(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111386285 B
(45)授权公告日 2024.08.27

(21)申请号 201880073999.9
(22)申请日 2018.11.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111386285 A
(43)申请公布日 2020.07.07
(30)优先权数据
17201762.6 2017.11.15 EP
18174634.8 2018.05.28 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.05.14
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2018/081296 2018.11.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/096874 EN 2019.05.23

(73)专利权人 诺和诺德股份有限公司
地址 丹麦鲍斯韦
(72)发明人 J·伦德 K·索恩
M·N·哈恩达尔 M-A·拜塞
E·D·塔弗尼尔 S·斯蒂芬森
(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 郜红 郭煜

(51)Int.Cl.
C07K 16/36(2006.01)
(56)对比文件
CN 1890369 A,2007.01.03
审查员 陈茹

权利要求书2页 说明书29页
序列表29页

(54)发明名称

增强FX活化的因子X结合物

(57)摘要

本申请涉及独特的FX结合分子,例如可用于治疗血友病的抗体及其片段。

CN 111386285 B

1.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其CDR1、CDR2和CDR3分别与SEQ ID NO:10的CDR1、CDR2和CDR3相同。

2.根据前述权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其由SEQ ID NO:10组成。

3.根据前述权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少90%相同的重链可变域。

4.根据前述权利要求3所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少91%相同的重链可变域。

5.根据前述权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少92%相同的重链可变域。

6.根据前述权利要求5所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少93%相同的重链可变域。

7.根据前述权利要求6所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少94%相同的重链可变域。

8.根据前述权利要求7所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少95%相同的重链可变域。

9.根据前述权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少96%相同的重链可变域。

10.根据前述权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少97%相同的重链可变域。

11.根据前述权利要求10所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少98%相同的重链可变域。

12.根据前述权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含分别与SEQ ID NO:10所示的序列至少99%相同的重链可变域。

13.根据前述权利要求1-12中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于10μM。

14.根据前述权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于9μM。

15.根据前述权利要求14所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于8μM。

16.根据前述权利要求15所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于7μM。

17.根据前述权利要求16所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于6μM。

18.根据前述权利要求17所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于5μM。

19.根据前述权利要求18所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于4μM。

20.根据前述权利要求19所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于3μM。

21.根据前述权利要求20所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数确定的结合亲和力小于2μ M。

22.根据前述权利要求1-12或14-21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单价的。

23.根据前述权利要求22所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是V_HH。

24.根据前述权利要求22所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体是人源化V_HH或骆驼化V_H域。

25.根据前述权利要求1-12或14-21中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是二价的。

26.根据前述权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是全长mAb。

27.双特异性或多特异性抗体,其包含根据前述权利要求1-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

28.根据前述权利要求1-26中任一项所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗血友病的药物中的用途。

29.根据前述权利要求28所述的抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗血友病的药物中的用途,其中所述血友病为具有或不具有抑制物的A型或B型血友病。

增强FX活化的因子X结合物

[0001] 发明技术领域

[0002] 本发明涉及凝血因子X结合物及其在治疗凝血病如血友病中的用途。

[0003] 序列表的援引并入

[0004] 本申请与电子形式的序列表一起提交。该序列表的全部内容通过引用并入本文。

[0005] 背景

[0006] 在凝血病患者中,诸如在患有A型和B型血友病的人中,凝血级联的各个步骤由于例如凝血因子的缺乏或存在不足而成为功能障碍的。凝血级联的一部分的这种功能障碍导致不充分的血液凝固以及潜在危及生命的出血,或对内部器官如关节的损伤。

[0007] 凝血因子VIII(FVIII)缺乏症,常被称为A型血友病,是影响全世界约420,000人的先天性出血性病症,其中约有105,000人目前得到诊断。

[0008] A型血友病患者可以接受凝血因子替代疗法,如外源性FVIII。常规治疗由替代疗法组成,其作为出血发作的预防或按需治疗而提供。目前针对严重A型血友病患者的医疗标准是每周最多三次预防性静脉内注射血浆来源的FVIII或重组FVIII或其长效变体。

[0009] 然而,这类患者具有生成针对此类外源因子的中和抗体(所谓的“抑制物”)的风险,从而使得先前有效的疗法变得无效。具有“抑制物”(即,针对FVIII的同种抗体)的A型血友病患者是部分先天性、部分获得性的凝血病的非限制性实例。已生成针对FVIII的“抑制物”的患者无法接受常规替代疗法,无论是预防还是按需治疗。

[0010] 此外,外源性凝血因子只可以静脉内给药,这对于患者是相当不便和不适的。例如,婴儿和幼儿可能必须经手术向胸部静脉内插入静脉内导管,以确保静脉通路。这使他们具有很大的发生细菌感染的风险。

[0011] 在出血的个体中,当血管外TF暴露于血液中活化的FVII(FVIIa)时,由组织因子/因子VIIa(TF/VIIa)复合物引发凝血。TF/VIIa复合物的形成导致因子X(FX)被激活为活化的因子Xa(FXa),FXa与活化的因子V(FVa)一起生成有限量的凝血酶。

[0012] 少量的凝血酶激活血小板。活化的血小板支持由活化的因子VIII(FVIIIa)和活化的因子IX(FIXa)组成的tenase复合物的装配和结合。tenase复合物是FX活化的非常有效的催化剂,而在该第二步中生成的FXa充当FVa/FXa凝血酶原酶复合物中的活性蛋白酶,该复合物负责最终的凝血酶爆发。凝血酶裂解纤维蛋白原以生成血纤蛋白单体,血纤蛋白单体聚合形成血纤蛋白网络,该网络密封泄漏的血管并终止出血。快速而广泛的凝血酶爆发是形成固态且稳定的血纤蛋白凝块的先决条件。

[0013] 由凝血因子FVIII活性缺乏引起的FXa形成不足和凝血酶生成减少是A型血友病患者的出血素质的根本原因。

[0014] 如前所述,FX向其酶活性形式FXa的蛋白水解转化可以通过包含FIXa及其辅因子FVIIIa的内在FX激活复合物来实现。辅因子结合使FIXa的酶活性增加约五个数量级,并且据信通过Scheiflinger等人(2008)J Thromb Haemost,6:315-322所概述的多种机制发生。值得注意的是,已发现FVIIIa使FIXa的构象得到稳定,FIXa具有增加的对FX的蛋白水解活性(Kolkman JA,Mertens K(2000)Biochemistry,39:7398-7405,Zögg T,Brandstetter H

(2009)Biol Chem,390:391-400)。基于这一观察结果并意识到抗体是能够模拟多种蛋白质-蛋白质相互作用的通用结合蛋白质,Scheiflinger等人对激动性抗FIXa抗体进行了筛选,这些抗体的特征在于在磷脂表面和钙的存在下,但是在不存在天然辅因子FVIIIa的情况下,增强FIXa对FX的激活的能力。从对5280种杂交瘤上清液的筛选中,发现88种抗体表现出不同程度的FIXa激动活性。

[0015] 先前已经表征了与因子X/Xa结合的抗体(US 8,062,635),并且emicizumab(也被称为ACE910)(US 9,334,331)被批准作为旁路剂,其通过以一个臂与因子IX/IXa结合并且以另一个臂与因子X/Xa结合来模拟FVIIIa的作用。emicizumab的抗FX臂与FX的轻链结合,并且对酶原形式不是特异性的,而是以相当的亲和力与FX和FXa结合。抗FX臂被认为主要是募集FX并使之接近FIXa。

[0016] 因此,虽然模拟FVIIIa的整体活性,但是FVIII模拟化合物emicizumab似乎缺乏FVIIIa的某些固有特异性和功能。具体而言,FVIIIa通过结合磷脂表面上的FIXa和酶原FX,通过刺激FIXa活性将FX活化增强约200,000倍,随后释放FXa来起作用。

[0017] WO2018/021450中公开了据称具有功能改进的ACE910的变体。

[0018] WO2018/098363中公开了其他双特异性抗FIX/抗FX FVIII模拟化合物。

[0019] 本发明涉及刺激生成FXa的FX结合物。因此,这样的分子作为单独的化合物或作为FVIII模拟化合物的组分具有潜在的治疗用途。

发明内容

[0020] 本发明涉及一组FX结合物,如FX抗体或其片段,其能够刺激FX活化,即由FX生成FXa,以及此类FX结合物的鉴定。

[0021] 本发明进一步涉及一组FX结合物,包括抗体及其抗原结合片段,包括免疫球蛋白单可变域,如Nanobodies®,其能够与酶原FX结合而不与活化的FX(FXa)结合。

[0022] 本文公开的FX结合物对FX的结合刺激随后FIXa对FX的激活。在一个方面,结合通过FX的激活肽中的肽段而发生。因此,已经观察到本文公开的FX结合物通过使FX更易于发生FIXa介导的活化来刺激FX活化。

[0023] 在一个方面,相对于活化形式(FXa),与FX的酶原形式的特异性结合防止了FX结合物在生成的FXa上的螯合,从而增加了可用于与酶原FX相互作用的FX结合物的量。此外,与酶原FX的特异性结合避免了对FXa活性的潜在抑制作用(例如干扰凝血酶原酶复合物的装配)。

[0024] 本文公开的FX结合物通过以使FX更易于被FIXa进行蛋白水解的方式与FX结合而表现出意外的功能性质。本发明人惊讶地发现,通过以使FX更易于被FIXa进行蛋白水解并且随后激活的方式进行FX结合,可以实现FIXa对FX的蛋白水解增加。在本领域中存在刺激FIXa蛋白水解活性以将FX转化为FXa的抗FIXa化合物的实例。然而,据我们所知,先前尚不知晓能够与FX结合并通过使FX更易于被FIXa进行蛋白水解而刺激FX活化的化合物。

[0025] 本发明的一个方面涉及与FX结合的FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够刺激FX活化。本发明的另一方面涉及这类化合物的鉴定。

[0026] 本发明的其他方面涉及这类FX结合物(可能但不仅仅作为FVIII模拟化合物的一部分)在治疗方法中的用途。FX活化的刺激可用于刺激凝血,因此这类分子适合于治疗凝血

病,如血友病,包括A型和B型血友病。

[0027] 序列表概述

[0028] SEQ ID NO:1-人因子IX酶原

YNSGKLEEFV QGNLERECME EKCSFEEARE VFENTERTTE FWKQYVDGDQ CESNPCLNGG 60
SCKDDINSYE CWCPFGFEGK NCELDVTCNI KNGRCEQFCK NSADNKVVCS CTEGYRLAEN 120
QKSCEPAVPF PCGRVSVSQT SKLTRAEAVF PDVDYVNSTE AETILDNITQ STQSFNDFTR 180

[0029] VVGGEDAKPG QFPWQVVLNG KVDAFCGGSI VNEKWIVTAA HCVETGVKIT VVAGEHNIEE 240
TEHTEQKRNV IRIIPHHNYN AAINKYNHDI ALLELDEPLV LNSYVTPICI ADKEYTNIFL 300
KFGSGYVSGW GRVFHKGRSA LVLQYLRVPL VDRATCLRST KFTIYNNMFC AGFHEGGRDS 360
CQGDSGGPHV TEVEGTSFLT GIISWGEECA MKGKYGIYTK VSRYVNWIKE KTKLT

[0030] SEQ ID NO:2-人因子X酶原

ANSFLEEMKK GHLERECMEE TCSYEEAREV FEDSDKTNEF WNKYKDGDQC ETSPCQNQGK 60
CKDGLGEYTC TCLEGFEGKN CELFTRKLCS LDNGDCDQFC HEEQNSVVCS CARGYTLADN 120

[0031] GKACIPTGPY PCGKQTLERR KRSVAQATSS SGEAPDSITW KPYDAADLDP TENPFD**LL**DF 180
NQTQPERGDN NLTRIVGGQE CKDGECPWQA LLINEENEGF CGGTILSEFY ILTAAHCLYQ 240
AKRFKVRVGD RNTEQEEGGE AVHEVEVVIK HNRFTKETYD FDIAVLRLKT PITFRMNVAP 300
ACLPERDWAE STLMTQKTGI VSGFGRTHEK GRQSTRLKML EVPYVDRNSC KLSSSFIITQ 360

[0032] NMFCAGYDTK QEDACQGDSG GPHVTRFKDT YFVTGIVSWG EGCARKGKYG IYTKVTAFLK 420
WIDRSMKTRG LPKAKSHAPE VITSSPLK

[0033] 加下划线的:激活肽(aa 143-194)。粗体:“共同最小表位”(aa 177-178)

[0034] SEQ ID NO:3-FX上的“共同最小表位”(在以上SEQ ID NO:2中以粗体示出)

[0035] LL

[0036] SEQ ID NO:4-重链可变域mAb 00916

[0037] QSVEESGGRL VTPGTPLTLT CTVSGFSLSS YAMSWVRQAP GKGLEWIGII STSGSTFYAT 60
WAKGRFTISK TSTTVDLKII SPTIEDTATY FCARDMWAGS RYDFNIWGPG TLVTVSS 117

[0038] SEQ ID NO:5-轻链可变域mAb 00916

[0039] ADIVMTQTPA SVEAAVGGTV TIKCQASQSI SSYLAWYQQK PGQRPKLLIY RASTLESGVP 60
SRFKGSGSGT QFTLTISDLE CADAATYYCQ TYYYSGGGSY ASAFGGGTEV VVK 113

