



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201437229 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：102143763

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 29 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/40 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/29

美國

61/731,368

(71)申請人：拜耳保健有限責任公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)

美國

(72)發明人：趙曉燕 ZHAO, XIAO-YAN (US)；王卓智 WANG, ZHUOZHI (CN)；金芝蓮 KIM, JI-YUN (US)；朱熒 ZHU, YING (CN)；特伯 簡 TEBBE, JAN (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：40 項 圖式數：6 共 96 頁

(54)名稱

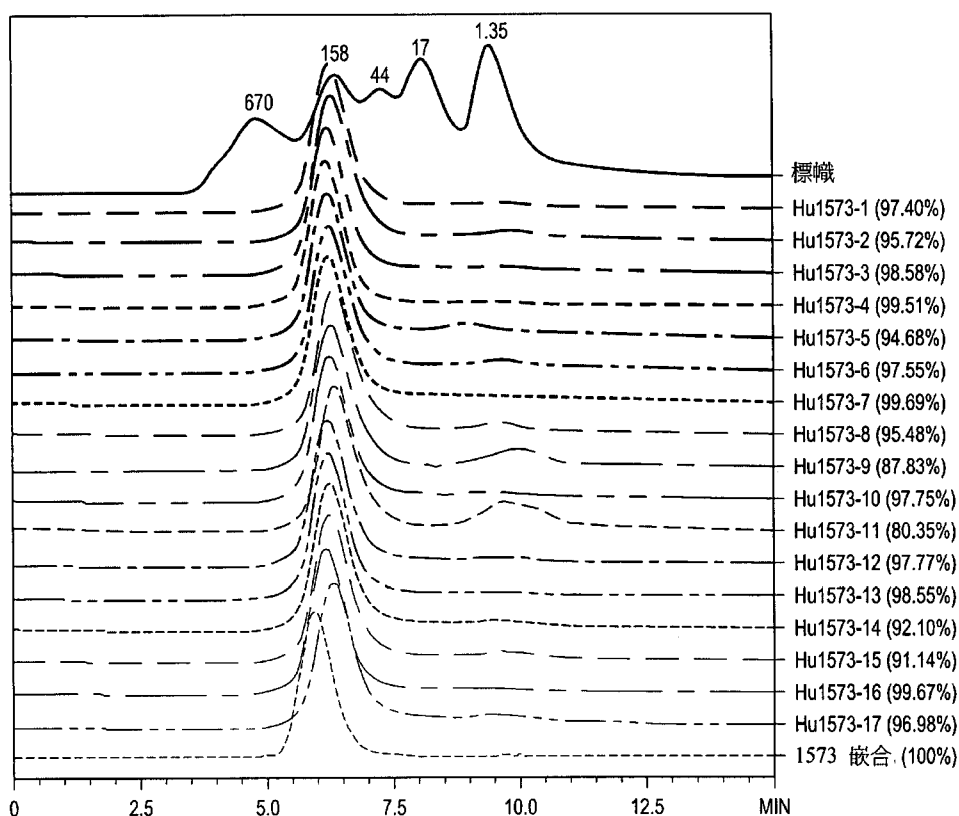
抗活化蛋白 C 之人化單株抗體及其用途

HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ACTIVATED PROTEIN C AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供特異地結合至活化蛋白 C 且抑制活化蛋白 C、但不會結合至非活化蛋白 C 或抑制非活化蛋白 C 之人化抗體。本文說明採用此等抗體的治療方法。

圖 1





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201437229 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 10 月 01 日

(21)申請案號：102143763

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 29 日

(51)Int. Cl.：

C07K16/40 (2006.01)

C07K16/46 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

A61P7/04 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/29

美國

61/731,368

(71)申請人：拜耳保健有限責任公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)

美國

(72)發明人：趙曉燕 ZHAO, XIAO-YAN (US)；王卓智 WANG, ZHUOZHI (CN)；金芝蓮 KIM, JI-YUN (US)；朱熒 ZHU, YING (CN)；特伯 簡 TEBBE, JAN (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：40 項 圖式數：6 共 96 頁

(54)名稱

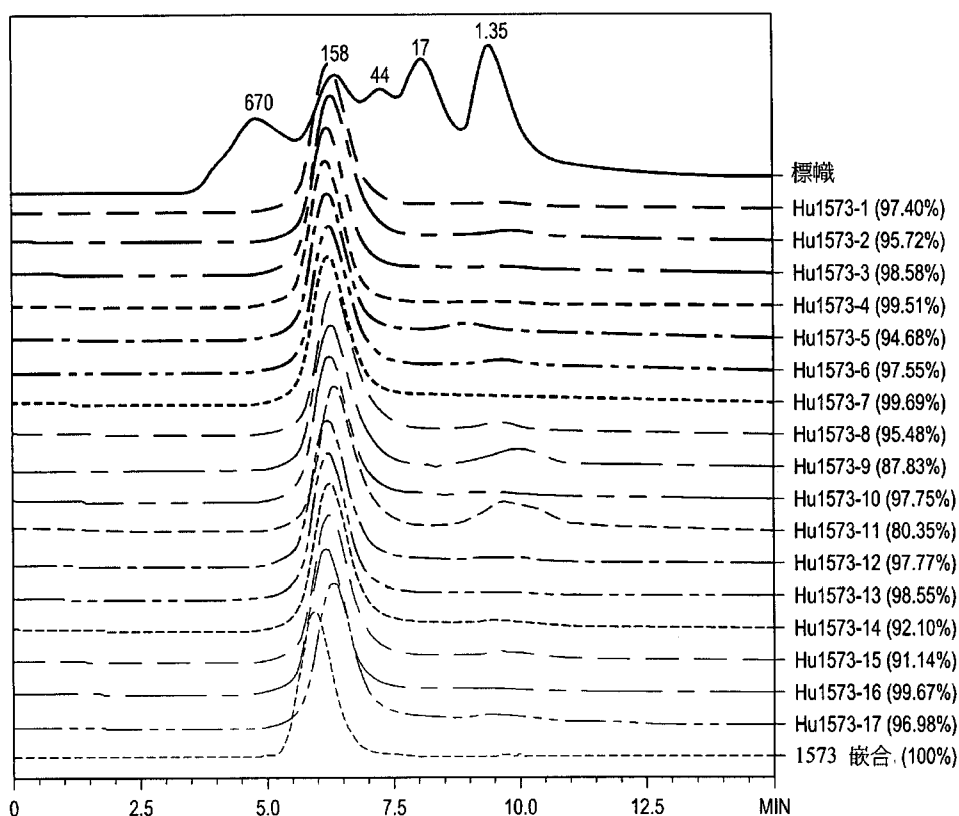
抗活化蛋白 C 之人化單株抗體及其用途

HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ACTIVATED PROTEIN C AND USES THEREOF

(57)摘要

本發明提供特異地結合至活化蛋白 C 且抑制活化蛋白 C、但不會結合至非活化蛋白 C 或抑制非活化蛋白 C 之人化抗體。本文說明採用此等抗體的治療方法。

圖 1



發明摘要

※ 申請案號：102143763

※ 申請日：102.11.29

※IPC 分類：C07K16/40(2006.01)
C07K16/46(2006.01)
A61K39/395(2006.01)
A61P7/04(2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗活化蛋白C之人化單株抗體及其用途

HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST
ACTIVATED PROTEIN C AND USES THEREOF

【中文】

本發明提供特異地結合至活化蛋白C且抑制活化蛋白C、
但不會結合至非活化蛋白C或抑制非活化蛋白C的人化抗體。
本文說明採用此等抗體的治療方法。

【英文】

Provided are humanized antibodies that selectively bind to
and inhibit activated protein C without binding to or inhibiting
unactivated protein C. Methods of treatment employing these
antibodies are described herein.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 1 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗活化蛋白C之人化單株抗體及其用途

HUMANIZED MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST

ACTIVATED PROTEIN C AND USES THEREOF

序列表

【0001】 依據37 C.F.R. 1.821(c)，隨附呈交序列表，其為在2013年11月產生並具有~25千位元組之命名為”BAYRP0002USP1_ST25”的ASCII相容文字檔。前述檔案的內容以其整體併入本文做為參考資料。

優先權聲明

【0002】 本申請案主張於2012年11月29日申請之美國臨時申請案第61/731,368號的權利，其揭示內容以其整體併入本文做為參考資料。

【技術領域】

【0003】 本發明提供特異地結合至活化蛋白C且抑制活化蛋白C但不會結合至非活化蛋白C或抑制非活化蛋白C的人化抗體。本文說明採用此等抗體的治療方法。

【先前技術】

【0004】 凝血是由各種血液組分或因子複雜交互作用所構成的一個最終產生血纖維蛋白(fibrin)血塊的過程。一般來說，參與凝血“級聯”的血液組分為酶原(proenzyme)或酵素原(zymogen)-其為酵素上不活化蛋白質，藉由活化因子的作用而被轉變成其活化形式。調節凝血在酵素上大多是透過促-凝血因子Va以及VIIIa的蛋白分解不活化而發生，這是藉由活化蛋白C (aPC)而達致(Esmon, 1989)。

【0005】 蛋白C為aPC的前驅體，是一種有效的天然抗凝血劑。蛋白C被與凝血調節素(TM)複合的凝血酶所活化。藉由內皮細胞蛋白C受體(EPCR)放大活化。TM以及EPCR可以因為發炎媒介因子(諸如腫瘤壞死因子)而被下調，由Esmon (1999)所回顧。在一些形式的敗血性休克(尤其是腦膜炎球菌血症)中，TM以及EPCR被發現會降低。因為EPCR與TM被表現在內皮上，無法直接在不移除血管的情況下決定它們如何恰當地發揮作用。

【0006】 aPC藉由蛋白分解切割並下調促-凝血因子而如同抗凝血劑般作用。aPC也提供抗細胞凋亡劑、抗發炎分子以及細胞保護劑般的重要作用。因為損失關鍵性因子(諸如在血友病中不存在因子VIII)而恆定失調，或者在受傷過程導致止血作用暫時喪失之創傷患者中的出血疾病，可以藉由移除aPC而獲得治療。但是，這種治療可能在除了移除抗凝血活性以外，還造成移除aPC有益功能的不樂見有害結果，因此，選擇性地靶定aPC的抗凝血活性同時保留其他分子功能無損的治療劑將會是所要的。

【發明內容】

【0007】 因此，提供一種抗體，其包含(a)包含由SEQ ID NO：1、2及3表示之重鏈CDR的重鏈；以及(b)包含由SEQ ID NO：4、5及6表示之輕鏈CDR的輕鏈。該抗體可以是人化抗體，且可以具有下列序列組成：

表1-抗體序列

	FR ₁	CDR1	FR ₂	CDR2	FR ₃	CDR3	FR ₄
輕鏈 CDR							
SEQ ID NO:		1		2		3	
重鏈 CDR							
SEQ ID NO:		4		5		6	
輕鏈骨架							
SEQ ID NO:	7		8		9		10
重鏈骨架							
SEQ ID NO:	11		12		13		14

【0008】 重鏈骨架區可以由SEQ ID NO：7、8、9及10表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換，及/或輕鏈骨架區可以由SEQ ID NO：11、12、13及14表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。例如，SEQ ID NO：8的殘基14可被Ala置換，及/或SEQ ID NO：9的殘基11、13與31可分別被絲胺酸、纈胺酸與異白胺酸置換；及/或重鏈可包含SEQ ID NO：16-24。又例如，SEQ ID NO：11的殘基4可被白胺酸置換；及/或SEQ ID NO：13的殘基12可被精胺酸置換；及/或輕鏈包含SEQ ID NO：26-30。該抗體可為單鏈抗體或抗體片段，諸如Fab'、Fab、F(ab')₂、單域抗體、Fv或scFv。亦提供包含前

