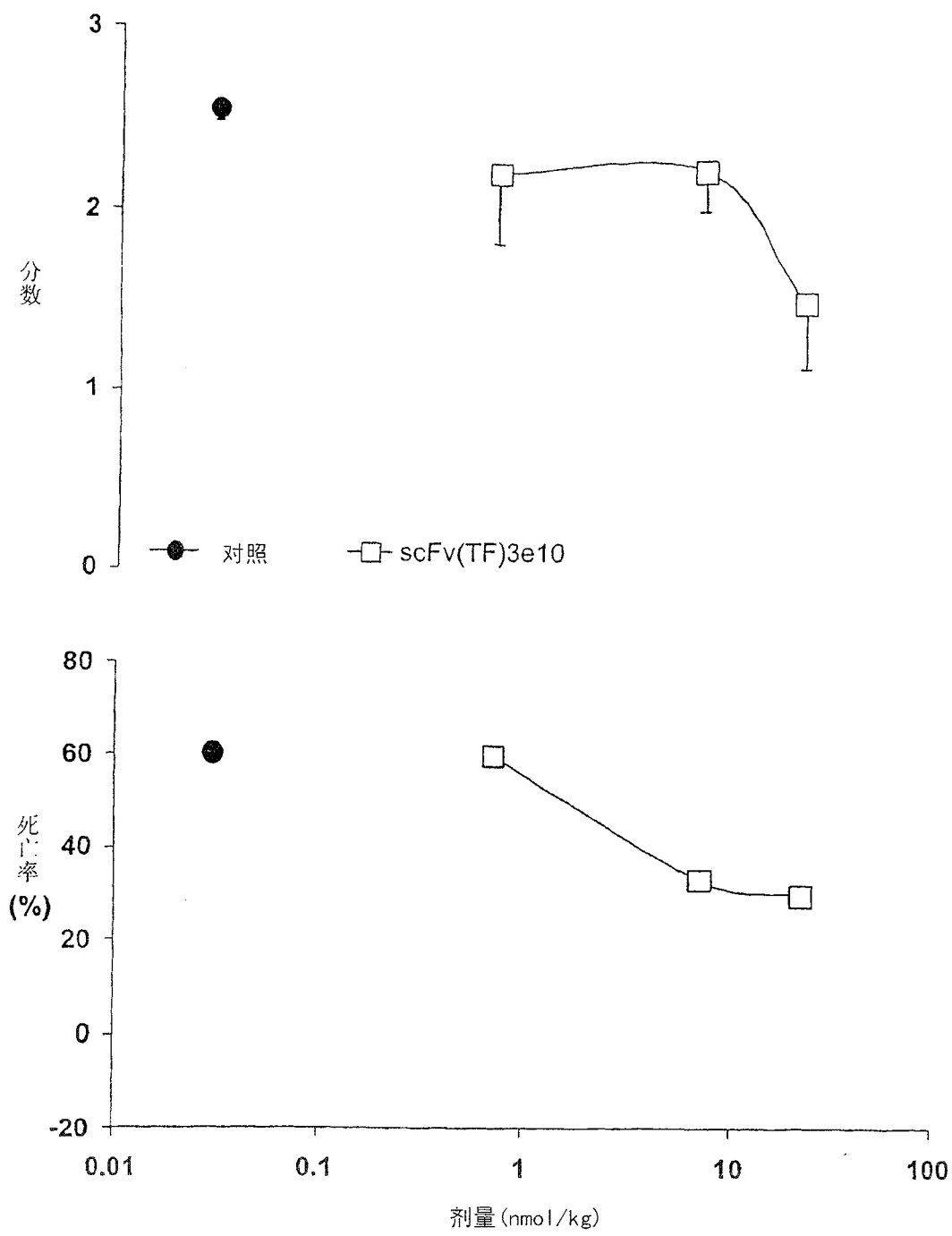


图8