[0040] SEQ ID NO:6-重链可变域mAb 13F62

[0041] EVQLVESGGG QVKPGGSLRL SCAASGFTFS TSSIYWVRQA PGKGLEWVSS ISSGSSYIFY 60
ADSVKGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRAED TAVYYCVSGY SRLLDYWGQG TLVTVSS 117

[0042] SEQ ID NO:7-轻链可变域mAb 13F62

[0043] DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV YSDGNTYLNW FQQRPGQSPR RLIYKVSNRD 60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGF YYCMQGTHWP LTFGGGTKVE IK 112

[0044] SEQ ID NO:8-Nb 701B09

[0045] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVAAISWSGSRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADATPANGELDYWGQGTLVTVSS

[0046] SEQ ID NO:9-Nb 701C06

[0047] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYAMGWFRQAPGKEREFVAAISRRGGRTYYADSVKGRFTISRDN
SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADATARDGLLDYWGQGTLVTVSS

[0048] SEQ ID NO:10-Nb 702C12

[0049] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGRTFSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAISRRGGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADYSSGDGYLDYWGQGTLVTVSS

[0050] SEQ ID NO:11-Nb 701D07

[0051] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGGTLSRYAMGWFRQAPGKEREFVAAITRRGSRTYYADSVKGRFTISRDN

[0052] SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADLAPGDYALDYWGQGTLVTVSS

[0053] SEQ ID NO:12-Nb 501A02

[0054] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYEMSWVRQAPGKGLEWVSDIGSGGGVSTYYADSVKGRFTISRD NAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCARGWTYGSDGMDYWGKGTLVTVSS

[0055] SEQ ID NO 13-53对应于实施例5的表5中列举的序列。

[0056] SEQ ID NO:54-Nb 721E08

[0057] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTFSTYSMGWFRQAPGKEREFVAAITRRGSRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAADRRPADSYLDYWGQGTLVTVSS

[0058] SEQ ID NO:55-Nb 729A04

[0059] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITSGGGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAAVRTLGLRGSYDYWGQGTLVTVSS

[0060] SEQ ID NO:56-Nb 729C08

[0061] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITGGGRTYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRPEDTALYYCAAAILTRTRRTYDYWGQGTLVTVSS

[0062] SEQ ID NO:57-Nb 730C03

[0063] EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGFTFSDYAMSWVRQAPGKGLEWVSGITSGSGRTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRPEDTALYYCAAAILRGYRKTYDYWGQGTLVTVSS

[0064] 带下划线的序列代表使用Kabat编号和定义的mAb的CDR,而Nanobodies®(Nbs)的CDR使用如Kontermann and Dübel(2010,Eds.,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,Chapter 3,pp.33-51)所述的Kabat编号和AbM定义来确定。

[0065] 描述

[0066] FIX是与因子VII、凝血酶原、FX和蛋白C具有结构相似性的维生素K依赖性凝血因子。循环酶原形式由分为四个不同结构域的415个氨基酸组成,这四个结构域包括N-末端富含γ-羧基谷氨酸(Gla)的结构域、两个EGF结构域和C-末端胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域。FIX在血浆中作为单链酶原(SEQ ID NO:1)循环。通过在Arg145和Arg180处的有限蛋白水解来释放激活肽(SEQ ID NO:1的残基146至180),发生FIX的激活。因此,活化的FIX(FIXa)由SEQ ID NO:1的残基1-145(轻链)和SEQ ID NO:1的残基181-415(重链)组成。

[0067] FIXa是一种胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,其通过在凝血过程中生成支持形成适当凝血酶所必需的大多数FXa作为tenase复合物的一部分而在止血中发挥关键作用。

[0068] FX是与因子VII、凝血酶原、FIX和蛋白C具有结构相似性的维生素K依赖性凝血因子。其被合成为具有含有靶向蛋白质的疏水性信号序列的前原序列(pre-pro-sequence)以供分泌。该原肽对于引导γ-羧化得到FX的轻链至关重要。人FX酶原包含四个不同的结构域,包括N-末端富含γ-羧基谷氨酸(Gla)的结构域、两个EGF结构域:分别为EGF1(残基46-82)和EGF2(残基85-125),以及C-末端胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域(残基195-448)。FX在血浆中作为双链酶原循环,其包含SEQ ID NO:2的残基1-139(轻链)和SEQ ID NO:2的残

基143-448(重链)。通过Arg194处的有限蛋白水解——这导致激活肽(残基143-194)的释放,发生FX的激活。因此,活化的FX(FXa)由SEQ ID NO:2的残基1-139(轻链)和SEQ ID NO:2的残基195-448(活化的重链)组成。

[0069] 如本文所用的术语“结合物”应以其最广泛的意义来理解,并且包括例如凝集素、蛋白质、多肽和肽以及所有FX结合分子或物质。FX结合分子包括,例如,抗体及其抗原结合片段(例如但不限于单可变域抗体、Nanobodies®、Fab、Fab'$_2$、Fv和scFv)、亲和体(affibodies)、adnectin、anticalin、DARPin、avimer。

[0070] 如本文所用的术语“抗体”是指自免疫球蛋白序列衍生的蛋白质,其能够与抗原或其一部分结合。术语抗体包括但不限于任何类别(或同种型)的全长抗体,即IgA、IgD、IgE、IgG、IgM和/或IgY。与抗原或其片段特异性结合的抗体可仅与该抗原或其部分或片段结合,或者其可以与有限数目的同源性抗原结合。通常,使用简单的术语“结合”或“与...结合”,并且通常应理解,抗体或其片段的结合是“特异性”结合。如果在同源抗原之间共有表位,则抗体可以进一步结合这类高度同源的抗原是合乎逻辑的。术语抗体包括多价抗体,例如二价抗体,如双特异性抗体。

[0071] 天然的全长抗体包含至少四条多肽链:通过二硫键连接的两条重链(HC)和两条轻链(LC)。在一些情况下,天然抗体包含少于四条链,如在软骨鱼类(Chondrichthyes)中发现的IgNAR的情况。药学上特别感兴趣的一类免疫球蛋白是IgG。在人类中,根据其重链恒定区的序列,IgG类别可被分为4个亚类:IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。根据其序列组成的差异,轻链可被分为两种类型:κ和λ链。IgG分子由两条通过两个或更多个二硫键相互连接的重链和两条各自通过二硫键连接至重链的轻链组成。IgG重链可包含一个重链可变域(V_H)和最多三个重链恒定(C_H)域:C_H1、C_H2和C_H3。轻链可包含轻链可变域(V_L)和轻链恒定域(C_L)。V_H和V_L域可进一步细分为被称为互补决定区(CDR)或高变区(HvR)的高变性区域,其中散布有被称为框架区(FR)的更加保守的区域。V_H和V_L域通常由三个CDR和四个FR组成,它们从氨基末端到羧基末端以如下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。含有高变区(CDR)的重链和轻链可变域构成能够与抗原相互作用的结构,而抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,该宿主组织或因子包括但不限于免疫系统的各种细胞(效应细胞)、Fc受体和经典补体系统的C1复合物的第一组分,C1q。

[0072] 本发明的抗体可以是单克隆抗体(mAb),这是从它们代表由单个B细胞或由B细胞的克隆群体表达的一组独特的重链和轻链可变域序列这个意义来讲的。本发明的抗体可采用本领域技术人员已知的各种方法来生产并纯化。例如,抗体可从杂交瘤细胞产生。抗体可通过B细胞扩充来产生。抗体或其片段可以在哺乳动物或微生物表达系统中或通过体外翻译来重组表达。抗体或其片段还可通过例如噬菌体展示、细菌展示、酵母展示、哺乳动物细胞展示或核糖体或mRNA展示而重组表达为细胞表面结合的分子。

[0073] 本发明的抗体可以是分离的。术语“分离的抗体”是指已经从其产生环境中的其他组分中分离和/或回收的抗体,和/或已经从在其产生环境中存在的组分的混合物中纯化的抗体。

[0074] 抗体的某些抗原结合片段在本发明的情况下可能是合适的,因为已经证明,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来行使。术语抗体的“抗原结合片段”是指抗体的一个或多个片段,其保留如本文所述的结合或识别抗原如FX或另一种靶分子的能力。抗原结合

片段的实例包括(但不限于)Fab、Fab′、Fab_2、Fab′$_2$、Fv(一般为抗体单臂的V_L和V_H域的组合)、单链Fv(scFv);参见例如Bird等人,Science 1988242:423-426;和Huston等人,PNAS 1988 85:5879-5883)、dsFv、Fd(一般为V_H和C_H1域);包含单个V_H和单个V_L链的单价分子;微体(minibodies)、双抗体(diabodies)、三抗体(triabodies)、四抗体(tetrabodies)和κ体(kappa bodies)(参见例如Ill等人(1997)Protein Eng 10:949-57);以及一个或多个分离的CDR或功能互补位,其中分离的CDR或抗原结合残基或多肽可以缔合或连接在一起,以形成功能性抗体片段。这些抗体片段可采用本领域技术人员已知的常规技术获得,并且可以以与完整抗体相同的方式针对应用性筛选这些片段。

[0075] 抗体的“Fab片段”,包括“Fab”和“Fab'$_2$”片段,可通过在连接抗体重链的铰链半胱氨酸残基的N-末端或C-末端侧上的铰链区中切割重链而由所述抗体得到。“Fab”片段包括轻链的可变域和恒定域以及重链的可变域和C_H1域。“Fab'$_2$”片段包含一对通常通过其铰链半胱氨酸共价连接的“Fab”片段。Fab′通过切割Fab'$_2$中连接重链的铰链二硫键而在形式上衍生自Fab'$_2$片段。除了抗体片段的二硫键连接以外的其他化学偶联也是本领域已知的。Fab片段保留了亲本抗体与其抗原结合的能力,潜在地具有更低的亲和力。Fab'$_2$片段能够二价结合,而Fab和Fab'片段能够单价结合。通常,Fab片段缺乏恒定C_H2和C_H3域,即在其中将发生与Fc受体和C1q的相互作用的Fc部分。因此,Fab片段通常缺乏效应功能。Fab片段可以通过本领域已知的方法通过抗体的酶切而产生,例如使用木瓜蛋白酶以获得Fab或使用胃蛋白酶以获得Fab'$_2$,包括Fab、Fab′、Fab'$_2$在内的Fab片段可以使用本领域技术人员公知的技术重组产生。

[0076] “Fv”(片段可变)片段是含有完全抗原识别和结合位点的抗体片段,且通常包含缔合(其在性质上可以是共价的)的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体,例如在单链可变域片段(scFv)中。以这种构型,每个可变域的三个高变区相互作用,以在V_H-V_L二聚体的表面上限定出抗原结合位点。这六个高变区或其亚组共同地对抗体赋予抗原结合特异性。

[0077] “单链Fv”或“scFv”抗体包含抗体的VH和V_L域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常,Fv多肽进一步在V_H和V_L域之间包含多肽连接体,该连接体使得scFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于scFv的综述,参见Pluckthun,1994,In:The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,Vol.113,Rosenburg and Moore eds.Springer-Verlag,New York,pp.269-315。

[0078] “单链Fab”或“scFab”抗体包含抗体的V_H、C_H1、V_L和C_L域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常,Fab多肽还在V_H和C_L或V_L和C_H1域之间包含多肽连接体,该连接体使得scFab能够形成用于抗原结合的所需结构(Koerber等人(2015)J Mol Biol.427:576-86)。

[0079] 术语“双抗体(diabodies)”是指具有两个抗原结合位点的小抗体片段,其中片段包含在同一多肽链(V_H和V_L)中连接至轻链可变域(V_L)的重链可变域(V_H)。通过使用由于过短而无法允许在同一条链上的两个可变域之间配对的连接体,使得这些可变域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点。

[0080] 表述“线性抗体”是指如在Zapata等人(1995)Protein Eng.8:1057-1062中描述的抗体。简言之,这些抗体含有一对串联的Fd区段(V_H-C_H1-V_H-C_H1),该区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0081] 可采用常规的重组或蛋白质工程技术获得抗体片段,并且可以以与完整抗体相同

的方式,针对与抗原如FX的结合筛选这些片段。

[0082] 本发明的抗体片段可通过截短,例如通过从多肽的N-末端和/或C-末端去除一个或多个氨基酸来制备。也可以通过一个或多个内部缺失来生成片段。

[0083] 本发明的抗体可以是或者可包含抗体的片段或本文公开的抗体中任意一种的变体。本发明的抗体可以是或可包含这些抗体之一的抗原结合部分或其变体。例如,本发明的抗体可以是这些抗体之一的Fab片段或其变体,或者其可以是衍生自这些抗体之一的单链抗体或其变体。而且,本发明的抗体可以是全长抗体及其片段的组合。

[0084] 然而,即使仅包含三个抗原特异性高变区的单可变域也可保留识别并以高亲和力结合抗原的能力,尽管其亲和力通常低于完整的结合位点(Cai&Garen(1996)PNAS93:6280-6285)。仅具有重链可变域(V_HH)的天然存在的骆驼科抗体可以结合抗原(Desmyter等人(2002)J.Biol.Chem.277:23645-23650;Bond等人(2003)J.Mol.Biol.332:643-655)。同样,来自软骨鱼类的IgNAR(或V_{NAR})提供了单域抗体结合区。Creative Biolabs提供了一种替代物,其使用人类第十个纤连蛋白FN3域(10FN3域)作为支架。这类抗体分子被称为单可变域、免疫球蛋白单可变域或单可变域片段。所述分子是单体的,通常大小为12-15kDa。