面具體例中的任一者分散在醫藥上可接受載劑中的醫藥組成物。

【0009】 本揭示內容亦提供一種細胞或細胞株，其包含編碼含有下列的抗體之核酸：(a)包含由SEQ ID NO：1、2及3表示之重鏈CDR的重鏈；以及(b)包含由SEQ ID NO：4、5及6表示之輕鏈CDR的輕鏈。該抗體可以是人化抗體。重鏈骨架區可以由SEQ ID NO：7、8、9及10表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換，及/或輕鏈骨架區可以由SEQ ID NO：11、12、13及14表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。例如，SEQ ID NO：8的殘基14可被Ala置換，及/或SEQ ID NO：9的殘基11、13與31可分別被絲胺酸、纈胺酸與異白胺酸置換；及/或重鏈可包含SEQ ID NO：16-24。又例如，SEQ ID NO：11的殘基4可被白胺酸置換；及/或SEQ ID NO：13的殘基12可被精胺酸置換；及/或輕鏈包含SEQ ID NO：26-30。該抗體可為單鏈抗體或抗體片段，諸如Fab'、Fab、F(ab')₂、單域抗體、Fv或scFv。

【0010】 亦提供一種在個體中抑制活化蛋白C抗凝血活性的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。

【0011】 亦提供一種在個體中抑制活化蛋白C醯胺分解活性的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。

【0012】 亦提供一種治療有需要凝血之個體的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。

【0013】 亦提供一種治療罹患敗血症之個體的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。該方法可進一步包含投與活化蛋白C。

【0014】 亦提供一種治療罹患血友病之個體的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。

【0015】 亦提供一種在個體中調節止血作用的方法，包含投與

有效量之依據上述的抗體。該個體可以是創傷患者。

【0016】 亦提供一種在個體中調節血栓形成(thrombosis)的方法，包含投與有效量之依據上述的抗體。

【0017】 又另一個具體例具有包含依據上述之抗體的套組。該抗體可以諸如使用螢光團、放射性標記、化學發光標記、染料、量子點、珠粒或發色團而被標記。該套組可進一步包含緩衝液或稀釋液，及/或關於使用該抗體的使用說明。該抗體可存在於水性懸浮液中或被凍乾。

【0018】 預期本說明書中所討論的任一具體例可使用任何化合物、方法或組成物來實施，且反之亦然。

【0019】 其他目的、特徵以及優點將因為下列詳細說明而變得清楚。但是應理解，儘管指出特定具體例，但僅是藉由例示說明的方式提供詳細說明以及特定實例，因為落在發明精神與範疇內的各種修改與修飾對於習於技藝者來說將會因為本詳細說明而變得清楚。

說明

【0020】 本揭示內容是有關於發現選擇性地結合至活化蛋白PC，而不是非活化蛋白C，以及特異地抑制活化蛋白C的抗凝血活性的單株抗體。

【0021】 若適當的話，以單數使用的術語也將會包括複數且反之亦然。在下面所列舉任何定義與任何其他文件(包括併入本文做為參考資料的任何文件)中的單字用法相衝突的情況下，除非明確為相反意思(例如在術語最初使用的文件中)，否則就解釋本說明書及其相關申請專利範圍來說，下面所列舉的定義應永遠佔優勢。除非另

有說明，否則使用”或”表示”及/或”。除非另有說明或若使用”一或多”為明確不恰當的，否則使用”一”在此表示”一或多”。”包含”以及”包括”可交互使用且不具限制性。舉例而言，術語”包括”應表示”包括，但不限於”。

【0022】 術語”蛋白C”或”PC”如本文所用意指呈其酶原形式之蛋白C的任一種變異體、同型異構體，及/或物種同系物，其被細胞天然地表現並存在於細胞質中，且與蛋白C的活化形式不同。

【0023】 術語”活化蛋白C”或”aPC”如本文所用意指蛋白C的活化形式，其特徵在於因為凝血酶切割位點移除且不存在於蛋白C中的12個胺基酸活化肽。

【0024】 如本文所用，”抗體”意指完整抗體及其任何抗原結合片段(亦即”抗原-結合部分”)或單鏈。該術語包括天然的或由正常免疫球蛋白基因片段重組方法所形成的全長免疫球蛋白分子(例如IgG抗體)，或是免疫球蛋白分子的免疫活性部分，諸如抗體片段，其保有特異結合活性。不論結構為何，抗體片段與全長抗體所辨識的相同抗原結合。舉例而言，抗-aPC單株抗體片段結合至aPC的表位。抗體的抗原-結合功能可以由全長抗體的片段來執行。被術語抗體之”抗原-結合部分”所含括的結合片段實例包括：(i) Fab片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L ，與 C_{H1} 結構域組成的單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，一種包含兩個在樞紐區處由雙硫橋連結之Fab片段的二價片段；(iii)由 V_H 與 C_{H1} 結構域組成的Fd片段；(iv)由抗體單臂之 V_L 與 V_H 結構域組成的Fv片段；(v) dAb片段(Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546)，其由 V_H 結構域組成；(vi)經單離的互補決定區(CDR)；(vii)微抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體及 κ 抗體(參見，例如Ill *et al.*, *Protein Eng*

1997;10:949-57)；(viii)駱駝IgG；以及(ix) IgNAR。此外，儘管Fv片段的兩個結構域(V_L與V_H)是由個別基因所編碼，但它們可以使用重組方法、藉由合成連接子而被連結，使它們變成單一蛋白質鏈，其中V_L與V_H區配成對以形成單價分子(已知為單鏈Fv (scFv)；參見，例如Bird *et al.* (1988) *Science* 242:423-426；與Huston *et al* (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦欲被含括在術語抗體之”抗原-結合部分”中。此等抗體片段是使用習於技藝者所熟知的習知技術獲得，且以與完整抗體相同的方式來分析該等片段的效用。

【0025】 另外，預期抗原結合片段可含括在抗體擬似物中。術語”抗體擬似物”或”擬似物”如本文所用表示表現與抗體類似結合但卻是一個較小的替代性抗體或非抗體蛋白的蛋白質。抗體擬似物可包含於骨架中。術語”骨架”意指一種用於將帶有訂製功能與特性之新產物工程化的多肽平台。

【0026】 如本文所用，術語”抗-aPC抗體”意指特異地結合至aPC之表位的抗體。當在活體內結合至aPC的表位時，本文所揭示的抗-aPC抗體放大凝結級聯的一或多個方面。

【0027】 如本文所用，術語”抑制結合”及”阻斷結合”(例如參見抑制/阻斷aPC受質結合至aPC)可交替使用並含括部分與完全抑制或阻斷蛋白質與其受質，諸如抑制或阻斷達至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%。如本文所用，”約”表示指定數值的+/- 10%。

【0028】 提及抑制及/或阻斷aPC受質結合至aPC時，術語抑制

與阻斷也包括當與抗-aPC抗體接觸時，aPC對生理受質的結合親和力當與aPC不與抗-aPC抗體接觸時(例如阻斷aPC與其包括因子Va和因子VIIIa的受質交互作用)相比有可測得的降低，例如降低aPC與其受質接觸達至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%，或約100%。

【0029】 術語”單株抗體”或”單株抗體組成物”如本文所用意指單一分子組成物的抗體分子製劑。單株抗體組成物對特定表位表現單一結合特異性以及親和力。因此，術語”人類單株抗體”意指表現單一結合特異性的抗體，其具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列的可變區與恆定區。人類抗體可包括不被人類生殖系免疫球蛋白序列所編碼的胺基酸序列殘基(例如因為在活體外隨機或定點突變或因為活體內體突變而引入的突變)。

【0030】 ”經單離抗體”，如本文所用，欲意指基本上不含其他生物分子的抗體，包括具有不同抗原特異性的抗體(例如結合至aPC的經單離抗體基本上不含結合aPC以外之抗原的抗體)。在一些具體例中，經單離抗體依據乾重為至少約75%、約80%、約90%、約95%、約97%、約99%、約99.9%或約100%純。在一些具體例中，純度可藉由諸如管柱層析、聚丙烯醯胺凝膠電泳，或HPLC分析的方法來測量。但是，結合至人類aPC之表位、同型異構體或變異體的經單離抗體可能對其他相關抗原(例如來自其他物種，例如aPC物種同系物)具有交叉反應性。此外，經單離抗體基本上可不含其他細胞物質及/或化學品。如本文所用，”特異性結合”意指結合至預定抗原的抗體。典型地，表現”特異性結合”的抗體以至少約 10^5 M^{-1} 的親和力結合至

抗原且以比不相干抗原(例如BSA、酪蛋白)的結合親和力還高(例如)至少兩倍的親和力結合至該抗原。片語”辨識抗原的抗體”以及”對抗原具有特異性的抗體”在本文可與術語”特異地結合至抗原的抗體”交替使用。

【0031】 如本文所用，術語”最低結合”意指不結合至指定抗原及/或對特定抗原表現低親和力的抗體。典型地，對抗原具有最低結合的抗體以低於約 10^2 M^{-1} 的親和力結合至那個抗原，且不以比其結合至不相干抗原還高的親和力結合至預定抗原。

【0032】 如本文所用，術語”高親和力”對抗體(諸如IgG抗體)而言意指至少約 10^7 M^{-1} 的結合親和力，在至少一個具體例中至少約 10^8 M^{-1} 、在一些具體例中至少約 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 或更高，例如至高 10^{13} M^{-1} 或更高。但是，”高親和力”結合對其他抗體同型來說可能會不同。舉例而言，對IgM同型的”高親和力”結合意指至少約 10^7 M^{-1} 的結合親和力。如本文所用，”同型”意指由重鏈恆定區基因所編碼的抗體類型(例如IgM或IgG1)。

【0033】 ”互補決定區”或”CDR”意指抗體分子之重鏈可變區或輕鏈可變區內三個超變區中的一者，其形成與被結合抗原的三維結構互補的N端抗原-結合表面。從重鏈或輕鏈的N端開始，這些互補決定區分別表示為”CDR1”、”CDR2”以及”CDR3” [Wu TT, Kabat EA, Bilofsky H, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Dec;72(12):5107與Wu TT, Kabat EA, *J Exp Med*. 1970 Aug 1;132(2):211]。CDR涉及抗原-抗體結合，且CDR3包含對抗原-抗體結合具有特異性的特有區域。因此，抗原-結合位點可包括六個CDR，其包含由重鏈與輕鏈V區每一者之CDR區。

【0034】 術語”表位”意指抗體特異地結合或交互作用的抗原的範圍或區域，其在一些具體例中指示抗原在物理上與抗體接觸之處。相反地，術語”抗原決定簇(paratope)”意指抗原特異地結合之抗體上的範圍或區域。表位的特徵在於若對應抗體結合同時是具有排他性的話，亦即某個抗體的結合排除另一個抗體同時結合，競爭結合被認為是重疊的。若抗原能夠容納兩個對應抗體同時結合，則表位被認為是分散的(獨特)。

【0035】 術語”競爭抗體”，如本文所用，意指結合至與對抗如本文所述aPC之抗體大概，實質上或基本上相同，或甚至相同表位的抗體。”競爭抗體”包括具有重疊表位特異性的抗體。因此，競爭抗體能夠有效與如本文所述抗體競爭結合至aPC。在一些具體例中，競爭抗體可結合至與如本文所述抗體相同的表位。換個角度來看，競爭抗體具有與如本文所述抗體相同的表位特異性。

【0036】 如本文所述，”保守性置換”意指多肽修飾，其涉及將一或多個胺基酸置換成具有相似生化特性但不會造成多肽的生物或生化功能喪失的胺基酸。”保守性胺基酸置換”是將胺基酸殘基以具有相似側鏈的胺基酸殘基予以取代。具有相似側鏈的胺基酸殘基家族在本技藝中已經是明確的。此等家族包括下列：具有鹼性側鏈的胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β 分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)，以及芳香族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。本揭示內容的抗體可