[0085] 特别是,免疫球蛋白单可变域或单可变域可以是Nanobody®(如本文所定义)或其合适的片段。关于Nanobodies®的一般性描述,请参考例如WO2008/020079(第16页)。

[0086] 与“单可变域”可互换使用的术语“免疫球蛋白单可变域”定义了其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白域上并由单个免疫球蛋白域形成的分子。这将免疫球蛋白单可变域设置为与“常规”免疫球蛋白或其片段(如Fab、scFv等)分开,其中如上所述,两个免疫球蛋白结构域,特别是两个可变域(重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L))相互作用形成抗原结合位点。相反,免疫球蛋白单可变域的结合位点由单个V_H或V_L域形成。因此,免疫球蛋白单可变域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0087] 因此,术语“免疫球蛋白单可变域”和“单可变域”不包含常规的免疫球蛋白或其片段,后者需要至少两个可变域相互作用来形成抗原结合位点。然而,这些术语确实包含常规免疫球蛋白的片段,其中抗原结合位点由单可变域形成。

[0088] 通常,单可变域将是基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成的多肽序列;或者,这样的多肽序列的任何合适的片段(其然后通常会含有至少一些形成至少一个CDR的氨基酸残基)。免疫球蛋白序列的氨基酸序列和结构,特别是免疫球蛋白单可变域,如Nanobody®,可以被认为——但不限于——由四个框架区或“FR”组成,它们在本领域中并且在本文中分别被称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;和“框架区4”或“FR4”;这些框架区被三个互补决定区或“CDR”打断,这些CDR在本领域中分别被称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。

[0089] 免疫球蛋白单可变域的总长度通常为,例如对于Nanobody®在110-120个氨基酸残基的区域中,优选为112-115,最优选为113个氨基酸残基。

[0090] 这样的单可变域和片段最优选使得它们包含免疫球蛋白折叠或者能够在合适的条件下形成免疫球蛋白折叠。这样,单可变域可以例如包含轻链可变域序列(例如V_L序列)或其合适的片段;或重链可变域序列(例如,V_H序列或V_HH序列)或其合适的片段;只要它能够

形成单个抗原结合单元(即基本上由单可变域组成的功能性抗原结合单元,使得单个抗原结合域不需要与另一个可变域相互作用即可形成功能性抗原结合单元,而例如对于存在于例如常规抗体和scFv片段中的可变域,其需要与另一个可变域相互作用——例如通过V_H/V_L相互作用——以形成功能性抗原结合域)。

[0091] 在本发明的一个实施方案中,免疫球蛋白单可变域是轻链可变域序列(例如V_L序列)或重链可变域序列(例如V_H序列);更具体地,免疫球蛋白单可变域可以是衍生自常规四链抗体的重链可变域序列或衍生自重链抗体的重链可变域序列。

[0092] 例如,单可变域或免疫球蛋白单可变域(或适合用作免疫球蛋白单可变域的氨基酸序列)可以被称为(单)域抗体;"dAb"或"sdAb"或Nanobody®(包括但不限于V_HH、人源化V_HH或骆驼化V_H域);其他单可变域,或其任何一种的任何合适的片段。关于(单)域抗体的一般性描述,还参见例如EP0368684。关于术语"dAb",参见例如Ward等人.1989(Nature 341:544),Holt等人.2003(Trends Biotechnol.21:484);以及例如WO2004/068820、WO2006/030220、WO2006/003388和其他已公开的Domantis Ltd.的专利申请。

[0093] 因此,在本发明的含义中,术语"免疫球蛋白单可变域"或"单可变域"包括来源于非人类来源、优选骆驼科动物的多肽,优选骆驼科重链抗体(例如,V_HH)。它们可以是人源化的(例如,人源化的V_HH)。而且,该术语包括已被"骆驼化"的来源于非骆驼科来源例如小鼠或人类的多肽(例如骆驼化的V_H域),例如,如Davies and Riechmann 1994(FEBS 339:285),1995(Biotechonol.13:475)和1996(Prot.Eng.9:531)以及Riechmann and Muyldermans 1999(J.Immunol.Methods 231:25)所述。

[0094] 如本文所用的术语"单特异性"抗体是指能够与一种特定表位结合的抗体(包括但不限于二价抗体)。

[0095] 如本文所用的术语"双特异性"抗体是指能够与两种不同抗原或相同抗原上的两种不同表位结合的抗体。

[0096] 如本文所用的术语"三特异性"抗体是指能够与三种不同抗原或相同抗原上的三种不同表位或两种不同抗原上存在的三种不同表位结合的抗体。

[0097] 如本文所用的术语"多特异性"抗体是指能够与两种或更多种不同抗原或相同抗原上的两种或更多种不同表位结合的抗体。因此,多特异性抗体包括双特异性和三特异性抗体。

[0098] 全长IgG形式的双特异性抗体可以通过两个单独的杂交瘤融合以形成杂合四价体瘤而生成,该四价体瘤产生包括双特异性异二聚化抗体的一部分的抗体混合物(Chelius D.等人;MAbs.2010年5-6月;2(3):309-319)。或者,双特异性异二聚化抗体可以通过使用重组技术产生。异二聚化也可以通过改造Fc区的二聚化界面以促进异二聚化来实现。其中一个实例是所谓的把手-孔穴式(knob-in-hole)突变,其中空间上庞大的侧链(把手)被引入一个Fc中,该Fc被相对Fc上的空间上较小的侧链(孔穴)匹配,从而产生促进异二聚化的空间互补性。用于工程构建异二聚化Fc界面的其他方法是静电互补、与非IgG异二聚化结构域融合或利用人IgG4的自然Fab-臂交换现象来控制异二聚化。异二聚化的双特异性抗体的实例在文献中有充分描述,例如(Klein C等人;MAbs.2012年11-12月;4(6):653-663)。必须特别注意异二聚体抗体中的轻链。通过使用共同的轻链可以实现LC与HC的正确配对。再次,LC/HC界面的工程化可用来促进异二聚化或轻链交叉工程化,如CrossMabs。在温和还原条

件下,在体外从含有适当突变的两个单独IgG重装配抗体也可以用来生成双特异性抗体(例如,Labrijn等人,PNAS,110,5145-5150(2013))。还报道了自然Fab-臂交换方法以确保正确的轻链配对。

[0099] 基于多特异性抗体的分子也可以被重组表达为融合蛋白,该融合蛋白组合了IgG的天然模块以形成如文献中描述的多特异性和多价抗体衍生物。融合抗体的实例是DVD-Ig、IgG-scFV、双抗体、DART等。可以将特异性检测或纯化标签、半衰期延长部分或其他组分掺入融合蛋白中。另外的非IgG模式也可以掺入融合蛋白中。基于F_c异二聚化的双特异性全长抗体通常被称为不对称IgG,与LC配对方法无关。通常,如Brinkmann等人(Brinkmann等人.The making of bispecific antibodies.Mabs9,182-212(2017))所综述的,双特异性抗体可以以多种分子形式产生。

[0100] 基于多特异性抗体的分子还可以通过化学缀合或偶联单独的全长IgG或偶联IgG的片段以形成如文献中描述的多特异性和多价抗体衍生物来产生。融合抗体的实例是化学偶联的Fab'_2、IgG二聚体等。特异性检测或纯化标签、半衰期延长分子或其他组分可以掺入缀合蛋白中。另外的非IgG多肽也可以掺入融合蛋白中。多特异性分子也可以通过组合重组和化学方法来产生,包括上述那些方法。

[0101] 如本文所公开的抗FX抗体或其抗原结合片段可以用作多特异性促凝血抗体的一部分。因此,本发明的一个方面涉及适合用于多特异性促凝血抗体如双特异性促凝血抗体中的单独组分(中间体)抗FX抗体或其抗原结合片段。在一个方面,这样的双特异性(或多特异性)抗体能够与FIX和/或其活化形式FIXa以及FX结合。

[0102] 在一个方面,本发明的抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。这样的抗体可以通过使用例如合适的抗体展示或免疫平台或本领域已知的其他合适的平台或方法来产生。如本文所用的,术语“人抗体”旨在包括具有可变域的抗体,在该可变域中,框架区的至少一部分和/或CDR的至少一部分来源于人种系免疫球蛋白序列。(例如,人抗体可具有其中框架区和CDR均来源于人种系免疫球蛋白序列的可变域。)此外,如果抗体含有恒定区,则该恒定区或其部分也来源于人种系免疫球蛋白序列。本发明的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0103] 在一个方面,这样的人抗体是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以由杂交瘤产生,该杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的B细胞,该B细胞从转基因非人类动物例如转基因小鼠获得,具有包含人免疫球蛋白重链和轻链基因区段的所有组成成分的基因组。

[0104] 人抗体可以从基于人种系序列的选择而建立的、用天然和合成序列多样性进一步多样化的序列文库中分离。

[0105] 人抗体可以通过人淋巴细胞的体外免疫及随后用EB病毒转化该淋巴细胞来制备。

[0106] 术语“人抗体衍生物”是指人抗体的任何修饰形式,如抗体与另一种化合物或抗体的缀合物。

[0107] 如本文所用的,术语“人源化抗体”是指含有来源于非人免疫球蛋白的序列(CDR或其部分)的人/非人嵌合抗体。因此,人源化抗体是这样的人免疫球蛋白(接受体抗体),其中至少来自该接受体的高变区的残基被来自非人类物种如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物的抗体(供体抗体)的高变区的残基所替代,其具有所需的特异性、亲和力、序列组成和功能

性。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架(FR)残基被相应的非人类残基所替代。这类修饰的一个实例是引入一个或多个所谓的回复突变,该回复突变一般是来源于供体抗体的氨基酸残基。抗体的人源化可采用本领域技术人员已知的重组技术进行(参见,例如,Antibody Engineering,Methods in Molecular Biology,vol.248,由Benny K.Lo编著)。对轻链和重链可变域均适合的人类接受体框架可通过例如序列或结构同源性来鉴定。或者,例如,可基于对结构、生物物理学和生物化学性质的了解使用固定的接受体框架。该接受体框架可以是种系衍生的或衍生自成熟的抗体序列。来自供体抗体的CDR可以通过CDR移植进行转移。可通过确定关键框架位置来进一步在例如亲和力、功能性和生物物理学性质方面优化CDR移植的人源化抗体,在该关键框架位置处再次引入(回复突变)来自供体抗体的氨基酸残基对人源化抗体的性质具有有利影响。除了来源于供体抗体的回复突变外,还可通过在CDR或框架区中引入种系残基、消除免疫原性表位、定点诱变或亲和力成熟等对人源化抗体进行工程化。

[0108] 在进一步的方面,人源化抗体包含在接受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。通常,人源化抗体包含至少一个-一般两个-可变域,其中全部或基本上全部的CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且其中全部或基本上全部的FR残基是人免疫球蛋白序列的FR残基。人源化抗体也可任选地包含免疫球蛋白恒定区的至少一部分(Fc),一般是人免疫球蛋白的相应部分。

[0109] 术语“人源化抗体衍生物”是指人源化抗体的任何修饰形式,如抗体与化学化合物的缀合物或抗体与另一抗体的缀合物。

[0110] 如本文所用的,术语“嵌合抗体”是指包含来源于两个或更多个物种的抗体的部分的抗体。例如,编码这类抗体的基因包括编码源自两个不同物种的可变域的基因和编码源自两个不同物种的恒定区的基因。例如,编码小鼠单克隆抗体的可变区段的基因可以连接至编码人源抗体的恒定区的基因。

[0111] 抗体的片段可结晶区(“Fc区”/“Fc域”)是包含铰链和恒定C_H2和C_H3域的抗体C-末端区。Fc域可与被称为Fc受体的细胞表面受体以及补体系统的一些蛋白质相互作用。Fc区使得抗体能够与免疫系统相互作用。在本发明的一个方面,可对抗体进行工程化以在Fc区内包含修饰,一般用来改变其一种或多种功能性质,如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合、蛋白质稳定性和/或抗原依赖性细胞毒性,或这些性质的缺乏,等等。此外,可对本发明的抗体进行化学修饰(例如,可将一个或多个化学部分连接至该抗体)或进行修饰以改变其糖基化,从而再次改变该抗体的一种或多种功能性质。IgG1抗体可携带修饰的Fc域,该Fc域包含一个或多个以及可能全部以下突变,这些突变将分别导致对某些Fc-γ受体的亲和力降低(L234A、L235E和G237A)以及C1q介导的补体固定减少(A330S和P331S)(残基根据EU索引编号)。

[0112] 本发明抗体的同种型可以是IgG,如IgG1,如IgG2,如IgG4。如果需要,抗体的类别可通过已知技术进行“转换”。例如,最初作为IgM分子产生的抗体可以类别转换为IgG抗体。还可利用类别转换技术将一个IgG亚类转换成另一个亚类,例如:从IgG1转换成IgG2或IgG4;从IgG2转换成IgG1或IgG4;或从IgG4转换成IgG1或IgG2。还可以进行通过来自不同IgG亚类的区域的组合而生成恒定区嵌合分子的抗体工程化。

[0113] 在一个实施方案中,对C_H1的铰链区进行修饰,以使得该铰链区中的半胱氨酸残基

数目发生改变,例如增加或减少。该方法在例如Bodmer等人的第5,677,425号美国专利中进一步描述。

[0114] 可对恒定区进行修饰以使抗体稳定化,例如,降低二价抗体分离成两个单价VH-VL片段的风险。例如,在IgG4恒定区中,残基S228(根据EU编号索引,根据Kabat为S241)可突变成脯氨酸(P)残基,以使铰链处的重链间二硫键形成得到稳定(参见,例如,Angal等人.Mol Immunol.1993;30:105-8)。

[0115] 抗体或其片段可按照其互补决定区(CDR)来定义。术语"互补决定区"或"高变区"在本文中使用时是指参与抗原结合的氨基酸残基位于其中的抗体区域。高变区或CDR可被鉴定为在抗体可变域的氨基酸比对中具有最高可变性的区域。数据库如Kabat数据库可用于CDR鉴定,例如,CDR被定义为包含轻链可变域的氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3)以及重链可变域的31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);(Kabat等人.1991;Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。或者,CDR可被定义为来自"高变环"的那些残基(轻链可变域中的残基26-33(L1)、50-52(L2)和91-96(L3)以及重链可变域中的26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.1987;196:901-917)。通常,该区域中氨基酸残基的编号通过Kabat等人(同上)描述的方法进行。本文中诸如"Kabat位置"、"Kabat残基"和"根据Kabat"等短语是指用于重链可变域或轻链可变域的这一编号体系。通过使用Kabat编号体系,肽的实际线性氨基酸序列可含有较少的或额外的氨基酸,这对应于可变域的框架(FR)或CDR的缩短或向其中的插入。例如,重链可变域可包含在CDR H2的残基52后的氨基酸插入(根据Kabat的残基52a、52b和52c)以及在重链FR残基82后插入的残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列的同源性区域与"标准的"Kabat编号的序列进行比对,来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0116] V_HH域的氨基酸残基可以按照Kabat等人给出的应用于来自骆驼科动物的V_HH域的V_H域通用编号来编号,例如,如在Riechmann and Muyldermans(1999,J.Immunol.Methods 231:25-38)的图2中所示。对VH域的氨基酸残基进行编号的替代方法是本领域已知的,这些方法也可以以类似的方式应用于V_HH域。CDR的确定也可以按照不同的方法来进行。在根据Kabat的CDR确定中,V_HH的FR1包含1-30位的氨基酸残基,V_HH的CDR1包含31-35位的氨基酸残基,V_HH的FR2包含36-49位的氨基酸残基,V_HH的CDR2包含50-65位的氨基酸残基,V_HH的FR3包含66-94位的氨基酸残基,V_HH的CDR3包含95-102位的氨基酸残基,且V_HH的FR4包含103-113位的氨基酸残基。

[0117] 在本文件中,使用根据Kontermann and Dübel(2010,Eds.,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,Chapter 3,pp.33-51)的AbM定义来确定单可变域抗体(Nanobodies®)的CDR序列。根据该方法,FR1包含1-25位的氨基酸残基,CDR1包含26-35位的氨基酸残基,FR2包含36-49位的氨基酸残基,CDR2包含50-58位的氨基酸残基,FR3包含59-94位的氨基酸残基,CDR3包含95-102位的氨基酸残基,且FR4包含103-113位的氨基酸残基(根据Kabat编号)。

[0118] 在本文件中,使用根据Kontermann and Dübel(2010,Eds.,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,Chapter 3,pp.33-51)的Kabat定义来确定IgG抗体(包括全长IgG抗体及其Fab片段)的CDR序列。根据该方法,

将轻链可变域的CDR定义为位置24-34(CDR1)、位置50-56(CDR2)和位置89-97(CDR3),而将重链可变域的CDR定义为位置31-35(CDR1)、位置50-65(CDR2)和位置95-102(CDR3)。

[0119] 术语“框架区”或“FR”残基是指如本文定义的不在CDR内的那些V_H或V_L氨基酸残基。

[0120] 在一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可包含来自本文公开的一种或多种特异性抗体的CDR。

[0121] 术语“促凝血抗体”是指例如通过加速血液凝固过程和/或增加一种或多种凝血因子的酶活性来增强血液凝固的抗体。

[0122] 术语“促凝血活性”是指化合物如抗体例如通过加速血液凝固过程和/或增加一种或多种凝血因子的酶活性来增强血液凝固的能力。

[0123] 应当指出——如本领域中对于V_H域和V_HH域所公知的——每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可能不对应于由Kabat编号所示的氨基酸残基总数(即,根据Kabat编号的一个或多个位置可能不在实际序列中占据,或者实际序列可含有比Kabat编号所允许的数目更多的氨基酸残基)。这意味着,通常,根据Kabat的编号可以对应于或可以不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。V_H域和V_HH域中氨基酸残基的总数通常在110至120的范围内,通常在112至115之间。然而,应当指出,更小和更长的序列也可能适用于本文所述的目的。本发明的抗体可包含来自本文公开的一种或多种特异性抗体的CDR。

[0124] 术语“抗原”(Ag)是指用于对免疫活性脊椎动物进行免疫以产生识别该Ag的抗体(Ab)的分子实体。在本文中,Ag的含义更加广泛,并且通常旨在包括被Ab特异性识别的靶分子,因此包括在用于产生Ab的免疫过程或其他过程例如噬菌体展示中使用的分子片段或模拟物。

[0125] 如本文所用的术语“表位”在“抗原结合多肽”如抗体(Ab)与其相应抗原(Ag)之间的分子相互作用的背景下来定义。通常,“表位”是指在Ag上的、与Ab特异性结合的区或区域,即与Ab物理接触的区或区域。物理接触可采用针对Ab和Ag分子中的原子的各种标准(例如,距离截止值为2-6 Å,如3 Å,如3.5 Å,如4 Å,如4.5 Å,如5 Å;或溶剂可及性)来定义。

[0126] FX/FXa可包含许多不同的表位,这些表位可包括但不限于(1)线性肽表位;(2)由在成熟FX/FXa构象中彼此靠近的一个或多个非连续氨基酸组成的构象表位;以及(3)全部或部分由共价连接至FX/FXa的分子结构如碳水化合物基团组成的表位。

[0127] 可采用多种实验性和计算性表位作图方法在不同的详细度水平上描述和表征给定抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位。这些实验性方法包括诱变、X射线晶体学、核磁共振(NMR)谱法、氢氘交换质谱法(HDX-MS)以及各种竞争结合方法;本领域已知的方法。由于每种方法均依赖于独特的原理,因此对表位的描述与确定表位的方法紧密相关。因此,根据所采用的表位作图方法,给定Ab/Ag对的表位可有不同的描述。

[0128] 给定抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位和互补位可通过常规方法来鉴定。例如,表位的一般位置可通过评估抗体与FX的不同片段或变体结合的能力来确定。FX内与抗体接触的特定氨基酸(表位)和在抗体中与FX接触的特定氨基酸(互补位)也可使用常规方法来确定。根据本发明的抗体可以能够与另一种分子如天然存在的配体或受体或另一种抗体竞争结合FX。

[0129] 可以进行竞争性结合试验,其中将抗体与靶标的结合跟该靶标的另一种配体如另

一种抗体对该靶标的结合进行比较。

[0130] 与相同抗原结合的抗体可就其同时与其共同抗原结合的能力进行表征,并且可以经历“竞争结合”/“分箱(binning)”。在该语境下,术语“分箱”是指对与相同抗原结合的抗体进行分组的方法。抗体的“分箱”可以基于在以标准技术为基础的试验中两种抗体与其共同抗原的竞争结合。

[0131] 使用参考抗体来定义抗体的“箱元”。如果第二抗体不能与参考抗体同时与抗原结合,则称第二抗体与参考抗体属于同一“箱元”。在这种情况下,参考抗体和第二抗体竞争性地结合抗原的相同部分,因此被认为是“竞争抗体”。如果第二抗体能够与参考抗体同时与抗原结合,则称第二抗体属于不同的“箱元”。在这种情况下,参考抗体和第二抗体不会竞争性地结合抗原的相同部分,因此被认为是“非竞争抗体”。

[0132] 抗体“分箱”不提供关于表位的直接信息。

[0133] 竞争抗体,即属于同一“箱元”的抗体,可具有相同的表位、重叠的表位或甚至不同的表位。如果与其在抗原上的表位结合的参考抗体占据了第二抗体与其在抗原上的表位接触所需的空间(“空间位阻”),则是后一种情况。非竞争抗体通常具有不同的表位。因此,在一些实施方案中,本发明的抗体将与至少一种本文具体公开的抗体结合相同的表位。

[0134] 用于确定抗体是否与本文公开的抗FX抗体结合相同的表位或与之竞争结合的竞争试验是本领域已知的。示例性的竞争试验包括免疫测定(例如,ELISA测定、RIA测定)、表面等离子体共振分析(例如,使用BIAcore™仪器)、生物层干涉测量法和流式细胞术。通常,竞争试验涉及使用与固体表面结合或在细胞表面上表达的抗原、测试FX结合抗体和参考抗体。参考抗体被标记,而测试抗体未被标记。通过测定在测试抗体的存在下与固体表面或细胞结合的经标记参考抗体的量来测量竞争性抑制。通常,测试抗体相对于参考抗体过量存在(例如,1、5、10、20、100、1000、10000或100000倍)。在竞争试验中被鉴定为具有竞争性的抗体(即,竞争抗体)包括与参考抗体结合相同表位或重叠表位的抗体,以及结合与参考抗体所结合的表位足够接近以发生空间位阻的相邻表位的抗体。

[0135] 在示例性竞争试验中,使用可商购获得的试剂对参考抗FX或抗FXa抗体进行生物素化。将生物素化的参考抗体与测试抗体或未标记的参考抗体(自竞争对照)的系列稀释液混合,得到各种摩尔比(例如,1、5、10、20、100、1000、10000或100000倍)的测试抗体(或未标记的参考抗体)与标记的参考抗体的混合物。将该抗体混合物加至FX或FXa多肽包被的ELISA板上。然后洗板,并将辣根过氧化物酶(HRP)-链霉抗生物素蛋白加至板上作为检测试剂。在加入本领域已知的生色底物(例如,TMB(3,3′,5,5′-四甲基联苯胺)或ABTS(2,2″-连氮-二-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸盐))后检测与靶抗原结合的经标记参考抗体的量。光密度读数(OD单位)使用光谱仪(例如,SpectraMax®M2光谱仪(Molecular Devices))来测量。对应于0%抑制的响应(OD单位)从没有任何竞争抗体的孔确定。对应于100%抑制的响应(OD单位),即试验背景,从没有任何经标记的参考抗体或测试抗体的孔确定。在每种浓度下测试抗体(或未标记的参考抗体)对FX或FXa的标记参考抗体的抑制百分比计算如下:%抑制=(1-(OD单位-100%抑制)/(0%抑制-100%抑制))*100。

[0136] 本领域技术人员知晓,可以进行类似的试验来确定两种或更多种抗FX/FXa抗体是否共有结合区、箱元并且/或者竞争性结合抗原。本领域技术人员还会理解,可以通过使用本领域已知的各种检测系统来进行竞争试验。

[0137] 如果过量的一种抗体(例如,1、5、10、20、100、1000、10000或100000倍)抑制另一种抗体的结合,如在竞争性结合试验中测量的,例如抑制至少50%、75%、90%、95%或99%,则测试抗体与参考抗体竞争结合抗原。方法部分5中提供了竞争试验的一个实例。

[0138] 术语"结合亲和力"在本文中用作两种分子(例如抗体或其片段和抗原)之间的非共价相互作用的强度的度量。术语"结合亲和力"用来描述单价相互作用。

[0139] 通过测定平衡解离常数(K_D),可以对两种分子(例如抗体或其片段和抗原)之间通过单价相互作用的结合亲和力进行定量。通过测量复合物形成和解离的动力学,例如通过表面SPR法,可以测定K_D。与单价复合物的结合和解离相对应的速率常数分别被称为结合速率常数k_a(或$k_{结合}$)和解离速率常数k_d(或$k_{解离}$)。通过方程$K_D=k_d/k_a$,将K_D与k_a和k_d相关联。

[0140] 按照上面的定义,通过比较单个抗体/抗原复合物的K_D值,可以比较与不同的分子相互作用有关的结合亲和力,例如比较不同抗体对给定抗原的结合亲和力。

[0141] 可以通过众所周知的方法直接测定解离常数的值。用来评价诸如抗体等配体与靶标的结合能力的标准试验是本领域已知的,并且包括,例如,ELISA、Western印迹法、RIA和流式细胞术分析。通过本领域已知的标准试验,如SPR,也可以评估抗体的结合动力学和结合亲和力。本文实施例2中提供了SPR结合试验的一个实例。