具有一或多個仍保有抗原結合活性的保守性胺基酸置換。

【0037】 關於核酸以及多肽，術語“實質同源性”表示兩個核酸或兩個多肽，或其指定序列當在有適當核苷酸或胺基酸插入或刪除的情況下最佳比對並比較時核苷酸或胺基酸插的約80%，通常至少約85%是相同的，在一些具體例中約核苷酸或胺基酸的90%、91%、92%、93%、94%或95%，在至少一個具體例中至少約96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%。或者，當節段在選定的雜交條件下會與該股的互補股雜交的話，存在有核酸的實質同源性。具有與本文引用的特定核酸序列以及胺基酸序列具有實質同源性的核酸序列以及多肽序列也包括在內。

【0038】 兩個序列之間的同一性百分比是該等序列所共有的相同位置之數目的函數(亦即， $\% \text{同源性} = \text{相同位置數} / \text{位置總數} \times 100$)，考量空位數，以及各個空位長度，其需要被納入以供兩個序列的最佳比對之用。序列比對以及兩個序列之間的同一性百分比測定可使用數學計算法來達致，在不受到限制的情況下諸如為VectorNTI™的AlignX™模數(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。就AlignX™而言，多重比對的預設參數為：空位開放罰分：10；空位延伸罰分：0.05；空位分離罰分範圍：8；比對延遲的同一性%：40 (更多詳細內容見於 <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>)。

【0039】 測定測試序列(本揭示內容的序列)以及目標序列之間

的最佳整體匹配的另一個方法(亦意指全局序列比對(global sequence alignment))可使用CLUSTALW電腦程式(Thompson *et al.*, *Nucleic Acids Research*, 1994, 2(22): 4673-4680)來測定，該電腦程式是以Higgins等人的演算法(*Computer Applications in the Biosciences* (CABIOS), 1992, 8(2): 189-191)為基礎。在序列比對時，測試序列以及目標序列均為DNA序列。該全局序列比對的結果是以同一性百分比來表示。可用於DNA序列之CLUSTALW比對中以藉由成對比對來計算同一性百分比的參數為：矩陣=IUB、k-元組 = 1、頂對角數目 = 5、空位罰分 = 3、空位開放罰分 = 10、空位延伸罰分 = 0.1。關於多重比對，可使用下列CLUSTALW參數：空位開放罰分 = 10、空位延伸罰分 = 0.05；空位分離罰分範圍 = 8；比對延遲的同一性% = 40。

【0040】 核酸可存在於整個細胞中、在細胞溶解物中，或呈部分純化或實質上純的形式。當從在天然環境中與核酸相締合之其他細胞組分被純化出來時，核酸是”經單離”或”使之成為實質上純的”。為了要分離核酸，可使用諸如下列的標準技術：鹼/SDS處理、CsCl帶、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳以及技藝中熟知的其他技術。

I.活化蛋白C (aPC)及抗體

A.活化蛋白C

【0041】 蛋白C在內皮上被與凝血調節素(TM)複合的凝血酶所活化。不同於活化凝血酶在活體內的數秒暫時有效期，人類aPC在其生成後於循環中具有約20分鐘半衰期(Berg, *et al.*, 2003)。因此，可以合理在血漿中測量aPC位準來研究其在各種病理生理條件下的

調節。

B.針對aPC的抗體

【0042】 先前，發展鼠抗體HAPC1573，其增強FL-aPC結合在內皮細胞上。HAPC1573促使aPC透過aPC之Gla域和EPCR在細胞上交互作用而內化在內皮上，且這個內化作用可以被EPCR阻斷Ab或Gla域阻斷Ab (HPC1575)所阻斷。HAPC1573也戲劇性地改變aPC對其顯色受質(Spectrozyme PCa)的動力學參數。在HAPC1573存在下，aPC對小肽受質的這個深遠影響指出這個mAb辨識一個鄰近aPC活化位點的表位，且Ab與抗原的交互作用戲劇性地增加APC對小肽受質的親和力但降低產物與aPC催化位點的解離速率。HAPC1573幾乎也完全縮減aPC在因子Xa引起之一階段血漿凝血分析中的延長效用，暗示著HAPC1573與aPC的交互作用會防止aPC切割因子Va。出乎意料的，HAPC1573不會抑制，而實際上是增強aPC切割組蛋白H3及H4。相同地，HAPC1573不會抑制但卻會增強aPC細胞對內皮保護活性以對抗組蛋白H3及H4。最後，其結果顯示HAPC1573辨識aPC，而不是蛋白C。參見美國專利第8,153,766號。

【0043】 近來的研究已顯示，aPC的抗凝血活性對於其細胞保護功能不是必要的，但是對PAR1的aPC切割活性就其抗細胞凋亡效用來說是不可或缺的(Mosnier *et al.*, 2004)。但是，aPC的細胞保護效用已顯示不僅在表現EPCR的內皮細胞上，還有其他在其表面不表現EPCR的細胞，諸如神經元與角質細胞(Guo *et al.*, 2004; Berg *et al.*, 2003)，指出可能存在有PAR1以外的其他機制媒介aPC信號傳遞。

C.技術的應用

【0044】 識別蛋白C與aPC的能力說明了抗體在習用ELISA方法中用來在活體內測量血漿中aPC位準的實用性。典型地，相較於使用酶捕捉分析的19小時或甚至數週(Gruber and Griffen, 1992; Liaw *et al.*, 2003)，使用本方法花費少於4小時來測量含有1 ng/ml APC的血漿樣品。

【0045】 還有，如上所述，HAPC1573改變對顯色肽受質的aPC切割活性還有在血漿凝血分析中阻斷aPC抗凝血活性，暗示這個mAb辨識一個鄰近aPC活化位點的表位，並在抗體-抗原結合之後改變其催化活性。同時，HAPC1573確實增強aPC切割細胞外組蛋白，並增強對內皮之APC細胞保護活性對抗組蛋白。這指明關於切割活化因子V與VIII之APC抗凝血活性對於其透過切割細胞外組蛋白的細胞保護活性來說不是必要的。切割細胞外組蛋白獨立於其抗凝血活性可能是aPC調控發炎與細胞保護的分子機制之一。

【0046】 因此，如此對抗aPC的抗體可例如用於治療A型血友病患者。aPC同時切割因子VIIIa與因子Va且因而對凝血有負面影響。在A型血友病患者中，因子VIII位準低且因子Va受aPC而不活化在這些患者體內可能是調節止血與血栓形成的一個主要路徑。最近的臨床報告證實，因子V Leiden突變體對aPC切割具有抗性，對於A型血友病患者的出血症狀有益(van't Zant *et al.*, 1997)。在活體內使用抗體阻斷aPC對因子Va的抗凝血活性對於A型血友病治療來說是一種替代性方法，尤其是對於那些具有高位準因子VIII抑制劑而使得因子VIII代用療法可能不是非常有效的患者來說。

【0047】 在其他具體例中，對抗aPC之抗體的另一種可行臨床

應用在於治療創傷患者，其中恆定被破壞，可能有過量出血，且延遲外科手術干預以恢復恆定。使用抗體治療可選擇性地回復促-凝血狀態而不會消除APC的細胞保護或抗發炎活性。

【0048】 對抗aPC之抗體的又另一個臨床應用是在敗血症治療時與aPC組合。其在患者體內的出血副作用是因為aPC抗凝血活性。因為HAPC1573阻斷aPC抗凝血活性，同時維持或甚至增強aPC細胞保護效用，就其出血副作用來說，mAb-aPC複合體可能是一個比單獨aPC還要更好的治療劑。

II. 抗體結構

【0049】 抗體包含一個帶有共有結構特徵的醣蛋白家族。抗體是由四條形成三維結構的多肽組成。典型地，抗體是由兩種不同多肽，重鏈與輕鏈，所組成。抗體分子含有這些單元中的一或多者，每一單元包含兩條重鏈與兩個輕鏈。抗體分子典型由三個功能域構成：Fc、Fab與抗原-結合位點。

【0050】 有五種不同類型的重鏈多肽，命名為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 與 μ 。有兩種不同類型的輕鏈多肽，命名為 κ 與 λ 。抗體典型地含有僅一種類型的重鏈以及僅一種類型的輕鏈，儘管輕鏈可與任一種重鏈締合。

【0051】 各個重鏈多肽的羧基端已知為恆定(Fc)區。各個重鏈與輕鏈的胺基端已知為可變(V)區。在鏈的可變區中是已知為互補決定區(CDR)的超變區。一個重鏈與輕鏈的可變區締合形成抗原-結合位點。每一重鏈與每一輕鏈包括三個CDR。抗原-結合位點的六個CDR定義出形成抗原實際結合位點的胺基酸殘基。CDR可變異性是抗原辨識多樣化的原因。

【0052】 對抗aPC的抗體可藉由下表中列舉的序列來定義：

表1-抗體序列

	FR ₁	CDR1	FR ₂	CDR2	FR ₃	CDR3	FR ₄
輕鏈 CDR							
SEQ ID NO:		1		2		3	
重鏈 CDR							
SEQ ID NO:		4		5		6	
輕鏈骨架							
SEQ ID NO:	7		8		9		10
重鏈骨架							
SEQ ID NO:	11		12		13		14

III.對抗aPC的抗體

A.抗體片段

【0053】 因此，在一個具體例中，此等分子將包含例如藉由蛋白分解切割mAb或者是例如經由重組方法單鏈免疫球蛋白可生產所生產的片段(諸如(F(ab')₂)。此等抗體衍生物為單價。在一個具體例中，此等抗體可與另一者組合，或與其他抗體片段或受體配體組合以形成”嵌合”結合分子。值得注意的，此等嵌合分子可含有能夠結合至相同分子的不同表位的取代基，或者它們能夠結合至活化蛋白C表位以及”非活化蛋白C”表位。

【0054】 單鏈可變片段(scFv)是另一種形式的抗體片段。其包含免疫球蛋白之重鏈與輕鏈可變區的融合體，使用一個短(通常為絲胺酸、甘胺酸)連接子連接在一起。這個嵌合分子維持原有免疫球蛋

白的特異性，儘管已移除恆定區且引入一個連接子肽。這些分子是根據歷史被製出以促使噬菌體展示，其中表現抗原結合域為單一肽是非常方便的。或者，scFv可以直接從衍生自融合瘤之經次選殖的重鏈與輕鏈製出。單鏈可變片段缺乏在完整抗體分子中所找到的恆定Fc區，且共有結合位點(例如蛋白A/G)因而被用來純化抗體。這些片段通常可以使用蛋白L純化/固定，因為蛋白L與κ輕鏈的可變區交互作用。

【0055】 彈性連接子通常由促使螺旋與轉折的胺基酸殘基(諸如丙胺酸、絲胺酸及甘胺酸)組成。但是，其他殘基也同樣可以發揮作用。Tang *et al.* (1996)使用噬菌體展示作為針對單鏈抗體(scFv)從蛋白質連接子庫快速篩選訂製連接子的方法。構築一個隨機連接子庫，其中關於重鏈與輕鏈可變域的基因是藉由編碼可變組成之18個胺基酸的節段所連結。scFv全套(大約 5×10^6 不同成員)被展示在絲狀噬菌體上並且歷經使用半抗原的親和力篩選。選定變異體之群體在結合活性上明顯增加，但維持相當的序列多樣性。隨後篩選1054個各別變異體得到催化活性scFv，其是以可溶形式被有效率地生成。序列分析揭示，於連接子中在VH C末端之後的兩個殘基處有一個保守的脯胺酸且在其他位置處富含精胺酸與脯胺酸是選定繫鏈的唯一一個共同特徵。

【0056】 對抗aPC的重組抗體亦可包含容許受體二聚化或多聚化的序列或部分。此序列包括彼等衍生自IgA者，其容許與J鏈接合而形成多聚體。另一個多聚化域為Gal4二聚化域。在其他具體例中，該等鏈可以使用諸如生物素/抗生物素蛋白的試劑修飾，而容許兩個抗體合併。