[0142] FX结合物,如本发明的抗体或其片段,对其靶标的K_D可以是$1x10^{-4}$M或更低,$1x\ 10^{-5}$M或更低,$1x\ 10^{-6}$M或更低,$1x\ 10^{-7}$M或更低,$1x\ 10^{-8}$M或更低,或$1x\ 10^{-9}$M或更低,或$1x\ 10^{-10}$M或更低,$1x\ 10^{-11}$M或更低,$1x\ 10^{-12}$M或更低,$1x\ 10^{-13}$M或更低,或$1x\ 10^{-14}$M或更低。在一实施方案中,根据本发明的抗体的K_D可以小于100μM,如小于50μM,如小于10μM。在一个实施方案中,该K_D小于9μM,如小于8μM,如小于7μM,如小于6μM,如小于5μM。在一个实施方案中,该K_D小于4μM,如小于3μM,如小于2μM,如小于1μM。

[0143] 同一性

[0144] 本领域已知的术语"同一性"是指通过比较序列而确定的两种或更多种多肽的序列之间的关系。在本领域中,"同一性"还表示多肽之间的序列相关性程度,如根据两个或更多个氨基酸残基的残基串之间的匹配数所确定的。"同一性"衡量两个或更多个序列中的较小序列之间相同匹配的百分比,其中缺口比对(如果有的话)由特定数学模型或计算机程序(即"算法")来解决。通过已知方法可以容易地计算相关多肽的同一性。

[0145] 在本发明中,使用来自EMBOSS-6.6.0的Needleman(Needleman等人,J.Mol.Biol.1970;48:443-453)确定相似性和同一性,其中对于空位打开和延伸分别使用参数10和0.5(gapopen=10,gapextend=0.5)。

[0146] 药物制剂

[0147] 在另一方面,本发明提供了包含本发明化合物,如本文所述抗体的组合物和制剂。例如,本发明提供了包含与药学上可接受的载体一起配制的本发明抗体或其抗原结合片段的药物组合物。

[0148] 相应地,本发明的一个目的在于提供一种药物制剂,其包含以0.1mg/ml至500mg/ml的浓度存在的这样的抗体或其抗原结合片段,并且其中所述制剂的pH为2.0至10.0。该制剂可以进一步包含缓冲体系、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂或表面活性剂及其各种组合中的一种或多种。防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂在药物组合物中的使用是本领域技术人员公知的。可参考Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第

19版,1995。

[0149] 在一个实施方案中,所述药物制剂是水性制剂。这样的制剂一般是溶液或悬浮液,但也可以包括胶体、分散体、乳液和多相物质。术语“水性制剂”被定义为包含至少50%w/w水的制剂。类似地,术语“水溶液”被定义为包含至少50%w/w水的溶液,而术语“水性悬浮液”被定义为包含至少50%w/w水的悬浮液。

[0150] 在另一个实施方案中,所述药物制剂是冷冻干燥的制剂,在使用前向其中添加溶剂和/或稀释剂。

[0151] 在进一步的方面,所述药物制剂包含这样的抗体的水溶液和缓冲液,其中该抗体以0.1mg/ml或以上的浓度存在,并且其中所述制剂的pH为约2.0至约10.0。

[0152] 在一个实施方案中,本发明涉及具有所述组合物作为内含物的注射装置。在一些实施方案中,本发明的药物组合物旨在用于和/或包含在注射装置中。在一些实施方案中,该注射装置是FlexTouch®类型的一次性、预填充、多剂量笔(供应商Novo Nordisk A/S,丹麦)。在一些实施方案中,该注射装置是单发(single shot)装置。

[0153] 在一些实施方案中,该注射装置是固定剂量装置,如被配置为递送多个预定剂量的药物的装置,有时被称为多固定剂量装置或固定剂量、多发装置。

[0154] 施用

[0155] 本发明的化合物,如抗体或其抗原结合片段,或包含这类化合物的组合物,可以肠胃外施用,如静脉内施用,如肌肉内施用,如皮下施用。或者,本发明的化合物,如抗体或其抗原结合片段,或包含这类化合物的组合物,可以经由非肠胃外途径施用,如口周或局部施用。该化合物或组合物可以预防性施用。或者,该化合物或组合物可以治疗性(按需)施用。

[0156] 剂量

[0157] 待递送的化合物的剂量可以是每天约0.01mg至500mg化合物,优选每天约0.1mg至250mg,更优选每天、每周、每两周或每月约0.5mg至约250mg作为负荷和维持剂量,这取决于病况的严重程度。基于该化合物的性质,包括其体内半衰期或平均停留时间及其生物活性,还可以针对特定化合物调整合适的剂量。例如,在一个实施方案中,待递送的化合物可以每周施用一次,或者在另一个实施方案中每隔一周施用一次,或者在另一个实施方案中每月施用一次,并且在所述实施方案的任一个中,以例如0.1、0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5或10mg/kg体重的剂量施用。

[0158] 可以施用含有本文公开的化合物的组合物以用于预防性处置和/或在一些实施方案中用于治疗性处置。在治疗性应用中,将组合物以足以治愈、减轻或部分阻止疾病及其并发症的量施用于已经患有疾病如上述任何出血性病症的受试者。足以实现该目的的量被定义为“治疗有效量”。如本领域技术人员将会理解的,对于该目的有效的量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和一般状态。

[0159] 在一个方面,本发明涉及具有刺激FX的活化以生成FXa的能力的FX结合分子。如上所述,在探索新的和改进的治疗以改善特别是血友病患者的凝血功能方面,这样的功能是理想的。

[0160] 在一个实施方案中,本发明涉及FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,其结合人FX并刺激FX活化。

[0161] 在一个实施方案中,本发明涉及FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,其中该FX结

合物、抗体或其抗原结合片段结合人FX并且能够刺激FX活化。

[0162] 特别令人感兴趣的是,在不存在FIX结合部分,如不存在包含可将FX和FIXa置于一起的FIXa结合物的FVIII或FVIII模拟化合物的情况下,也发生所观察到的活化。在一个实施方案中,该FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,结合人FX,从而刺激FIXa对FX的蛋白水解,生成FXa。

[0163] 在一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段独立于FIXa结合部分的存在而刺激FXa生成。在一个实施方案中,该抗体或其抗原结合片段能够独立于FIXa结合部分的存在而刺激FXa生成。

[0164] 在一个实施方案中,该FX结合物,如能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,能够独立于FIXa结合部分的存在使FX更易于发生蛋白水解。在一个实施方案中,该FX结合物,如能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,能够使FX更易于被FIXa进行蛋白水解。在一个实施方案中,该FX结合物,如能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,能够独立于FIXa结合部分的存在使FX更易于发生蛋白水解。

[0165] FX结合物刺激FXa生成的能力可以通过本领域技术人员已知的适当试验来测试。参考本文的实施例3,其提供了适合于测试给定FX结合物的激活功能的体外试验。在一个实施方案中,如实施例3所确定的,该FX结合物,如能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,刺激FX活化。当与不使用FX结合物或使用非激活FX结合物进行等效试验相比,在所述FX结合物的存在下测得FXa增加时,FX结合物是刺激性的或能够刺激FX活化。

[0166] 当相对于不存在FX结合物的情况,对于给定FX结合物观察到FX活化速率增加时——如本文实施例3的试验中所述,即,当观察到FX活化的增加倍数高于1,例如高于1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8或1.9时,认为FX结合物具有促进FIXa介导的FX活化的能力。在优选的实施方案中,所观察到的FX活化的增加倍数大于2倍,如3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90或100倍或更高。在一个实施方案中,FX活化的增加倍数是2-100,000倍。在一个这样的实施方案中,FX活化的增加倍数是2-500倍。在一个这样的实施方案中,FX活化的增加倍数是3-500倍。在另一个这样的实施方案中,FX活化的增加倍数是4-500倍。在另一个这样的实施方案中,FX活化的增加是5-100倍。在另一个实施方案中,FX活化的增加是10-100倍,如10-83倍。

[0167] 为了避免FX结合物的亲合力影响如本文实施例3所述的试验中的测量,该试验应优选地通过使用单价FX结合物来进行。如果FX结合物是二价或多价FX结合物,则激活试验应使用其单价抗原结合片段来进行。

[0168] 本发明的一个方面涉及FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,其结合人FX强于结合FXa。在一个实施方案中,该FX结合物不结合FXa。在另一个实施方案中,该FX结合物相对于FXa优先结合FX。在一个这样的实施方案中,该FX结合物以较低的亲和力结合FXa。由于FX与FXa的区别在于存在激活肽,因此本发明在一个方面涉及与人FX的激活肽结合的FX结合物,如抗体或其抗原结合片段。人FX的激活肽由SEQ ID NO:2的氨基酸残基143-194定义。

[0169] 在一个实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段结合由SEQ ID NO:2的氨基酸残基143-194所表示的FX的激活肽。在进一步的实施方案中,该抗体或其抗原结合片段结合如SEQ ID NO:2所示的FX的激活肽内的氨基酸残基170-185。

[0170] 基于如实施例5所述进行的肽阵列,鉴定了所鉴定的FX激活FX结合物的共有结合

位点。确定了共同最小肽表位,并且发现其在FX的激活肽内包含肽“LL”,后者对应于如SEQ ID NO:2所示的人FX的氨基酸残基177-178。

[0171] 在一实施方案中,本发明涉及FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,其能够结合FX的激活肽内的“LL”,后者对应于如SEQ ID NO:2所示的人FX的氨基酸残基177-178。

[0172] 在一实施方案中,本发明涉及FX结合物,如能够结合FX的激活肽的抗体或其抗原结合片段,并且其中通过肽阵列确定的共同最小表位由“LL”(SEQ ID NO:2的氨基酸残基177-178)组成。

[0173] 在一实施方案中,所述FX结合物,如抗体或其抗原结合片段,结合由SEQ ID NO:2的氨基酸残基143-194所表示的FX的激活肽,并且其中通过肽阵列确定的共同最小表位由“LL”(SEQ ID NO:2的氨基酸残基177-178)组成。

[0174] 在本领域中公知,抗原结合分子可以采取各种形式。本文描述了一系列公知类型的分子形式,同时还应指出,这不应被视为穷举的清单,并且本领域技术人员能够无困难地将本申请的教导应用于其优选的分子形式。

[0175] 在一个实施方案中,所述FX结合物是单价的。在一个这样的实施方案中,该FX结合物是免疫球蛋白单可变域,如(单)域抗体或其抗体片段或Nanobody®、V_HH、人源化V_HH或骆驼化V_H域。在一个实施方案中,该FX结合物是Fab。在一个实施方案中,该FX结合物是二价的。在一个实施方案中,该FX结合物是单克隆完整抗体(mAb)或mAb的抗原结合片段。

[0176] 本发明的一个方面涉及对能够刺激FX活化的FX结合物的鉴定。在一个这样的实施方案中,提供了一种方法,其包括以下步骤:a)提供FX结合物,b)在适合于测试给定FX结合物的FX激活功能的体外试验中测试该FX结合物,以及c)选择能够刺激FX活化的FX结合物。

[0177] 如上所述,能够刺激FX活化的FX结合物可以是包含在双特异性分子或三特异性分子或甚至多特异性分子中的期望元件。

[0178] 因此,本发明的一个方面涉及双特异性、三特异性和多特异性分子,如包含至少一个提供FX刺激的FX结合部分的抗体分子(或其抗原结合片段)。

[0179] 本发明的一个方面涉及如本文所述的分子如抗体或其抗原结合片段在制备药物中的用途。

[0180] 本发明的一个方面涉及用于治疗方法中的如本文所述的分子,如抗体或其抗原结合片段。

[0181] 本发明的一个方面涉及如本文所述的分子如抗体或其抗原结合片段在治疗凝血病如血友病中的用途。

[0182] 本发明的一个方面涉及一种治疗方法,其包括以下步骤:向有需要的个体施用治疗有效剂量的本文所述的分子,如抗体或其抗原结合片段。在一个实施方案中,该方法用于治疗患有凝血病如血友病,特别是具有或不具有抑制物的A型血友病的患者。在一个实施方案中,该方法用于治疗患有具有或不具有抑制物的B型血友病的患者。

[0183] 实施方案

[0184] 1.抗体或其抗原结合片段,其能够与由SEQ ID NO:2的氨基酸残基143-194所表示的FX的激活肽结合。

[0185] 2.抗体或其抗原结合片段,其能够与如SEQ ID NO:2所示的FX的激活肽内的氨基酸残基170-185中的一个或多个结合。

[0186] 3.抗体或其抗原结合片段,其能够与FX的激活肽内的“LL”结合,后者对应于如SEQ ID NO:2所示的人FX的177-178位氨基酸残基。

[0187] 4.能够与FX的激活肽结合的抗体或其抗原结合片段,其中通过肽阵列确定的共同最小表位包含“LL”(SEQ ID NO:2的AA 177-178)。

[0188] 5.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够刺激FX活化。

[0189] 6.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够刺激FIXa对FX的激活。

[0190] 7.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够独立于FIXa结合物的存在刺激FIXa对FX的激活。

[0191] 8.根据实施方案1-4中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段能够刺激FX活化。

[0192] 9.根据实施方案5-8中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段刺激FX活化的能力如本文实施例3所述进行确定。

[0193] 10.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段独立于FIXa结合部分的存在刺激FIXa对FX的激活。

[0194] 11.根据实施方案5-10中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中FX活化的刺激如本文实施例3所述进行确定。

[0195] 12.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够使FX更易于活化。

[0196] 13.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够使FX更易于被FIXa进行蛋白水解。

[0197] 14.能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够独立于FIXa结合部分的存在使FX更易于被FIXa进行蛋白水解。