【0057】 在一個不同的具體例中，單鏈抗體可以藉由使用非肽連接子或化學單元連接受體輕鏈與重鏈而製出。一般而言，輕鏈與重鏈將在不同細胞中生成、純化並且隨後以適當方式連結在一起(亦即重鏈的N端經由適當化學橋附接至輕鏈的C端)。

【0058】 交聯劑可用於形成分子橋，其約束兩個不同分子的官能基，例如穩定劑與聚集劑。但是，預想可製出同類的二聚體或多聚體或含有不同類似物的異源複合體。為了以逐步的方式連結兩個不同化合物，可使用排除非所要均聚物形成的異雙功能交聯劑。例示性雜雙功能交聯劑含有兩個反應基團：一者與一級胺基反應(例如N羥基琥珀醯亞胺)而另一者硫基反應(例如吡啶二硫物、馬來醯亞胺、鹵素等)。透過一級胺反應基，交聯劑可與某個蛋白質(例如選定抗體或片段)的離胺酸殘基反應，而透過硫基反應基，已繫住第一個蛋白質的交聯劑可與另一個蛋白質(例如選定藥劑)的半胱胺酸殘基(游離硫氫基)反應。

【0059】 可以採用在血液中具有適當穩定性的交聯劑。數種含有硫氫基的連接子為已知的，可順利地被用來接合目標與治療/預防藥劑。含有會在空間上阻礙之雙硫鍵的連接子證明會在活體內提供較高的穩定性，防止目標肽在到達作用位點之前鬆開。這些連接子因此是一群連接劑。

【0060】 另一個交聯試劑為SMPT，其為含有受到鄰接苯環與甲基”在空間上阻礙”之雙硫鍵的雙功能交聯劑。咸信雙硫鍵的空間阻礙充作保護鍵免於存在於組織及血液中的硫醇基陰離子(諸如穀胱胺肽)攻擊的功能，且從而協助防止接合物在附接劑投遞至目標位點之前去偶合。SMPT交聯試劑，與許多其他已知交聯試劑一樣，提

供交聯功能基團(諸如半胱胺酸的SH或一級胺(離胺酸的 ϵ 胺基))的能力。另一種可行類型的交聯劑包括雜雙功能光反應疊氮基苯，其含有可切割雙硫鍵，諸如磺基琥珀醯亞胺基-2-(p-疊氮柳基醯胺基)乙基-1,3'-二硫丙酸。N-羥基琥珀醯亞胺基與一級胺反應而疊氮基苯(在光分解之後)非選擇性地與任一胺基酸殘基反應。

【0061】 除了妨礙交聯劑以外，也可以依據本文採用非妨礙交聯劑。在不考慮含有或生成受保護雙硫的情況下，其他可供使用的交聯劑包括SATA、SPDP以及2-亞胺基硫代坊(thiolane) (Wawrzynczak & Thorpe, 1987)。使用此等交聯劑為技藝中充分理解的。另一種具體例涉及使用彈性連接子。美國專利第4,680,338號說明雙功能連接子可用於製造配體與含胺聚合物及/或蛋白質的接合物，特別適用於與螯合劑、藥物、酵素、可偵測標記與類似物形成抗體接合物。美國專利第5,141,648號以及第5,563,250號揭示含有可在各種溫和條件下被切割之易感鍵的可切割接合物。這個連接子尤其適用於感興趣試劑直接鍵結連接子，其中切割會使得活性劑釋放。特定用途包括添加游離胺基或游離硫氫基至蛋白質(諸如抗體或藥物)。

【0062】 美國專利第5,856,456號提供用於連接多肽組分而製造融合蛋白質(例如單鏈抗體)的肽連接子。連接子長度至多為約50個胺基酸，含有出現至少5次的帶電胺基酸(例如精胺酸或離胺酸)，接著是脯胺酸，且特徵在於穩定性更高與聚集降低。美國專利第5,880,270號揭示含有胺基氧基的連接子可用於各種免疫診斷與分離技術。

B. 抗體接合物

【0063】 進一步提供抗體接合物。關於診斷與治療用途，可將試劑連結或共價結合或複合至抗體。這樣的一種分子或部分可以是(但不限於)至少一種效應子或報導子分子。報導子分子定義為任一種可使用分析而被偵測的部分。已被接合至抗體之報導子分子的非限制性實例包括酵素、放射性標記、半抗原、螢光標記、磷光分子、化學發光分子、發色團、發光分子、光親和力分子、染色顆粒或配體(諸如生物素)。

【0064】 抗體接合物的某些實例為其中抗體連接至可偵測標記的彼等接合物。”可偵測標記”為可以被偵測的化合物及/或成分，因為它們的特定官能特性，及/或化學特徵，使用它們容許它們所附接的抗體被偵測到，及/或進一步量化(若需要的話)。另一個此種實例為形成包含抗體連結至細胞毒性或抗細胞劑的接合物，且可被命名為”免疫毒素”。

【0065】 抗體接合物被使用為診斷劑。抗體診斷劑通常有兩類，彼等用於活體外診斷者(諸如在各種免疫分析中)，及/或用於活體內診斷工具，通常已知為”抗體-指向顯影”。

【0066】 在技藝中已知許多適當顯影劑，還有它們附接至抗體的方法(參見例如美國專利第5,021,236號；第4,938,948號；以及第4,472,509號，各自併入本文作為參考資料)。使用的顯影部分為順磁離子；放射性同位素；螢光團；NMR-可偵測物質；X-射線顯影。

【0067】 在順磁性離子的例子中，可能透過例示方式提到諸如下列的離子：鉻(III)、錳(II)、鐵(III)、鐵(II)、鈷(II)、鎳(II)、銅(II)、釹(III)、釷(III)、鐿(III)、釷(III)、釷(II)、鉍(III)、鎢(III)、鈦(III)

及/或鉕(III)。可用於其他諸如X射線顯影的離子包括(但不限於)鐳(III)、金(III)、鉛(II)與尤其是銻(III)。

【0068】 在用於治療及/或診斷用途的放射性同位素中，可提到銲²¹¹、¹⁴碳、⁵¹鉻、³⁶氯、⁵⁷鈷、⁵⁸鈷、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、銻⁶⁷、³氫、碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹³¹、銩¹¹¹、⁵⁹鐵、³²磷、銻¹⁸⁶、銻¹⁸⁸、⁷⁵銲、³⁵硫、鐳^{99m}及/或鈹⁹⁰。¹²⁵I一般常用於某些具體例中，而鐳^{99m}及/或銩¹¹¹因為其能量低還有範圍偵測長的適用性也經常被使用。經放射性標記的單株抗體可以依據技藝中的已知方法製造。例如，單株抗體可以藉由與碘化鈉及/或碘化鉀接觸和化學氧化劑(諸如次氯酸鈉)或酵素氧化劑(諸如乳酸過氧化酶)而被碘化。單株抗體可以藉由配體交換程序(例如藉由以錫溶液還原高鐳酸鹽、螯合經還原鐳至Sephadex管柱且對管柱施加抗體)被標記鐳^{99m}。或者，可使用直接標記技術，例如藉由培育鐳酸鹽、諸如 SnCl_2 的還原劑、諸如酞酸鈉鉀溶液的緩衝溶液，以及抗體。通常用來結合至抗體之以金屬離子存在的結合放射線同位素的中介官能基為二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

【0069】 在預想用作為接合物的螢光標記中包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、異硫氰酸螢光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、若丹明綠、若丹明紅、腎造影素、ROX、TAMRA、TET、四甲基若丹明，及/或Texas Red。

【0070】 另一類抗體接合物預想為彼等主要用於活體外，其中

抗體連接至二級結合配體及/或酵素(酵素標誌)，其在與顯色受質接觸之後將會產生有色產物。適當酵素的實例包括尿素酶、鹼性磷酸酶、(辣根)過氧化氫酶或葡萄糖氧化酶。二級結合配體為生物素及/或抗生物素蛋白以及卵白素化合物。使用此等標記對於習於技藝者為已知且描述於例如美國專利第3,817,837號；第3,850,752號；第3,939,350號；第3,996,345號；第4,277,437號；第4,275,149號及第4,366,241號；各自併入本文做為參考資料。

【0071】 將分子位點特異性附接至抗體的又另一種已知方法包含抗體與以半抗原為基礎的親和力標記反應。簡言之，以半抗原為基礎的親和力標記在抗原結合位點中與胺基酸反應，從而破壞這個位點並阻斷特異性抗原反應。但是，這可能不是有益的，因為其造成抗體接合物的抗原結合喪失。

【0072】 含有疊氮基的分子也可以用於透過藉由低強度紫外光生成反應性氮烯中間物形成對蛋白質的共價鍵(Potter & Haley, 1983)。具體而言，嘌呤核苷酸的2-與3-疊氮基類似物已被用做為位點指向光探針來鑑定粗細胞萃取物中的核苷酸結合蛋白質(Owens & Haley, 1987; Atherton *et al.*, 1985)。2-與8-疊氮基核苷酸已被用來繪定經純化蛋白質的核苷酸結合域(Khatoun *et al.*, 1989; King *et al.*, 1989; and Dholakia *et al.*, 1989)且可用作為抗體結合劑。

【0073】 在技藝中已知數種將抗體附接或接合至其接合部分的方法。一些附接方法包含使用金屬螯合複合體，採用例如有機螯合劑，諸如在美國專利第4,472,509號與第4,938,948號中所述，各自併入本文做為參考資料)。單株抗體也可以在偶合劑(諸如戊二醛或過碘酸鹽)存在下與酵素反應。帶有螢光素標記的接合物可以在這些

偶合劑存在下或藉由與異氰酸鹽反應而製備。在美國專利第4,938,948號中，乳房腫瘤的顯影是使用單株抗體達致，而可偵測顯影部分是使用連接子(諸如甲基-p-羥基苯甲亞胺酸酯或N-琥珀醯亞胺基-3-(4-羥基苯基)丙酸)被結合至抗體。

【0074】 在其他具體例中，預期使用不會改變抗體結合位點的反應條件，藉由選擇性引入硫氫基至免疫球蛋白的Fc區中來衍生化免疫球蛋白。依據此方法學生產的抗體接合物被揭示為表現耐久性、特異性與敏感性增進(美國專利第5,196,066號，併入本文做為參考資料)。位點-特異性附接效應子或受體分子(其中該受體或效應子分子被接合至Fc區的醣類殘基上)亦揭示於文獻中(O'Shannessy *et al.*, 1987)。這個方法被報導為生產診斷與治療有效的抗體，其目前正在臨床評估中。

【0075】 在另一個具體例中，可選擇修飾免疫球蛋白以增進其活體內穩定性與半衰期。聚乙二醇化是一個這樣的方法，其包含將聚乙二醇(PEG)聚合物鏈共價附接至抗體。聚乙二醇化慣常地藉由將PEG的反應性衍生物與標的分子一起培育而達致。PEG的共價附接能夠“遮蔽”抗體躲過宿主免疫系統(免疫原性與抗原性降低)，並且增加藥劑的流體動力尺寸(溶液中的尺寸)(藉由降低腎廓清而延長其循環時間)。聚乙二醇化也提供水溶性。其他用來修飾抗體的聚合物包括聚乙烯亞胺與聚離胺酸，通常透過琥珀酸基團連結。

C. 免疫偵測方法

【0076】 在又其他具體例中，亦提供關於在免疫學上與生物組分反應之抗體來結合、純化、移除、量化及/或以其他方式偵測此等

生物組分的免疫偵測方法。一些免疫偵測方法包括酵素連結免疫吸附分析(ELISA)、放射免疫分析(RIA)、免疫放射分析、螢光免疫分析、化學發光分析、生物發光分析，以及西方墨點，僅列舉數種。各種可用免疫偵測方法的步驟已描述於科學文獻中，諸如Doolittle and Ben-Zeev (1999)；Gulbis and Galand (1993)；De Jager *et al.* (1993)；與Nakamura *et al.* (1987)，各自併入本文做為參考資料。