[0198] 15.根据实施方案12-14中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段使FX更易于发生蛋白水解的能力如本文实施例3所述进行确定。

[0199] 16.根据实施方案1-4中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够根据实施方案5-11中任一项所述刺激FX活化。

[0200] 17.根据实施方案1-4中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是单可变域抗体,其根据实施方案5-11中任一项所述刺激FX活化。

[0201] 18.根据实施方案1-4中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是能够根据实施方案12-15中任一项所述使FX更易于发生蛋白水解的单可变域抗体。

[0202] 19.根据实施方案5-18中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中其单价抗原结合片段

[0203] a.刺激FX活化;

[0204] b.刺激FIXa对FX的激活;

[0205] c.能够刺激FX活化:

[0206] d.能够刺激FIXa对FX的激活;

[0207] e.能够使FX更易于发生蛋白水解;或者

[0208] f.能够使FX更易于被FIXa进行蛋白水解。

[0209] 20.根据前述实施方案中任一项的能够结合FX的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段以平衡解离常数(K_D)确定的结合亲和力小于10μM,如小于9μM,如小于8μM,如小于7μM,如小于6μM,如小于5μM,如小于4μM,如小于3μM,或者如小于2μM。

[0210] 21.根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是单价的。

[0211] 22.根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是免疫球蛋白单可变域或其抗体片段,如结构域抗体、Nanobody®、V_HH、人源化V_HH或骆驼化V_H域。

[0212] 23.根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是Fab、scFab、Fv或scFv。

[0213] 24.根据前述实施方案1-15中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段是二价的。

[0214] 25.根据实施方案24的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是Fab'_2的mAb。

[0215] 26.根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链可变域分别与SEQ ID NO:8、9、10、11、54、55、56或57所示的序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0216] 27.根据实施方案1-25中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包含

[0217] a.与SEQ ID NO:8表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0218] b.与SEQ ID NO:9表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0219] c.与SEQ ID NO:10表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0220] d.与SEQ ID NO:11表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0221] e.与SEQ ID NO:54表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0222] f.与SEQ ID NO:55表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;

[0223] g.与SEQ ID NO:56表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列;或

[0224] 与SEQ ID NO:57表示的重链可变域的三个CDR序列相比具有至多10个氨基酸残基改变的三个重链CDR序列。

[0225] 28.根据实施方案27的抗体或其抗原结合片段,其中与所示的SEQ ID NO的三个CDR相比,所述三个重链CDR序列具有至多9个,如8个,如7个或如6个氨基酸改变。

[0226] 29.根据实施方案28的抗体或其抗原结合片段,其中与所示的SEQ ID NO的三个CDR相比,所述三个重链CDR序列具有至多5个,如4个,如3个,如2个或至多1个氨基酸改变。

[0227] 30.抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:8、9、10、11、54、55、56或57,或者由其组成。

[0228] 31.抗体或其抗原结合片段,其包含SEQ ID NO:8、9、10、11、54、55、56或57的三个CDR。

[0229] 32.抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与包含SEQ ID NO:8、9、10、11、54、55、56或57或由其组成的参考抗体或抗原结合片段竞争。

[0230] 33.抗体或其抗原结合片段,其包含mAb 00916的重链可变域(SEQ ID NO:4)和轻链可变域(SEQ ID NO:5)。

[0231] 34.抗体或其抗原结合片段,其包含mAb 13F62的重链可变域(SEQ ID NO:6)和轻链可变域(SEQ ID NO:7)。

[0232] 35.抗体或其抗原结合片段,其包含mAb 00916的重链可变域(SEQ ID NO:4)的三个CDR和轻链可变域(SEQ ID NO:5)的三个CDR。

[0233] 36.抗体或其抗原结合片段,其包含mAb 13F62的重链可变域(SEQ ID NO:6)的三个CDR和轻链可变域(SEQ ID NO:7)的三个CDR。

[0234] 37.抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与包含mAb 00916的重链可变域(SEQ ID NO:4)和轻链可变域(SEQ ID NO:5)的参考抗体或抗原结合片段竞争。

[0235] 38.抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段与包含mAb 13F62的重链可变域(SEQ ID NO:6)和轻链可变域(SEQ ID NO:7)的参考抗体或抗原结合片段竞争。

[0236] 39.根据实施方案26-38中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够根据实施方案5-9中任一项所述刺激FX活化。

[0237] 40.根据实施方案26-38中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段根据实施方案9-11中任一项所述刺激FX活化。

[0238] 41.根据实施方案26-38中任一项的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段能够根据实施方案12-15中任一项所述使FX更易于发生蛋白水解。

[0239] 42.双特异性、三特异性或多特异性分子,其包含根据前述实施方案中任一项的抗体或抗原结合片段。

[0240] 43.包含根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段的双特异性、三特异性或多特异性分子,其中所述抗体或其抗原结合片段是单可变域抗体。

[0241] 44.药物组合物,其包含根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段,以及可选的一种或多种药学上可接受的载体。

[0242] 45.根据前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段或组合物在制备用于治疗凝血病,例如具有或不具有抑制物的A型血友病,或者例如具有或不具有抑制物的B型血友病的药物中的用途。

[0243] 46.根据实施方案1-44中任一项的抗体或其抗原结合片段或组合物,其用于治疗凝血病,例如具有或不具有抑制物的A型血友病,或者例如具有或不具有抑制物的B型血友病。

[0244] 47.治疗患有凝血障碍如血友病的受试者的方法,其包括向所述受试者施用根据

前述实施方案中任一项的抗体或其抗原结合片段或组合物。

[0245] 48.根据实施方案47的方法,其中所述凝血病或凝血障碍是具有抑制物或不具有抑制物的A型或B型血友病。

[0246] 49.鉴定根据实施方案1-25中任一项的抗体的方法,其包括以下步骤:a)提供FX结合物,b)在适合于测试步骤a中提供的FX结合物的FX激活功能的体外试验中测试该FX结合物,以及c)选择能够刺激FX活化的FX结合物。

[0247] 50.鉴定根据实施方案5-23中任一项的抗体的方法,其包括以下步骤:a)提供FX结合物,b)在适合于测试步骤a中提供的FX结合物的FX激活功能的体外试验中测试该FX结合物,以及c)选择能够使FX更易于发生蛋白水解,例如被FIXa进行蛋白水解的FX结合物。

[0248] 51.表达根据实施方案1-43中任一项的抗体或其抗原结合片段的真核细胞。

[0249] 52.试剂盒,其包含根据实施方案1-44中任一项的抗体或其抗原结合片段或组合物以及使用说明书。

[0250] 实施例与方法

[0251] 通用方法

[0252] 结合FX的纳米抗体(Nanobody)的制备

[0253] 通用分子生物学

[0254] 关于通用分子生物学技术,请参见Molecular Cloning:A Laboratory Manual(第三版,2001,Sambrook,Fritsch和Maniatis编,CSHL Press,Cold Spring Harbor,NY)。

[0255] 1.免疫和文库

[0256] 在Ablynx Camelid Facility伦理委员会批准(LA1400575)后,用FX免疫一只美洲驼和一只羊驼(Haemotologic Technologies,VT USA)。

[0257] 仅重链抗体片段所有组成成分的克隆和噬菌体免疫文库的制备如下进行。

[0258] 最后一次免疫原注射后,收集血液样品。根据制造商的说明(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ,US),使用Ficoll-Hypaque从这些血液样品中制备外周血单核细胞(PBMC)。从PBMC中提取总RNA,并将其用作RT-PCR的起始材料,以扩增编码V_HH/Nanobody®的DNA区段,基本上如WO2005/044858所述。简言之,将编码Nanobody®的DNA区段克隆到噬菌粒载体pAX212中,该载体允许产生展示与His_6和$FLAG_3$标签融合的Nanobodies®的噬菌体颗粒。随后,根据标准方案制备并储存噬菌体。

[0259] 合成文库

[0260] 合成文库如下生成:将合成的Nanobody®基因片段克隆到噬菌粒载体pAX190中,该载体具有与上述pAX212相同的特征,但在多克隆位点上存在不同。

[0261] 与FX结合的纳米抗体的文库筛查

[0262] 用生成的免疫和合成文库进行了Nanobody®噬菌体展示选择。针对固定化的人FX(Haemotologic Technologies,VT USA)和食蟹猕猴FX((Novo Nordisk内部生产)的不同组合,对文库进行了连续的一至四轮富集。

[0263] 为了特异性富集对FX相对于FXa具有选择性的纳米抗体,在某些实验中,在文库与固定化FX的孵育过程中使用过量的可溶性FXa进行竞争。

[0264] 为了特异性富集对FX相对于其他结构上相关的凝血因子具有选择性的纳米抗体,

在某些实验中,在文库与固定化FX的孵育过程中使用过量的可溶性FIX进行竞争。

[0265] 针对ELISA(使用来自表达纳米抗体的大肠杆菌细胞的周质提取物)中对人和食蟹猴FX、FXa或FIX的结合,筛选了来自选择输出的大约4,500个单独的克隆。鉴定出大约1500个显示与人FX/FXa特异性结合的克隆,其中大多数显示与食蟹猴FX交叉结合。一些克隆显示出与FXa相比优先结合FX。对ELISA阳性克隆的序列分析确定了大约700个与FX/FXa结合的纳米抗体的独特序列。

[0266] 2.Nanobody®表达构建体的生成

[0267] 来自噬菌体展示选择输出的纳米抗体的序列分析按照公知的程序来进行(Pardon等人(2014)Nat Protoc 9:674)。

[0268] 使用各自带有独特限制位点的正向FR1和反向FR4引物的特定组合,通过PCR获得的含有Nanobody®的DNA片段,用适当的限制酶进行消化,并连接到Nanobody®表达载体(如下所述)的匹配克隆盒中。然后将连接混合物转化到电感受态大肠杆菌TG1(60502,Lucigen,Middleton,WI)或TOP10(C404052,ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)细胞中,然后使其在适当的抗生素选择压力(卡那霉素或Zeocin)下生长。通过质粒DNA的Sanger测序(LGC Genomics,德国柏林)来验证抗性克隆。

[0269] 在大肠杆菌TG1中,从含有lac启动子、卡那霉素抗性基因、大肠杆菌复制起点和Nanobody®克隆位点以及前面的OmpA信号肽编码序列的质粒表达载体表达单价纳米抗体。与Nanobody®编码序列符合读框地,该载体编码C末端FLAG3和HIS6标签。信号肽将表达的纳米抗体引导至细菌宿主的周质区室。

[0270] 纳米抗体的表达和纯化

[0271] 纳米抗体在大肠杆菌中的通用表达

[0272] 使含有目的Nanobody®构建体的大肠杆菌TG-1细胞在含有“5052”自诱导培养基(0.5%甘油,0.05%葡萄糖,0.2%乳糖+3mM $MgSO_4$)的带挡板摇瓶中在37℃下生成2小时,随后在30℃下生长29小时。然后将来自大肠杆菌表达培养物的过夜冷冻的细胞沉淀物溶解在PBS(原始培养物体积的1/12.5)中,并在轻轻旋转下于4℃孵育1小时。最后,将细胞再次沉淀,并保存含有分泌到周质间隙中的蛋白质的上清液。

[0273] Nanobodies®在巴斯德毕赤酵母(P.pastoris)中的通用表达

[0274] 使含有目的Nanobody®构建体的巴斯德毕赤酵母细胞在BGCM培养基中生长两天(30℃,200rpm)。在第三天,将培养基换成BMCM,并使构建体进一步生长(30℃,200rpm),并在8小时后用0.5%v/v甲醇诱导。第二天,在早晨、中午和晚上用0.5%v/v甲醇诱导构建体。在第五天,将细胞离心并收集上清液(包含分泌的Nanobody®)。

[0275] Nanobodies®的通用纯化

[0276] 在Ni-Excel(GE Healthcare)或Ni-IDA/NTA(Genscript)树脂上,使用咪唑(对于前者)或酸性洗脱(对于后者),通过固定化金属亲和色谱法(IMAC)纯化HIS6标记的Nanobodies®,然后进行脱盐步骤(使用Sephadex G25树脂的PD柱,GE Healthcare),并且如有必要,进行PBS中的凝胶过滤色谱法(Superdex柱,GE Healthcare)。

[0277] 3.热漂移试验

[0278] 使用在LightCycler 480II机器(Roche)上的96孔板上进行的热漂移试验(TSA)测定抗FXNanobodies®的热稳定性。根据以下pH范围,每行分析一个Nanobody®:3.5/4/4.5/5/5.5/6/6.5/7/7.5/8/8.5/9。涤每孔5μL的Nanobody®样品(在PBS中为0.8mg/mL)添加至5μL Sypro Orange(在MilliQ水中为40x;Invitrogen目录号S6551)和10μL缓冲液(100mM磷酸盐,100mM硼酸盐,100mM柠檬酸盐和115mM NaCl,pH在3.5至9的范围内)。施加的温度梯度(以0.03℃/s的速率从37到99℃)诱导纳米抗体的解折叠,从而使其疏水小片暴露出来。Sypro Orange与这些疏水小片结合,导致荧光强度增加(Ex/Em=465/580nm)。pH值为7时,荧光强度曲线的一阶导数的拐点作为解链温度(Tm)的量度。