【0077】 一般而言，免疫結合方法包括獲得含有感興趣目標的樣品，並且使樣品與第一抗體接觸，該第一抗體在免疫學上與目標在有效容許免疫複合體形成的條件下反應。接著可使用各種不同形式來評估抗體對目標的結合。

【0078】 在一種形式中，抗體可以連接至固體載體上，固體載體為諸如成管柱基質的形式，而懷疑含有目標的樣品被施加至固定抗體。非所要組分將會從管柱被洗掉，留下免疫複合至固定抗體之目標要被溶離。

【0079】 免疫結合方法亦包括偵測與量化樣品中之目標數量，以及偵測與量化任何在結合過程期間形成之免疫複合體的方法。在此，吾人將取得懷疑含有目標的樣品，且使樣品與針對目標的抗體接觸，然後偵測並量化在特定條件下形成之免疫複合體數量。

【0080】 關於抗原偵測，待分析的生物樣品可以是懷疑含有目標之任一種樣品，諸如(例如)體液，像是血液、血清、血漿、黏液、尿液、唾液、淚液與精液。或者，可使用組織。使選定生物樣品與抗體在有效條件下接觸並歷時足夠容許免疫複合體(一級免疫複合體)形成的時間通常是將抗體組成物簡單添加至樣品並培育混合物歷時一段對抗體來說足以形成免疫複合體的時間，亦即結合至與存

在之抗體在免疫學上反應。之後，樣品-抗體組成物(諸如組織切片、ELISA盤、點漬或西方墨點)一般將被洗滌而移除任何非特異性結合成分，僅容許那些特異地結合於一級免疫複合體內的分子被偵測到。

【0081】 一般而言，偵測免疫複合體為技藝中熟知且可以透過採用數種方法而達致。這些方法通常是基於偵測標記或標誌，諸如那些放射性、螢光、生物或酵素標幟中的任一者。有關於使用此等標誌的美國專利包括第3,817,837號；第3,850,752號；第3,939,350號；第3,996,345號；第4,277,437號；第4,275,149號及第4,366,241號，各自併入本文做為參考資料。當然，可以透過使用技藝中熟知的二級結合配體(諸如第二抗體及/或生物素/抗生物素蛋白配體結合配置)發現其他優點。

【0082】 在偵測時採用的抗體可以是本身連結至可偵測標記，其中將能夠簡單地偵測這個標記，從而容許一級免疫複合體在組成物中的數量得以被測定。或者，結合於一級免疫複合體中的第一抗體可藉由對這個抗體具有結合親和力的第二結合配體而被偵測。在這些情況下，第二結合配體可以結合至可偵測標記。第二結合配體本身通常是抗體，因此可被稱為“二級抗體”。一級免疫複合體與經標記二級結合配體或抗體在有效條件下接觸並歷時足以容許二級免疫複合體形成的時間。二級免疫複合體接著一般將被洗滌而移除任何非特異性結合的經標記二級抗體或配體，然後偵測在二級免疫複合體內的殘留標誌。

【0083】 更多方法包括藉由兩步驟方法偵測一級免疫複合體。對抗體具有結合親和力的第二結合配體(諸如抗體)如上述被用來形成二級免疫複合體。在洗滌之後，二級免疫複合體與對第二抗

體具有結合親和力的第三結合配體或抗體再次於有效條件下接觸並歷時足以容許免疫複合體(三級免疫複合體)形成的時間。第三配體或抗體結合至可偵測標記，容許偵測由此形成的三級免疫複合體。若需要的話，這個系統提供訊號放大。

【0084】 由Charles Cantor設計的一種免疫偵測方法使用兩種不同抗體。在第一步驟中生物素化單株或多株抗體被用來偵測目標抗原(等)，而第二步驟抗體接著被用來偵測附接於複合生物素的生物素。在那個方法中，待測樣品首先在含有第一步驟抗體的溶液中培育。若目標抗原存在的話，一些抗體結合至抗原而形成生物素化抗體/抗原複合體。抗體/抗原複合體接著藉由在過量卵白素(抗生物素蛋白)生物素化DNA，及/或互補生物素化DNA溶液中培育而被擴增，其中各個步驟添加額外的生物素位點至抗體/抗原複合體。重複擴增步驟直到達致適當的擴增程度，於此時樣品培育在含有針對生物素之第二步驟抗體的溶液中。此第二步驟抗體經標記，像是使用可用以藉由組織酵素學使用顯色受質偵測抗體/抗原複合體存在的酵素般。在適當擴增下，生成巨觀可見的接合物。

【0085】 免疫偵測的另一種已知方法利用免疫-PCR (聚合酶鏈反應)方法學。直到與生物素化DNA培育為止PCR方法類似於Cantor方法，但是取而代之使用多回合卵白素與生物素化DNA培育，在低pH或高鹽緩衝液下洗滌DNA/生物素/卵白素/抗體複合體而釋出抗體。所得洗滌溶液接著與適當引子在適當控制下實施PCR反應。至少在理論上，PCR的龐大擴增力與特異性可用來偵測單抗原分子。

【0086】 另一種抗原被固定的ELISA包含在偵測時採用抗體競爭。在這種ELISA中，對抗抗原之經標記抗體被添加到孔中，容許

結合，及/或藉由其標記而被偵測到。未知樣品中的抗原數量接而是藉由將樣品與經標記抗體(針對抗原)混合在與經塗覆孔一起培育期間來進行測定。樣品中存在抗原會降低可用來結合至孔之對抗抗原的抗體數量，並因而降低最終訊號。這對於在未知樣品中偵測對抗抗原的抗體也是適當的，其中未標記抗體結合至經抗原塗覆的孔且亦降低可結合經標記抗體的抗原數量。

【0087】 如上詳述，免疫分析就其最為簡單及/或直接的方式為結合分析。某些免疫分析為數種技藝中熟知的酵素連結免疫吸附分析(ELISA)及/或放射免疫分析(RIA)。使用組織切片的免疫組織化學偵測也尤其實用。但是，可以輕易理解到偵測不限於此等技術，及/或西方墨點，可使用點漬、FACS分析，及/或類似技術。不論所採用的形式為何，ELISA共同具有某些特點，諸如塗覆、培育及結合、洗滌以移除非特異性結合成分，以及偵測結合的免疫複合體。這些描述於下。

【0088】 在以抗原或抗體塗覆盤時，通常將盤的孔與抗原或抗體的溶液一起培育，過夜或是歷時一段特定數小時時段。盤的孔接著被洗滌而移除不完全吸附的物質。然後孔的任何剩餘可用表面被“塗覆”以非特定蛋白質，其對於測試抗血清來說是在抗原上中性的。此等包括牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉。塗覆容許阻斷固定表面上的非特異性吸附位點且因而降低由抗血清非特異性結合在表面上所產生的背景。

【0089】 在ELISA中，可能更慣於使用二級或三級偵測方法而非直接程序。因此，在蛋白質或抗體結合至孔之後，塗覆以非反應性材料以降低背景，並且洗滌以移除未結合材料，固定表面在有效

容許免疫複合體(抗原/抗體)形成的條件下與待測試生物樣品接觸。偵測免疫複合體還需要經標記二級結合配體或抗體，以及二級結合配體或抗體與經標記三級抗體或第三結合配體接合。

【0090】 “在有效容許免疫複合體(抗原/抗體)形成的條件下”表示可包括使用溶液(諸如BSA、牛 γ 球蛋白(BGG)或磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)/Tween)稀釋抗原及/或抗體的條件。這些被添加的試劑亦傾向於輔助降低非特異性背景。

【0091】 ”適當”條件亦表示培育是在某個溫度下或歷時一段足以容許有效結合的時間期間。培育步驟通常從大約1至2至4小時，或在25°C至27°C等級的溫度下，或可以在大約4°C下過夜。

D.純化

【0092】 在某些具體例中，對抗aPC的抗體可以是經純化的。術語”經純化”如本文所用，欲意指一種組成物，可從其他組分被分離出來，其中蛋白質相對於其天然可得狀態被純化成任何程度。因此，經純化蛋白質亦意指沒有參雜其天然存在之環境的蛋白質。若使用術語”實質上純化”，這個命名將意指一種組成物，其中蛋白質或肽形成組成物的主要組分，諸如構成組成物中蛋白質的約50%。約60%、約70%、約80%、約90%、約95%或更高。

【0093】 蛋白質純化技術為習於技藝者所熟知。這些技術在一個層級上涉及細胞環境對多肽以及非多肽部分的粗分離。在將多肽與其他蛋白質分離之後，使用層析以及電泳技術來進一步純化感興趣多肽以達到部分或完全純化(或純化至同質性)。

【0094】 尤其適用於製備純肽的分析方法為離子交換層析、排

除層析；聚丙烯醯胺凝膠電泳；等電點聚焦。用於蛋白質純化的其他方法包括使用硫酸銨、PEG、抗體及類似物或藉由熱變性的沉澱，接著是離心；凝膠過濾、逆相、羥基磷灰石與親和力層析；以及此等與其他技術的組合。

【0095】 在純化對抗aPC的抗體時，在原核或真核表現系統中表現多肽並使用變性條件來萃取蛋白質是所要的。多肽可以從其他細胞組分使用親和力管柱被純化，其結合至多肽的經標誌部分。如技藝中一般所熟知，咸信進行各種純化步驟的順序可以改變，或某些步驟可以省略，且仍然可以產生製備實質上純蛋白質或肽的適當方法。

【0096】 通常，完整抗體是使用結合抗體之Fc部分的試劑(亦即蛋白A)而被區分。或者，抗原可同時用於純化並篩選適當抗體。此等方法通常採用結合至撐體(諸如管柱、過濾器或珠粒)上的篩選劑。抗體結合至撐體、移除汙染物，並且藉由施加條件(鹽、熱等)使得抗體釋放。

【0097】 用於量化蛋白質或肽之純化程度的各種方法對於習於技藝者來說從本揭示內容來看是熟知的。這些包括，例如測定活性部分的比活性，或是藉由SDS/PAGE分析評估部分的多肽數量。另一種評估部分純度的方法是計算部分的比活性，將其與起始萃取物的比活性相比，以及因而計算出純度。用於表示活性量的實際單位當然取決於選定遵循純化的特定評估技術以及經表現蛋白質或肽展現或不展現可偵測活性。

【0098】 已知多肽的移動有時會明顯地隨著不同的SDS/PAGE條件而改變(Capaldi *et al.*, 1977)。因此，將了解到在不同電泳條件

下，經純化或部分純化表現產物的表觀分子量可能有所改變。

IV.醫藥組成物與用途

A.組成物

【0099】 醫藥組成物可包含有效量之一或多種抗體、治療劑或其他藥劑，溶解或分散於醫藥上可接受載劑中。水性組成物包含有效量的抗體，溶解或分散於醫藥上可接受載體或水性介質中。片語”醫藥上或藥理學上可接受”意指當被投與給動物或人類(若適宜時)時，不會產生有害、過敏或其他不宜反應的分子實體以及組成物。

【0100】 如本文所用，"醫藥上可接受載體"包括任一種或所有溶劑、分散介質、包衣、界面活性劑、抗氧化劑、防腐劑(例如抗菌劑、抗真菌劑)、等張劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、藥物、藥物穩定劑、凝膠、黏結劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料，此等類似材料與其組成，如同習於技藝者所熟知(參見例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329，併入本文做為參考資料)。就醫藥活性物質來說，使用此等介質與試劑為技藝中熟知的。除了與活性成分不相容的任何習知介質或試劑以外，預期其使用於治療組成物中。補充性活性成分也可以併入組成物中。就人類投與來說，製劑必須符合生物標準FDA署的無菌、發熱性、一般安全性與純度標準。

【0101】 生物材料應經過充分透析以移除非所要的小分子量分子及/或經凍乾供更為容易調配於所要媒劑中(若需要的話)。活性化合物將被輕柔地調配供非經腸投與，例如調配供經由靜脈內、肌肉內、皮下、鼻內或腹膜內路徑注射用。典型地，此等組成物可被