[0279] 4.分析型大小排阻色谱法

[0280] 通过分析型大小排阻色谱法(SEC)研究了Nanobodies®的聚集和寡聚的潜在发生。为此,通过Waters Xbridge柱(粒径:3.5μm,孔径200Å,ID 7.8mm)上的Dionex Ultimate 3000设备注入8μgNanobody®样品(在PBS中为0.5mg/mL)和10μL BioRad标准品(目录号151-1901,在PBS中1/10稀释)。使用精氨酸缓冲液[10mM磷酸盐+150mM精氨酸+10%1-丙醇+0.02%NaN_3(pH7.0)]作为流动相,并施加0.5mL/min的流速。通过考虑以下三个参数来确定总体SEC行为:主峰的峰面积(>90%=通过),回收百分比(>80%=通过)以及相对于1.35kDa BioRad标准峰的保留时间。

[0281] 5.竞争试验

[0282] 可以使用可如下进行的竞争试验来表征结合相同或相似表位的抗体(如Nanobodies®)。

[0283] 将25μL(1μg/mL)人血浆来源的FX(Haematologic Technologies Inc,USA)固定在微量滴定板(Nunc,Wiesbaden,德国)中。洗涤并封闭孔后,将"分箱"mAb(mAb 00916)以1μM的浓度添加到含有50mMHEPES pH 7.4、2.5mM $CaCl_2$、1%BSA和0.05%吐温20(Sigma)的缓冲液中,或仅含缓冲液的参考液中,并与包被的人FX预孵育30分钟。随后加入测试抗体(此处为不同的Nanobodies®),并使其结合1小时。洗去未结合的测试抗体(Nanobody®)和分箱mAb,并使用辣根过氧化物酶(HRP)缀合的抗FLAG mAb(Sigma,目录号A8592)检测结合的Nanobody®,随后在底物esTMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)(SDT,布鲁塞尔,比利时)的存在下进行酶促反应。

[0284] 对于"分箱"mAb,通过以下方程式计算在每种测试抗体(Nanobody®)的存在下观察到的%抑制。

[0285] $$\%\text{抑制} = 100 - \left(\frac{\text{OD450 nm, 1 uM 测试抗体(或纳米抗体)}}{\text{OD 450 nm, 参考}}\right) \times 100\%$$

[0286] 如果观察到超过50%的抑制,则通常认为抗体分子竞争。

[0287] 实施例1-5

[0288] 实施例1:抗FXNanobodies®

[0289] 从抗FX纳米抗体池中选择了一组选择性结合FX酶原(FX而不是FXa)的纳米抗体用

于进一步研究。纳米抗体的序列由SEQ ID NO:8-11和54-57定义。使用mAb 00916(IgG 1同种型,SEQ ID NO:4和5所示的可变序列)作为"分箱"抗体进行竞争实验,并且纳米抗体Nb 701B09、Nb 701C06、Nb 702C12、Nb 701D07、Nb 721E08、Nb 729A04、Nb 729C08和Nb 730C03均显示与mAb 00916竞争。还包括与FX的不同区域结合的对照Nanobody®,Nb 501A02(SEQ ID NO:12),并且对于该Nanobody®未观察到与mAb 00916的竞争。结果显示在以下表1中,并且说明了除Nb 501A02以外的所有化合物均与mAb 00916竞争结合FX,即与mAb00916结合相同或重叠的在FX上的表位。

[0290] 表1:结合FX酶原并与mAb 00916竞争的 Nanobody® (Nb)

[0291]

Nanobody® ID	与 mAb 00916 的竞争
Nb 701B09 (SEQ ID NO:8)	+
Nb 701C06 (SEQ ID NO:9)	+
Nb 702C12 (SEQ ID NO:10)	+
Nb 701D07 (SEQ ID NO:11)	+

[0292]

Nb 501A02 (SEQ ID NO:12)	-
Nb 721E08 (SEQ ID NO:54)	+
Nb 729A04 (SEQ ID NO:55)	+
Nb 729C08 (SEQ ID NO:56)	+
Nb 730C03 (SEQ ID NO:57)	+

[0293] 实施例2:抗FXNanobody®与FX的结合的SPR分析

[0294] 通过表面等离子体共振(SPR)(Biacore T200)探测纯化的抗FX纳米抗体(Nb)与人血浆来源的FX(Haematologic Technologies Inc,USA)的结合。

[0295] 简言之,使用标准胺偶联化学法将抗His mAb(来自R&D systems的MAB050)固定在CM4传感器芯片上。根据表3,以10μL/min的流速注入抗FX纳米抗体(10nM)1分钟。随后以30μL/min的流速注入4096、1024、256、64、16、4和0 nM FX持续4分钟,以使其与抗FX Nb结合,随后进行5分钟运行缓冲液(10mM HEPES,150mM NaCl,5mM$CaCl_2$、0.05%(v/v)表面活性剂P20、1mg/mL牛血清白蛋白,pH 7.4)注射,从而使得从抗FXNanobody®上解离。该运行缓冲液也用于稀释抗FX Nb和FX样品。使用由3M $MgCl_2$组成的再生缓冲液、30秒接触时间和30μL/min流速实现芯片的再生。在25℃下收集结合数据,并使用由制造商(Biacore AB,Uppsala,瑞典)提供的BiaEvaluation 4.1,根据1:1模型进行分析。

[0296] 在所有情况下,结合传感图均显示出快速缔合和快速解离的结合动力学曲线,从而排除了基于动力学分析的K_D确定。因此,所报告的K_D值是根据稳态分析确定的。分析产生了在表2中报告的结合常数。鉴定出的最强结合物是Nb702C12,而测试的其他Nanobodies®则以略高的K_D和较低的R_{max}结合FX。

[0297] 表2:如通过SPR分析确定的,对于抗FX Nanobodies®与人血浆来源的FX的相互

作用,基于稳态分析估计的结合常数

[0298]

FX结合物	K_D	R_{max}
Nb 701B09	2.1μM	17
Nb 701C06	0.96μM	14
Nb 701D07	2.4μM	15
Nb 702C12	1.2μM	30

[0299] 实施例3:FXa生成试验中抗FX纳米抗体的活性

[0300] 根据Scheiflinger等人(2008)J Thromb Haemost,6:315-322所述的原理,在促凝磷脂膜的存在下确定单价抗FXNanobody®(Nb)促进FIXa介导的FX活化的能力。包括也被发现与激活肽结合的mAb 13F62的Fab(IgG1同种型,可变序列由SEQ ID NO:6和7示出)以供比较。此外,如US 9,334,331中公开的抗FX抗体(所述公开文本中的J327和L404-k),其对应于ACE910的抗FX臂;以及最近在WO2018/021450(所述公开文本中的J327 D31H和JYL280)和WO2018/098363(所述公开文本中由SEQ ID NO:427和615表示的BIIB-12-917)中公开的抗FX抗体,据称适合用作抗FIX/抗FX双特异性FVIII模拟化合物的一部分,进一步包括在内以供比较。

[0301] 通过与1-1.5nM人血浆来源的FIXa(Haematologic Technologies Inc,USA)和500μM 25:75磷脂酰丝氨酸:磷脂酰胆碱磷脂囊泡(Haematologic Technologies Inc,USA)在测定缓冲液(50mM HEPES,100mM NaCl,5mM $CaCl_2$,0.1%(w/v)PEG8000,1mg/mL牛血清白蛋白,pH 7.3)中预孵育10分钟,在0-1000nM、0-2000nM、0-4000nM或0-8000nM的浓度范围内单独测试每种化合物。通过添加人血浆来源的FX(Haematologic Technologies Inc,USA)至终浓度为100nM且反应体积为50μL启动反应。在搅动(1000RPM)的同时于室温下激活20分钟后,通过加入25μL猝灭缓冲液(50mM HEPES,100mM NaCl,60mMEDTA,0.1%(w/v)PEG8000,1mg/ml牛血清白蛋白,pH 7.3)猝灭反应。通过添加25μL 2mM用于FXa的S-2765生色底物(Chromogenix,瑞典)并在生色底物转化后在酶标仪中测量405nm处的吸光度10分钟来测定生成的FXa的量。将观察到的405nm吸光度的变化(ΔAbs405/min)拟合至二次结合方程式(方程式1)以获得峰值刺激活性和EC50。

[0302] 表3列出了FXa生成速率的拟合的最大增强(FX活化的增加倍数)和拟合的K_D值。大多数测试的纳米抗体都刺激FIXa介导的FX活化(相对于单独的FIXa约4至约83倍),而mAb13F62的Fab则显示出1.5倍的活化增加,且Nb 501A02没有显示出活化。对于13F62的Fab和仅FIXa,则没有提供拟合的EC50值。

[0303] 方程式1:

[0304] $$Y_i = \frac{[FX] + [结合物]_i + K_D - \sqrt{\left([FX] + [结合物]_i + K_D\right)^2 - 4 \cdot [FX] \cdot [结合物]_i}}{2 \cdot [FX]} \cdot (Y_{max} - Y_0) + Y_0$$

[0305] 其中Y_i是在给定FX结合物浓度(i)下观察到的底物转化(ΔAbs405/min),[FX]和[结合物]分别是FX和FX结合物的总浓度,K_D是FX结合物的表观解离常数,Y_{max}和Y_0分别是最大信号和初始信号(ΔAbs405/min)。

[0306] 表3:FX结合物对FIXa介导的FX活化的影响。估计的K_n(平均值±SD,n=3)和相对于仅FIXa的FX活化的增加(平均值±SD,n=3)。

[0307]

FX 结合物	估计的 K_D (nM)	FX 活化的增加（倍数）
Nb 701B09	72.3 ± 16.3	83.0 ± 13.1
Nb 701C06	41.9 ± 8.1	26.0 ± 6.7
Nb 701D07	66.1 ± 25.0	17.2 ± 6.2
Nb 702C12	75.4 ± 34.2	18.9 ± 3.0
Nb 721E08	~1700	> 25
Nb 729A04	83.2 ± 39.4	4.1 ± 0.1
Nb 729C08	~1400	> 32
Nb 730C03	63.9 ± 41.5	9.2 ± 0.3
Nb 501A02	802 ± 505	0.8 ± 0.1
mAb 13F62 的 Fab	3.1 ± 2.9	1.5 ± 0.1

[0308]

FX 结合物	估计的 K_D (nM)	FX 活化的增加（倍数）
Fab ACE910 抗 FX (J327/L404-k)*	~3900	< 0.6
单价 J327 D31H/JYL280**	62.3 ± 52.7	0.45 ± 0.4
单价 BIIB-12-917***	N/A	无效果
仅 FIXa	N/A	1.0

[0309] N/A是指在比较是否存在FX结合物时未观察到对FX活化的影响的情况。在给定的FX结合物无法饱和FX,因此无法达到平台期的情况下,对FX活化的影响以“大于”/“小于”最大观察效果给出,并将估计的KD用“~”标记。*参见US 9,334,331;**参见WO2018/021450;***参见WO2018/098363。

[0310] 实施例4:抗FX纳米抗体对FXa酰胺分解(amidolytic)活性的影响

[0311] 为了排除实施例3中观察到的活化增加倍数可能是由于纳米抗体对FXa酰胺分解活性的正面影响,如下研究了单价抗FX纳米抗体刺激FXa酰胺分解活性的能力。将5nM人血浆来源的FIXa(Haematologic Technologies Inc,USA)与50μM 25:75磷脂酰丝氨酸:磷脂酰胆碱磷脂囊泡(Haematologic Technologies Inc,USA)在测定缓冲液(50mM HEPES,100mM NaCl,5mM $CaCl_2$、0.1%(w/v)PEG8000、1mg/mL牛血清白蛋白,pH 7.3)中预孵育10分钟。将人血浆来源的FX(Haematologic Technologies Inc,USA)添加到反应中至100nM的终浓度和40μL的最终活化体积。在搅动(1000RPM)的同时于室温下孵育20分钟后,通过加入25μL猝灭缓冲液(50mM HEPES,100mM NaCl,60mM EDTA,0.1%(w/v)PEG8000,1mg/ml牛血清白蛋白,pH 7.3)终止FX活化反应。之后,将10μL 25μM单独的FX结合物添加至生成的FXa,然后添加25μL 2mM S-2765生色底物(Chromogenix,瑞典),并通过在酶标仪中测量405nm处的吸光度(ΔAbs405/min)来确定生色底物转化。使用方程式2计算相对FXa酰胺分解活性(a_{rel}):

[0312] 方程式2:$$a_{rel} = \frac{a_{FXa\cdot结合物}}{a_{FXa}}$$

[0313] 其中$a_{FXa\cdot结合物}$是FXa/FX结合物复合物的酰胺分解活性,而a_{FXa}是单独的FXa的酰胺

分解活性。

[0314] 表4显示了各个FX结合物的相对FXa酰胺分解活性,并且得出以下结论:FX活化的增加不会是由于具有提高的FXa酰胺分解活性的Nanobodies®。

[0315] 表4:相对于游离FXa,在FX结合物的存在下的FXa酰胺分解活性(平均值±SD,n=2-3)

[0316]