製備成可注射(液體溶液或懸浮液)；適於使用在注射前添加液體之後製備溶液或懸浮液的固體形式可以被製備；而且該等製劑可以被乳化。

【0102】 適於可注射用途的醫藥形式包括無菌水溶液或分散液；包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的調配物；以及用於無菌可注射溶液或分散液之即用製劑的無菌粉末。在所有的情況下，該形式必須是無菌且必須是存在容易注射性的流體。其在製造與儲存條件下必須是穩定的且必須對抗微生物(諸如細菌與真菌)的汙染作用而被保存。

【0103】 活性化合物(諸如游離鹼或藥理學上可接受鹽)的溶液可以在水中適當地與界面活性劑(諸如羥丙基纖維素)混合而製備。分散液也可以製備於甘油、液體聚乙二醇及其混合物中與在油中。在一般儲存與使用條件下，此等製劑含有防腐劑以防止微生物生長。

【0104】 對抗aPC的抗體可以呈游離鹼、呈中性或鹽形式調配成組成物。醫藥上可接受鹽，包括酸加成鹽(與蛋白質游離胺基形成者)及與無機酸形成者，無機酸諸如為(例如)氫氯酸或磷酸，或與有機酸形成者，有機酸諸如為乙酸、草酸、酒石酸、杏仁酸與類似物。與游離羧基形成的鹽也可以衍生自無機鹼，諸如(例如)鈉、鉀、銨、鈣或氫氧化鐵；以及諸如有機鹼，如異丙胺、三甲胺、組胺酸、普魯卡因與類似物。

【0105】 載體也可以是溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇，以及液體聚乙二醇，與類似物)、其適當混合物，與植物油。可維持適當流動性，例如藉由使用包衣(諸如卵磷脂)、藉由維持所要粒徑(在分散液的情況下)以及藉由使用界

面活性劑。防止微生物作用可以藉由各種抗菌劑和抗真菌劑而引起，抗菌劑和抗真菌劑為例如對羥基苯甲酸、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞與類似物。在數種情況下，可納入等張劑，例如糖及氯化鈉。延長可注射組成物吸收可以藉由在組成物中使用延遲吸收劑而引起，延遲吸收劑為例如單硬脂酸鋁及明膠。

【0106】 無菌可注射溶液可以藉由將活性化合物以所要數量併入上列其他成分(若需要的話)以外的適當溶劑中，接著藉由無菌過濾來製備。一般而言，分散液是藉由將各種無菌活性成分併入無菌媒劑中來製備，該無菌媒劑含有基本分散介質與上述彼等的所需其他成分。在用以製備無菌可注射溶液之無菌粉末的情況下，製備方法可以是真空乾燥或冷凍乾燥技術，其產生活性成分加上任何其他所要成分的粉末，其來自其先前無菌過濾溶液。也預期更為或高度濃縮溶液供直接注射用的製劑，其中使用DMSO做為溶劑想像會對小區域產生極快穿透、遞送高濃度活性劑。

【0107】 在調配之後，溶液將以與劑量調配物相容的方式且以其在治療上有效的數量被投與。調配物可以各種劑型輕易投與，諸如上述可注射溶液的類型，但亦可採用藥物釋放膠囊與類似者。

【0108】 例如關於呈水溶液的非經腸投與，溶液若需要的話經適當緩衝且液體稀釋劑先以足夠鹽水或葡萄糖賦與等張性。這些具體水溶液尤其適於靜脈內、肌肉內、皮下、鼻內與腹膜內投與。就此，可被採用的無菌水性介質為習於技藝者依據本揭示內容為熟知的。例如，某個劑量可為溶解於1 ml等張NaCl溶液中或被添加至1000 ml皮下灌注液或在建議輸注處被注射(參見例如“Remington's Pharmaceutical Sciences” 15th Edition, pages 1035-1038 and

1570-1580)。一些劑量變化必然將會依據待治療個體的病況而發生。投與負責人在任何情況下決定用於個別個體的適當劑量。

【0109】 除了被調配成非經腸投與(諸如靜脈內或肌肉內注射)的化合物以外，其他醫藥上可接受形式包括(例如)錠劑或其他用於經口投與的固體；脂質體調配物；時間釋放膠囊；以及任何其他目前使用的形式，包括甜烈酒。

【0110】 在某些具體例中，預期使用脂質體及/或奈米粒子用以製備並投與抗體及/或其類似物。脂質體的形成與用途為習於技藝者所熟知，且亦描述於下。

【0111】 奈米膠囊通常以穩定且可重複實施的方式捕獲化合物。為了避免因為細胞內聚合過載所致的副作用，此等超微細粒子(尺寸為約0.1 μm)應設計為使用能夠在活體內分解的聚合物。預想符合這些要件的生物可分解聚烷基-氰基丙烯酸鹽奈米粒子可供使用，且此等粒子易於製造。

【0112】 脂質體是由分散於水性介質中的磷脂形成並自發性地形成多層同心雙層囊泡(亦稱為多層囊泡(MLV))。MLV通常具有約25 nm至4 μm 的直徑。音波處理MLV會形成小的單層囊泡(SUV)，其直徑範圍在200-500 Å，在核心中含有水溶液。

【0113】 亦採用下列資訊來生成脂質體調配物。當分散於水中時，磷脂可形成脂質體以外的各種結構，取決於液體對水的莫耳比率。在比率低時，脂質體是最可能的結構。脂質體的物理特性取決於pH、離子強度與二價陽離子的存在。脂質體對離子與極性物質可顯示低通透性，但在溫度升高下歷經明顯改變其通透性的相轉移。相轉移涉及從封閉堆疊的有序結構(已知為凝膠狀態)改變成鬆散堆

疊的較不有序結構(已知為液體狀態)。這發生在獨特相轉移溫度下且造成對離子、糖與藥物的通透性增加。

【0114】 脂質體與細胞經由四種不同機制交互作用。藉由網狀內皮系統之吞噬細胞的內吞作用(諸如巨噬球與中性球)；藉由非特异性微弱疏水性或靜電力，或藉由細胞表面組分的特异性交互作用吸附至細胞表面；與漿細胞膜藉由插入脂質體的脂質雙層融合至漿細胞膜，其中同時釋放脂質體內容物至細胞質中；以及藉由將脂質體脂質轉移至細胞或亞細胞膜，或反之亦然，而沒有與脂質體內容物相締合。改變脂質體調配物可改變運作機制，儘管在同時可能有超過一者以上運作著。

【0115】 治療劑可包含不同類型的載劑，取決於其要呈固體、液體或氣溶膠形式，及其是否需要為無菌以供作為注射投與路徑。對抗aPC的抗體可以靜脈內、皮內、動脈內、腹膜內、病灶內、腦內、關節內、前列腺內、胸膜內、氣管內、鼻內、玻璃體內、陰道內、直腸內、局部、肌肉內、腹膜內、皮下、結膜下、囊內、黏膜、心包內、臍帶內、眼內、經口、局部、部分、藉由吸入(例如氣溶膠吸入)、藉由注射、藉由輸注、藉由連續輸注、局部灌流系統直接靶定細胞、經由導管、經由灌洗、以甜烈酒、以液體組成物(例如脂質體)、或藉由其他方法或前述的任一種組合，如習於技藝者所熟知(參見例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed. Mack Printing Company, 1990，併入本文做為參考資料)。

【0116】 被投與給動物患者的組成物實際劑量可以由臨床醫師與諸如體重、病況嚴重性、待治療疾病類型、先前或同時治療干涉、患者的自發症以及投與路徑的物理與生理因子來決定。負責投

藥的臨床醫師在任何情況下決定組成物中的活性成分濃度與用於個別個體的適當劑量。

【0117】 在某些具體例中，醫藥組成物可包含例如至少約0.1% 活性化合物。在其他具體例中，活性成分可包含例如介於約2%至約75%單位重量，或介於約25%至約60%，以及可衍生其中的任何範圍。在其他非限制性實例中，劑量也可以包含每次投與約1微克/kg/體重、約5微克/kg/體重、約10微克/kg/體重、約50微克/kg/體重、約100微克/kg/體重、約200微克/kg/體重、約350微克/kg/體重、約500微克/kg/體重、約1毫克/kg/體重、約5毫克/kg/體重、約10毫克/kg/體重、約50毫克/kg/體重、約100毫克/kg/體重、約200毫克/kg/體重、約350毫克/kg/體重、約500毫克/kg/體重，至約1000 mg/kg/體重或更高，以及可衍生其中的任何範圍。在可衍生自本文所列數字的任何範圍的非限制性實例中，可基於上述數目投與約5 mg/kg/體重至約100 mg/kg/體重、約5微克/kg/體重至約500毫克/kg/體重等的範圍。

【0118】 在任何情況下，組成物可包含各種抗氧化劑以延遲一或多種組分氧化。

【0119】 在組成物呈液體形式的具體例中，載劑可以是包含但不限於下列的溶劑或分散介質：水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、液體聚乙二醇等)、脂質(例如三甘油酯、植物油、脂質體)及其組合。可維持適當流動性，例如藉由使用包衣(諸如卵磷脂)；藉由維持所要粒徑，透過分散於載劑(諸如例如液體多元醇或脂質)中；藉由使用界面活性劑，諸如例如羥丙基纖維素；或其組合。在許多情況下，等張劑可包括，諸如例如糖、氯化鈉或其組合。

【0120】 在其他具體例中，可使用眼滴劑、鼻溶液或噴霧劑、

氣溶膠或吸入劑。此等組成物通常被設計成與目標組織類型相容。在非限制性實例中，鼻溶液通常是被設計成呈滴劑或噴霧劑投與至鼻通道的水溶液。鼻溶液是以它們在許多方面與鼻分泌物相似的方式來製備，這樣維持正常纖維活動。因此，在一些具體例中，水性鼻溶液通常為等張或略經緩衝以維持約5.5至約6.5的pH。此外，類似於彼等使用於眼製劑的抗微生物防腐劑、藥物或適當藥物穩定劑可納入調配物中(若需要的話)。舉例而言，已知各種商用鼻製劑且包括諸如抗生素或抗組織胺的藥物。

【0121】 在某些具體例中，抗體是被製備為藉由如經口攝入的路徑投與。在這些具體例中，固體組成物可包含，例如溶液、懸浮液、乳液、錠劑、丸劑、膠囊(例如硬殼或軟殼明膠膠囊)、持續釋放調配物、頰內組成物、片劑、酏劑、懸浮液、糖漿、薄片，或其組合。經口組成物可直接與飲食合併。用於經口投與的載劑包含惰性稀釋劑、可同化食用載劑或其組合。在其他具體例中，經口組成物可以製備為糖漿或酏劑。糖漿或酏劑可包含例如至少一種活性劑、甜味劑、防腐劑、調味料、染料、防腐劑或其組合。

【0122】 在某些具體例中，經口組成物可包含一或多種黏結劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、調味劑及其組合。在某些具體例中，組成物可包含下列一或多者：黏結劑，諸如例如黃蓍膠、阿拉伯膠、玉米澱粉、明膠或其組合；賦形劑，諸如例如磷酸二鈣、甘露醇、乳糖、澱粉、硬脂酸鎂、糖精鈉、纖維素、碳酸鎂或其組合；崩解劑，諸如例如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、褐藻酸或其組合；潤滑劑，諸如例如硬脂酸鎂；甜味劑，諸如例如蔗糖、乳糖、糖精或其組合；調味料，諸如例如薄荷、冬青油、櫻桃調味料、柳橙調味料等；或

前述的組合。當劑量單位形式為膠囊時，其除了上述類型的材料以外還可含有諸如液體載劑的載劑。各種其他材料可如包衣般存在或以其他方式修飾劑量單位的物理形式。例如，錠劑、丸劑或膠囊可以蟲膠、糖或兩者塗覆。

【0123】 適用於其他投與模式的其他調配物包括栓劑。栓劑為具有不同重量與外型的固體劑型，通常摻有藥物，用於插入直腸、陰道或尿道。在插入後，栓劑軟化、融化或溶解於腔道液體中。一般而言，就栓劑來說，習用載劑可包括例如聚烯烴基二醇、三甘油酯或其組合。在某些具體例中，栓劑可以由含有(例如)範圍在約0.5%至約10%，及約1%至約2%的活性成分。

【0124】 組成物必須在製造與儲存條件下為安定的，且對抗微生物汙染作用而保存，諸如細菌與真菌。內毒素汙染應被維持在最低安全程度，例如少於0.5 ng/mg蛋白質。

【0125】 在特定具體例中，可注射組成物延長吸收可以是藉由在組成物中使用延遲吸收藥劑所致，諸如(例如單硬脂酸鎂、明膠或其組合)。

B.醫藥用途

【0126】 單株抗體可用以治療先天及後天凝血缺乏症或缺陷供治療之用。例如，上述具體例中的單株抗體可用來阻斷aPC與其受質交互作用，受質包括因子Va或因子VIIIa。

【0127】 單株抗體在治療諸如血小板減少症、血小板病症與出血病症的止血障礙(例如A型血友病、B型血友病與C型血友病)具有治療用途。此等病症可以藉由對有需要之患者投與治療有效量的抗

-aPC單株抗體而獲得治療。單株抗體在治療適應症之不受控出血(諸如創傷與出血性休克)也具有治療用途。因此，亦提供一種用以縮短出血時間的方法，包含向有需要的患者投與治療有效量的抗-aPC單株抗體。

【0128】 在另一個具體例中，抗-aPC抗體可用作為經aPC治療之患者的解毒劑，包括例如其中aPC用於治療敗血症或出血病症。

【0129】 抗體可用作為單一療法或與其他療法組合以處理止血病症。例如，共投與一或多種抗體與凝血因子(諸如因子VIIa、因子VIII或因子IX)咸信可用於治療血友病。在一個具體例中，提供一種治療先天與後天凝血缺乏症或缺陷的方法，包含投與(a)第一量之結合至人類組織因子路徑抑制劑的單株抗體，以及(b)第二量之因子VIII或因子IX，其中該第一量與第二量一起有效治療該缺乏症或缺陷。在另一個具體例中，提供一種治療先天及後天凝血缺乏症或缺陷的方法，包含投與(a)第一量之結合至人類組織因子路徑抑制劑的單株抗體，以及(b)第二量之因子VIII或因子IX，其中該第一量與第二量一起有效治療該缺乏症或缺陷，且進一步其中因子VII不被共投與。亦納入一種醫藥組成物，其包含治療有效量之單株抗體與因子VIII或因子IX組合，其中該組成物不含有因子VII。”因子VII”包括因子VII及因子VIIa。這些組合療法可能會降低凝血因子的必要輸注頻率。藉由共投與或組合療法，投與兩種治療性藥物表示個別分開調配或調配在一個組成物中，且當分開調配時，在大約相同時間或不同時間，但在相同治療時段內被投與。

【0130】 在一些具體例中，本文所述一或多種抗體可組合使用以處理止血病症。例如，共投與兩種或更多種本文所述抗體咸信可

用於治療血友病或其他止血病症。

【0131】 醫藥組成物可非經腸被投與給罹患A型血友病或B型血友病的患者，以隨著出血事件的嚴重性而改變的劑量與頻率，或在預防療法中可隨著患者凝血缺乏症的嚴重性而改變。

【0132】 組成物以團注或藉由連續輸注被投與給有需要之患者。例如，團注投與呈Fab片段形式之本發明抗體可為0.0025至100 mg/kg體重、0.025至0.25 mg/kg、0.010至0.10 mg/kg或0.10-0.50 mg/kg的量。關於連續輸注，以0.001至100 mg/kg體重/分鐘、0.0125至1.25 mg/kg/min、0.010至0.75 mg/kg/min、0.010至1.0 mg/kg/min或0.10-0.50 mg/kg/min投與呈Fab片段之本發明抗體歷時1-24小時、1-12小時、2-12小時、6-12小時、2-8小時或1-2小時。關於投與呈全長抗體(具有完整恆定區)之本發明抗體，劑量可為約1-10 mg/kg體重、2-8 mg/kg或5-6 mg/kg。此等全長抗體典型藉由輸注延長為三十分鐘至三小時的期間來投與。投與頻率取決於病況嚴重性。頻率可為每週三次至每兩週至六個月一次。

【0133】 此外，組成物可經由皮下注射被投與給患者。例如，劑量為10至100 mg抗-aPC抗體可經由每週、每兩週或每個月皮下注射被投與給患者。

【0134】 如本文所用，”治療有效量”表示抗-aPC單株抗體或此抗體與因子VIII或因子IX之組合的數量(在活體內有效增加凝血時間所需或以其他方式對有需要之患者造成活體內可測得益處的數量)。準確數量將取決於數種因素，包括(但不限於)組分與治療組成物的物理性質、所要的患者群體、個別患者考量，以及類似因素，且可由習於技藝者容易決定。

V.套組

【0135】 本文所述組成物的任一者可包含於套組中。該套組因而在適當容器中包含抗體及/或其他藥劑。其他組分可納入套組中。診斷及治療套組在適當容器中包含抗體之醫藥上可接受調配物於醫藥上可接受之調配物中。該套組可具有單一個容器，及/或其可針對個別化合物具有不同容器。

【0136】 當套組的組分以一及/或多種液體溶液提供時，液體溶液為水溶液，其中無菌水溶液為特定具體例的一個實例。抗體也可以調配至可注射組成物中，其中容器本身為注射器、抽吸管及/或類似裝置，調配物可自其施用至身體的感染區域、被注射至動物，及/或施用及/或與套組的其他組分混合。

【0137】 但是，套組的組分可如乾燥粉末提供。當試劑及/或組分以乾燥粉末提供時，粉末藉由添加適當溶劑而被還原。預想溶劑可以提供於另一個容器中。

【0138】 容器通常將包括至少一個小管、試驗管、燒瓶、瓶、注射器及/或其他容器，抗體/抗體調配物經適當分配被放置其中。套組亦可含有第二容器供無菌醫藥上可接受緩衝液及/或其他稀釋劑容納。

【0139】 套組亦可包括以密封包裝容納小瓶的裝置供商業販售，諸如(例如)注射及/或吹模塑膠容器，所要小瓶被保存其中。

【0140】 不論容器的數量及/或類型為何，套組亦可包含輔助注射/投與及/或放置最終抗體於動物體內的裝置及/或與其一起包裝。此裝置可為注射器、抽吸管、鑷子及/或任何此等醫藥許可投遞媒具。

【圖式簡單說明】

【0141】 下列圖式構成本說明書的一部分且被納入以進一步說明本揭示內容的特定態樣。藉由參照這些圖式中之一或多者並組合本文呈現之特定具體例詳細說明將更能了解本揭示內容。

【0142】 圖1-1573人化抗體的SEC分析。

【0143】 圖2-使用胺偶合法將捕捉抗體固定至CM5晶片上。分別產生9200 RU的抗-小鼠FC IgG訊號(上圖)以及6400 RU的抗-人FC IgG(下圖)。運行緩衝液為HBS-EP運行緩衝液：10 mM HEPES、pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20。

【0144】 圖3-SPR感測器-人類aPC對1573抗體的結合圖：人類aPC在30 μ l/min下被分別以0、1.25、2.5、5、10、20 nM的濃度注射在1573抗體上，締合期為180 s而解離期為500 s。

【0145】 圖4-SPR感測器-馬來猴aPC對1573抗體的結合圖：馬來猴aPC在30 μ l/min下被分別以0、5、10、20、40、80 nM的濃度注射在1573抗體上，締合期為180 s而解離期為420 s。

【0146】 圖5-人類PC與aPC的1573人化抗體結合ELISA。

【0147】 圖6-猴PC與aPC的1573人化抗體結合ELISA。

【實施方式】**VI. 實例**

【0148】 納入下列實例以說明具體例。彼等習於技藝者應理解，實例中揭示的下列技術表示發明人發現在實施時運作良好的技術，且因此可被認為就其實施而言為指定模式。但是，彼等習於技藝者依據本揭示內容能預期在揭示的特定具體例中可做出許多變化

且仍然獲得類似或相似結果，而未偏離精神與範疇。

實例1-材料與方法

【0149】 設計人化1573 VH/VL。取得小鼠aPC單株抗體的蛋白質及DNA序列資訊。使用下列方法完成人化設計：決定VH/VL CDR殘基並以Kabat編號系統註解(在全世界 bioinf.org.uk/abs/#kabatnum)。VH/VL CDR的標準結構是基於文獻(1-2)中的報導來決定。依據VH/VL CDR標準結構，篩選帶有相同標準結構的人類生殖系骨架受體。

【0150】 1573序列被用來blast檢索PDB資料庫並獲得與目標抗體共有最高序列同一性之抗體結構。依據blast檢索與序列同一性比率的輸出結果，1M71、1M7D以及1M7I被選出作為VH模型建立的模板，而1IQW、1IT9以及2GCY被選出作為VL鏈模型建立的模板。Schrodinger suite軟體被用來以環最佳化建構VL及VH鏈的同源性模型。接著以CCP4 suite中的軟體”contact”分析輸出模型，提供一個骨架區的在4Å內全部與CDR區殘基交互作用的殘基清單。依據軟體的輸出結果以及模型的視覺觀察，骨架中的下列殘基被鑑定為支持CDR環的殘基。它們為：輕鏈殘基Asp70、Tyr36、Thr69、Phe71、Ile2與Tyr49；重鏈殘基Arg94、Arg38、Glu46、Trp47、Asp73、Arg71，與Trp102。關於設計人化VH，支持環節構與VH/VL介面的殘基被鑑定出(國際專利申請案第WO2008021156號)。對於環構型與VH/VL介面來說重要的殘基被回復突變。然後帶有回復突變的VH序列與選定生殖系次家族比對。分析在相同標準子集內之每一個別人類生殖系骨架序列的同一性與相似性，而相對於鼠VH序列帶有最佳整體同源

性被鑑別出來。其被選定作為受體人類生殖系骨架供移植VH CDR之用。其他關於突變的考量包括Q1E突變被用來消除N端焦麩胺酸形成。突變也包括與選定VH家族就CDR標準結構和VH/VL介面維持一致的彼等。突變也可能包括彼等依據分子模型建立在自CDR結合區起算4Å內者。進行分析來確認N-連結醮化型態(N-{P}-S/T)在提議人化構築體中被發現。

【0151】 基於最佳序列同源性選定人類JH區。亦依據上述方法設計人化VL序列。

【0152】 生成HC與LC表現質體。使用基因重新合成法建構人化V區序列。經PCR擴增的VH藉由同源性重組被選殖至pCP-hCg1表現載體中。經擴增Vk使用相同方法被選殖至pCP-hck載體中。

【0153】 嵌合HC與LC的可變區(VH與VL)從1573經PCR擴增。經凝膠純化的PCR產物藉由同源性重組被選殖至與人化V區相同的載體中。

【0154】 HEK293細胞的暫時轉染。在轉染前約24小時，以 0.5×10^6 細胞/ml通過FreeStyle™ 293E並在120 rpm/min、37°C、8% CO₂下震盪細胞。轉染當天，細胞密度應為約 $1.0-1.2 \times 10^6$ /ml。利用生長培養基將細胞分成 1×10^6 /ml。為了確保轉染最佳化，測量細胞可活性為>95%。在FreeStyle™ 293表現介質(293E)中以等同於十分之一經轉染培養基的體積稀釋DNA。將PEI添加至DNA中；立刻渦漩混合物並在室溫下於添加至細胞前培育10分鐘。DNA對PEI的最終濃度比率為1:2。