FX 结合物	FXa 酰胺分解活性 (相对于游离 FXa, 倍数)
Nb 701B09	1.06 ± 0.10
Nb 701C06	1.06 ± 0.15
Nb 701D07	1.05 ± 0.63
Nb 702C12	1.05 ± 0.04
Nb 721E08	1.07 ± 0.01
Nb 729A04	1.11 ± 0.01
Nb 729C08	1.09 ± 0.05
Nb 730C03	1.01 ± 0.03
mAb 13F62	0.94 ± 0.06
Fab ACE910 抗 FX (J327/L404-k)*	1.02 ± 0.05
单价 J327 D31H/JYL280**	0.98 ± 0.004
单价 BIIB-12-917***	0.95 ± 0.02
游离 FXa	1.00 ± 0.02

[0317] *参见US 9,334,331

[0318] **参见WO2018/021450

[0319] ***参见WO2018/098363

[0320] 实施例5:抗FXNanobodies®的结合表位

[0321] 为了确定抗FXNanobodies®和mAb 13F62抗体的结合表位是否位于人FX的激活肽(AP)内,建立了ELISA测定。

[0322] 将41个以一个氨基酸间距跨越激活肽的52个残基的独特12-聚体肽片段固定在微量滴定板孔中,随后与待测的Nanobody®/抗体一起孵育,并通过加入HRP标记的第二抗体对结合的配体进行检测。

[0323] 肽在C末端与生物素缀合,并使用50μL 1μg/mL肽溶液固定在预先用1μg/mL链霉亲和素包被的微量滴定板的离散孔中。每个孔用洗涤缓冲液(10mM Tris,150mM NaCl,2.5mM $CaCl_2$、0.05%吐温20,pH 8.60)洗涤,随后添加50μL 2μg/mL FLAG标记的待测抗FXNanobody®或IgG抗体。1小时后使用洗涤缓冲液洗去未结合的Nanobody®/抗体。

[0324] 如下检测结合的抗FX激活肽配体:首先结合HRP标记的第二抗体(对于FLAG标记的纳米抗体:抗FLAG mAb M2-过氧化物酶(HRP)(Sigma Aldrich,US),对于抗体:Fc γ片段特

异性过氧化物酶AffiniPure F(ab′)$_2$片段山羊抗人IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.,US)或过氧化物酶AffiniPure山羊抗小鼠IgG(Jackson ImmunoResearch Laboratories,Inc.,US))1小时,然后加入100μL TMB-1ELISA底物(Kem-En-Tec Diagnostics,丹麦)。

[0325] 然后通过鉴定被每种FX结合物结合的肽组(表5)所覆盖的共同序列,从产生高于基线的信号的这组肽中推导出最小表位。表位的第一个残基由第一个连续的ELISA阳性肽中的最后一个氨基酸来定义,而表位的最后一个残基被定义为最后一个连续的ELISA阳性肽的第一个残基。

[0326] 因此,表5显示了对于几种不同的抗-FX Nanobodies® (Nb)和抗FX mAb 13F62,来自跨越整个FX AP的连续肽的ELISA信号。ELISA信号已相对于背景信号(bbg)进行了归一化。灰色区域标记出用于确定最小表位的阳性结合信号。

[0327] 表5:表位鉴定

[0328]

表位残基	SEQ ID NO:	13F62	701B09	701C06	701D07	702C12	501A02	721E08	729A04	729C08	730C03
空		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
SVAQATSSSGEA	13	2.55	0.76	0.92	0.76	0.96	0.74	2.25	0.92	1.14	1.21
VAQATSSSGEAP	14	2.70	0.73	0.93	0.84	1.02	0.88	2.13	0.99	1.09	1.24
AQATSSSGEAPD	15	1.89	0.75	0.91	0.89	0.97	0.79	1.92	1.08	1.17	1.19
QATSSSGEAPDS	16	1.82	0.77	0.94	0.81	0.96	0.82	1.97	1.08	1.12	1.14
ATSSSGEAPDSI	17	3.20	0.82	0.91	0.86	0.98	0.82	2.27	1.24	1.13	1.19
TSSSGEAPDSIT	18	0.68	0.97	0.87	0.75	0.77	0.76	2.20	1.12	1.06	1.20
SSSGEAPDSITW	19	0.77	0.84	0.90	0.73	0.86	0.82	1.99	1.24	1.10	1.21
SSGEAPDSITWK	20	0.73	0.89	0.89	0.74	0.88	0.71	2.01	0.96	1.06	1.22
SGEAPDSITWKP	21	0.82	0.84	0.88	0.78	0.88	0.76	2.15	0.98	1.07	1.18
GEAPDSITWKPY	22	1.50	0.86	0.90	0.80	0.93	0.94	2.26	1.05	1.15	1.24
EAPDSITWKPYD	23	1.64	0.79	0.89	0.76	0.97	0.76	2.35	1.01	1.11	1.24
APDSITWKPYDA	24	1.59	0.82	0.96	0.90	1.06	0.74	2.29	1.04	1.09	1.16
PDSITWKPYDAA	25	1.89	0.83	0.92	0.84	1.05	0.79	2.40	0.95	1.17	1.24
DSITWKPYDAAD	26	3.61	0.76	0.93	0.89	1.08	0.79	2.18	1.05	1.09	1.22
SITWKPYDAADL	27	7.95	0.84	0.94	1.04	1.08	0.71	2.28	1.13	1.11	1.18
ITWKPYDAADLD	28	4.23	0.83	1.03	0.89	1.10	0.74	2.08	1.28	1.06	1.20
TWKPYDAADLDP	29	1.95	0.92	1.00	0.91	1.13	0.74	2.26	0.99	1.17	1.26
WKPYDAADLDPT	30	1.18	1.14	0.99	0.85	0.89	0.74	1.83	1.20	1.08	1.14
KPYDAADLDPTE	31	0.77	0.88	0.90	0.73	0.80	0.82	1.89	1.33	1.10	1.17
PYDAADLDPTEN	32	0.84	0.88	0.82	0.73	0.83	0.79	2.05	1.06	1.08	1.20

[0329]

表位残基	SEQ ID NO:	13F62	701B09	701C06	701D07	702C12	501A02	721E08	729A04	729C08	730C03
YDAADLDPTENP	33	0.84	0.81	0.85	0.75	0.87	0.71	2.21	1.06	1.09	1.28
DAADLDPTENPF	34	0.77	0.81	0.85	0.70	0.88	0.88	2.30	1.10	1.18	1.24
AADLDPTENPFD	35	0.77	0.79	0.82	0.69	0.88	0.79	2.22	1.05	1.17	1.21
ADLDPTENPFDL	36	1.25	0.73	0.87	0.77	0.91	0.71	2.34	0.98	1.11	1.25
DLDPTENPFDLL	37	26.45	0.82	0.88	0.74	1.00	0.79	2.48	1.06	1.21	1.26
LDPTENPFDLLD	38	31.00	0.84	0.94	0.80	1.11	0.91	2.29	1.91	1.58	1.30
DPTENPFDLLDF	39	29.75	2.87	1.51	1.39	4.16	0.88	2.27	4.03	1.95	1.68
PTENPFDLLDFN	40	30.11	3.91	1.61	1.29	4.58	0.88	2.35	5.18	2.06	1.62
TENPFDLLDFNQ	41	29.68	4.38	1.74	1.44	4.84	1.09	2.54	9.12	3.14	2.10
ENPFDLLDFNQT	42	28.68	3.43	1.56	1.27	4.00	0.82	2.88	17.83	8.06	6.57
NPFDLLDFNQTQ	43	28.61	2.16	1.29	0.96	3.13	0.94	2.28	8.27	3.41	2.82
PFDLLDFNQTQP	44	29.73	3.48	1.50	1.13	4.95	0.79	2.50	1.41	1.18	1.23
FDLLDFNQTQPE	45	30.57	3.27	1.41	0.99	4.38	0.85	3.01	1.58	1.15	1.28
DLLDFNQTQPER	46	0.82	1.17	1.13	0.81	3.08	0.76	2.45	1.12	1.22	1.18
LLDFNQTQPERG	47	0.86	1.09	1.03	0.80	1.88	0.79	2.30	1.10	1.13	1.10
LDFNQTQPERGD	48	0.80	0.82	0.93	0.79	0.97	0.74	2.21	0.98	1.12	1.14
DFNQTQPERGDN	49	1.23	0.87	0.87	0.75	0.94	0.71	2.25	0.97	1.10	1.16
FNQTQPERGDNN	50	1.77	0.89	0.88	0.82	1.00	0.71	2.16	1.05	1.08	1.16
NQTQPERGDNNL	51	2.45	0.79	0.85	0.87	0.92	0.71	2.02	1.13	1.09	1.22
QTQPERGDNNLT	52	1.95	0.72	0.93	0.79	0.88	0.76	1.96	1.11	1.04	1.10
TQPERGDNNLTR	53	8.86	0.93	0.97	0.88	1.05	0.85	1.97	1.09	1.37	1.06

[0330] 最小表位被定义为每种FX结合物的ELISA阳性肽之间共同的氨基酸序列。确定的AP内的最小表位总结在表6中。

[0331] 表6:针对抗FX Nanobodies® 和mAb13F62的最小表位序列

[0332]

FX 结合物	AP 中的表位	最小表位序列
Nb 701B09	33-38	FDLLDF
Nb 701C06	33-38	FDLLDF
Nb 701D07	32-38	PFDLLDF
Nb 702C12	35-38	LLDF
Nb 721E08	33-40	FDLLDFNQ
Nb 729A04	33-37	FDLLD
Nb 729C08	31-37	NPFDLLD
Nb 730C03	31-38	NPFDLLDF
mAb13F62	33-36	FDLL
Nb 501A02	在 AP 中未检测到表位	

[0333] 通过将表5和表6的数据与表3的数据相关联,观察到对于FX上的最小表位例如是“PFDLLDF”的FX结合物,观察到刺激FX活化的能力。

[0334] 从表6可以看出,共同最小表位可以被确定为“LL”。

[0335] 虽然本文已经阐述并描述了本发明的某些特征,但是本领域普通技术人员现在将会想到许多修改、替换、改变和等同方案。因此,应当理解,意欲以所附权利要求书涵盖所有这些落入本发明真正范围内的修改和改变。

序列表

<110> 诺和诺德股份有限公司

<120> 增强 FX 活化的因子 X 结合物

<130> 170015WO01

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 415
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

[0001]

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

[0002]

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

[0003] His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 2
<211> 448
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Met Lys Lys Gly His Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

20 25 30

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
[0004] 100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly
115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val
130 135 140

Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp
145 150 155 160

Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp
165 170 175

Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu
180 185 190

195 200 205

Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr
210 215 220

Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln
225 230 235 240

Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu
245 250 255

Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn
260 265 270

Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu
[0005] 275 280 285

Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro
290 295 300

Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile
305 310 315 320

Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg
325 330 335

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu
340 345 350

Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp
355 360 365

370 375 380

Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
385 390 395 400

Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr
405 410 415

Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro
420 425 430

Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
435 440 445

[0006]

<210> 3
<211> 2
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 共同最小表位

<400> 3

Leu Leu
1

<210> 4
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)

<220>
<223> 抗体重链可变域

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

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

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

Ile Ile Ser Thr Ser Gly Ser Thr Phe Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Met
[0007] 85 90 95

Trp Ala Gly Ser Arg Tyr Asp Phe Asn Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 5
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体轻链可变域

<400> 5

1 5 10 15

Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys
50 55 60

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

Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Thr Tyr Tyr Tyr Ser Gly
85 90 95

[0008]

Gly Gly Ser Tyr Ala Ser Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val
100 105 110

Lys

<210> 6
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体重链可变域

<400> 6

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

20 25 30

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

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

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

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

[0009] Val Ser Gly Tyr Ser Arg Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 7
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体轻链可变域

<400> 7

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

20 25 30

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

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

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

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

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

[0010]

<210> 8
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 8

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

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

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

50 55 60

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

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

Ala Ala Asp Ala Thr Pro Ala Asn Gly Glu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0011] <210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 9

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 120
[0012] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 10

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Tyr Ser Ser Gly Asp Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

[0013]

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 11

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Ala Ala Asp Leu Ala Pro Gly Asp Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0014] <223> 单可变域抗体

<400> 12

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

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

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

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

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

85 90 95

Cys Ala Arg Gly Trp Thr Tyr Gly Ser Asp Gly Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 13

Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala
1 5 10

[0015]

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 14

Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp

15

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile
1 5 10

[0016]

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr
1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 21

Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro
1 5 10

[0017]

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 22

Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 23

Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 24

Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 25

Pro Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala
1 5 10

[0018]

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 26

Asp Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 27

Ser Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 28

Ile Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 29

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

[0019]

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 30

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

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 31

Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 32

Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 33

Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro
1 5 10

[0020]

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 34

Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 35

Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 36

Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 37

Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu
1 5 10

[0021]

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 38

Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 39

Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 40

Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn
1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 41

Thr Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln
1 5 10

[0022]

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 42

Glu Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 43

Asn Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln

<210> 44
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 44

Pro Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro
1 5 10

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 45

Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu
1 5 10

[0023]

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 46

Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg
1 5 10

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 47

Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 48

Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 49

Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn
1 5 10

[0024]

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 50

Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 51

Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 52

Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr
1 5 10

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> 人

<400> 53

Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu Thr Arg
1 5 10

[0025]

<210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 54

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

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

Ser Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

[0026]

<210> 55
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 55

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

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

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

50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 56
<211> 120
[0027] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 56

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

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

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

Ser Gly Ile Thr Gly Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

[0028]

<210> 57
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 单可变域抗体

<400> 57

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

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

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

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

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

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

[0029]

Ala Ala Ala Ile Leu Arg Gly Tyr Arg Lys Thr Tyr Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120