【0155】 人化1573 IgG抗體的純化。在第6天的條件培養基被加載至1 ml蛋白A管柱上，該管柱預先藉由10 ml PBS，pH 7.0平衡。

接著在樣品加載後，以平衡緩衝液洗滌管柱。在洗滌之後，以100 mM 甘油-HCl pH 3.0沖提管柱，接著立刻添加1 M Tris-HCl溶液將pH值調整至8.0。最終產物經對PBS溶液透析。藉由SDS-PAGE、SEC分析蛋白質純度並藉由Bradford方法測定其濃度。

【0156】 經純化抗體的尺寸排除層析分析。在環境溫度下採用Superdex 200 5/150, GL管柱使用HPLC系統(LC-20AD, Shimadzu)針對分析經純化抗體進行SEC。PBS緩衝液pH 7.0，以0.3 mL/min的流速被用作為流動相。在280 nm下進行蛋白質偵測。

【0157】 抗-小鼠FC抗體固定於CM5晶片上。CM5感測晶片在FC2中藉由6分鐘注射(10 μ l/min)新鮮製備1:1的50 mM NHS:200 mM EDC而被活化。接著將於10 mM乙酸鈉緩衝液PH 5.0 (1.4 μ l稀釋於90 μ l NaAc, pH 5.0)的抗小鼠FC抗體以5 μ l/min注射至經活化晶片上(HBS-EP運作緩衝液:10 mM HEPES, pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20)。使用7 min注射1M乙醇胺以10 μ l/min阻斷其餘活性偶合位點。產生約9200 RU。

【0158】 抗-人類FC抗體固定至CM5晶片上。CM5感測晶片在FC2中藉由7分鐘注射(10 μ l/min)新鮮製備1:1的50 mM NHS:200 mM EDC而被活化。接著將於10 mM乙酸鈉緩衝液PH 5.0 (2.5 μ l稀釋於90 μ l NaAc, pH 5.0)的抗人類FC抗體以5 μ l/min注射至經活化晶片上(HBS-EP運作緩衝液:10 mM HEPES, pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20)。使用7 min注射1M乙醇胺以10 μ l/min阻斷其餘活性偶合位點。產生約6400 RU。

【0159】 人類aPC結合至1573抗體的Biacore分析。1573抗體首先被捕捉於經抗人類FC IgG塗覆之CM5晶片上，接著注射呈濃度為

0、1.25、2.5、5、10及20 nM的抗原人類aPC。循環條件如下：30 μ l/min的締合期歷時180 s以及解離期歷時500 s。在10 μ l/min下以30 s注射Gly PH1.5使表面再生。HBS-EP運作緩衝液：10 mM HEPES, pH 7.4、150 mM NaCl、3.4 mM EDTA、0.005%界面活性劑P20。使用Biacor X100評估軟體第2.0版計算動力學。

【0160】 馬來侯aPC結合至1573抗體的Biacore分析。1573抗體首先被捕捉於經抗人類FC IgG塗覆之CM5晶片上，接著注射呈濃度為0、5、10、20、40、80 nM的抗原馬來猴aPC。循環條件如下：30 μ l/min的締合期歷時180 s以及解離期歷時420 s。在10 μ l/min下以45 s注射Gly PH1.5使得表面再生。使用Biacor X100評估軟體第2.0版計算動力學。

【0161】 經純化抗體的結合ELISA。在4℃下以稀釋於DPBS (Gibco, cat#14040)中的100 μ l人類aPC (1 μ g/ml)、hPC (2 μ g/ml)、猴aPC (2 μ g/ml)或猴PC (2 μ g/ml)塗覆盤(Nunc, cat#442404)過夜(o/n)。洗滌之後，在室溫下以200 μ l MPBST阻斷ELISA歷時1小時，並且用一疊紙巾叩乾。對各待測試孔添加100 μ l IgG，並在RT下培育1小時(在20 nM下開始EC₅₀測定並進行1：3稀釋)。

【0162】 以PBST洗滌盤5次。將1：10000稀釋於PBST中的100 μ l抗-hIgG Fc-HRP (Sigma, cat#A0170)添加至各孔中。洗滌盤並添加100 μ l/孔的TMB受質且於室溫下培育5分鐘。添加100 μ l/孔的1N HCl以終止反應。在450 nm波長下以ELISA盤讀取儀(Biotek, Elx405)讀取盤。

實例2-結果

【0163】 嵌合與人化1573抗體的設計及序列分析。加上Kabat編號之可變區序列註解(在全世界bioinf.org.uk/abs/#kabatnum)CDR殘基被畫底線：

VH：

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSSNYYLNWVRQSPEKGL
EWVADIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRA
EDTGIYYCIREGDYFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 31；DNA為
SEQ ID NO: 33)

VL：

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGATFMHWYQQKPGQ
PPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQ
QNNEDPYTFGGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 32；DNA為SEQ ID NO:
34)

1573 VH標準結構：1-4-基於H1與H2標準結構，VH可以人化成VH3生殖系骨架序列的子集。1573 Vk標準結構：4-1-1-基於4-1-1 Vk CDR標準結構，Vk可以人化成VKII生殖系骨架序列的子集。

【0164】 1573 VH人化設計。生殖系BH3-72與1573 VH序列具有最佳整體同源性。其被選出作為受體人類生殖系骨架供1573 VH CDR序列移植用。hJH6將因為有最佳同源性而被用作為1573人化。所有可能回復突變列示於下。

G49A - 游標區殘基，標準殘基(影響CDR H2，計分3)，人類殘基

N76S - 標準殘基(影響CDRH1，計分3)，人類殘基

L78V - 游標區殘基，標準殘基(影響CDRH1，計分3)，人類殘基

A93I – 游標區殘基。標準殘基(影響CDR H3，計分3)，人類殘基人化1573 VH設計帶有CDR者畫底線而回復突變者雙底線：

1573 VH (SEQ ID NO: 15)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYYLNWVRQSPEKGL
EWVADIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRA
EDTGIYYCIREGDYFDYWGQGTTTLTVSS

H1573 VH.1 (SEQ ID NO: 16)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
LEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
TEDTAVYYCAREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1A (SEQ ID NO: 17)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
LEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1B (SEQ ID NO: 18)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
LEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLK
TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1C (SEQ ID NO: 19)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
LEWVADIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1D (SEQ ID NO: 20)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG

LEWVGDIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSSLYLQMNSLK
 TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1E (SEQ ID NO: 21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
 LEWVADIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKNSVYLQMNSLK
 TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

H1573 VH.1F (SEQ ID NO: 22)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYYLNWVRQAPGKG
 LEWVADIRLKSNNYEKHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNSLK
 TEDTAVYYCIREGDYFDYWGQGTTVTVSS

VH3-72 (SEQ ID NO: 23)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKG
 LEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
 TEDTAVYYCAR

VH3-72/JH6 (SEQ ID NO: 24)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDHYMDWVRQAPGKG
 LEWVGRTRNKANSYTTEYAASVKGRFTISRDDSKNSLYLQMNSLK
 TEDTAVYYCAR-----WGQGTTVTVSS

【0165】 1573 Vk人化設計。Vk生殖系A2與1573 Vk序列具有最佳整體同源性。其被選出作為受體人類生殖系骨架供1573 Vk CDR序列移植用。hJK2將因為有最佳同源性而被用作為1573人化。對於環構型與VH/VL介面重要的殘基被強調為黃色且帶有Kabat編號的CDR為紅色。

【0166】 在1573Vk人化設計中可行的回復突變：

M4L – 游標區殘基(影響 CDRL1、3，計分 3)，人類殘基

G68R – 游標區殘基

人化1573 Vk設計帶有CDR者畫底線而回復突變者畫雙底線：

1573 Vk (SEQ ID NO: 25)

NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSFGATFMH-WYQQKPG
QPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYC
QQNNEDPYTFGGGTKLEIKR

H1573Vk.2 (SEQ ID NO: 26)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDSFGATFMH-WYLQKPG
QPPQLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CQQNNEDPYTFGQGTKLEIKR

H1573Vk.2A (SEQ ID NO: 27)

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDSFGATFMH-WYLQKPG
QPPQLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CQQNNEDPYTFGQGTKLEIKR

H1573Vk.2B (SEQ ID NO: 28)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDSFGATFMH-WYLQKPG
QPPQLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CQQNNEDPYTFGQGTKLEIKR

H1573Vk.2C (SEQ ID NO: 29)

DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRASESVDSFGATFMH-WYLQKPG
QPPQLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSRTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CQQNNEDPYTFGQGTKLEIKR

A2 (SEQ ID NO: 30)

DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYWYLQKPG
QPPQLLIYEVSNNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY
CMQSIQLP

【0167】 在提議的人化構築體中，於VH及VL中均發現無N-連結糖化型態(N-{P}-S/T)。

【0168】 人化VH與VL選殖。藉由基因全新合成法建構所有人化VH及VL並將它們選殖至293表現載體pCp中。關於人化抗體的構築體歸納於表2中。

表2-1573人化的構築體歸納

VH (VH3-72) + JH6/FW4	構築體狀態	VL (A2) + JK2/FW4	構築體狀態
H1573VH.1	✓	H1573Vk.2	✓
H1573VH.1A	✓	H1573Vk.2A	✓
H1573VH.1B	✓	H1573Vk.2B	✓
H1573VH.1C	✓	H1573Vk.2C	✓
H1573VH.1D	✓	1573Vk (嵌合)	✓
H1573VH.1E	✓		
H1573VH.1F	✓		
1573VH (嵌合)	✓		

【0169】 嵌合體與人化1573抗體的表現及純化。表3中歸納了293轉染設計。條件培養基(方法3.3)在第6天被加載至1 ml蛋白A管柱。收集、純化重組1573抗體。嵌合與人化1573 IgG蛋白全部顯示良好的表現位準。



表3-HEK293共轉染設計

VH VK	H1573VH.1	H1573VH.1A	H1573VH.1B	H1573VH.1C	H1573VH.1D	H1573VH.1E	H1573VH.1F	嵌合
H1573Vk.2			Hu1573-3	Hu1573-6	Hu1573-9	Hu1573-12	Hu1573-15	
H1573Vk.2A			Hu1573-4	Hu1573-7	Hu1573-10	Hu1573-13	Hu1573-16	
H1573Vk.2B			Hu1573-5	Hu1573-8	Hu1573-11	Hu1573-14	Hu1573-17	
H1573Vk.2C	Hu1573-1	Hu1573-2						
嵌合 Chimeric								

【0170】 經純化嵌合及人化1573抗體的SEC特徵鑑定。為了評估經純化嵌合1573與人化抗體的純度及聚集百分率，將樣品分別加載至SEC上(圖1)。所有CP生成的抗體以PBS pH 7.0緩衝液在約5.75分時溶離出單一明顯峰。溶離時間非常接近於蛋白質標記的其中一者(158 kDa，溶離時間為5.85分)，暗示它們多數顯示超過90%為單體，兩種抗體顯示超過80%單體。

【0171】 1573結合至人化抗體的Biacore分析。使用胺偶合法，將aPC直接固定在新CM5晶片上。在過夜平衡後，將100 nM 1573抗體注射通過表面並偵測到強烈訊號。因此，使用這個晶片進行親和力測定。各個抗體以30 µl/min被注射通過晶片表面歷時180 s 締合期與300 s解離期。

表4-依據表面電漿共振，1573抗體與抗原hAPC、馬來猴APC間交互作用的動力學參數(使用1：1結合模型的數據擬合)

抗體代碼	結合至人類)APC			結合至馬來猴 APC		
	ka (1/Ms)	kd(1/s)	整體親和力 KD (M)	ka (1/Ms)	kd(1/s)	整體親和力 KD (M)
1573 嵌合	2.32E+06	0.008112	3.49E-09	5.55E+05	0.007664	1.38E-08
1573 小鼠	9.48E+05	0.005199	5.49E-09	3.44E+05	0.007254	2.11E-08
Hu 1573-1	1.46E+06	0.005538	3.80E-09	2.40E+05	0.004016	1.67E-08
Hu 1573-2	1.35E+06	0.00624	4.61E-09	2.35E+05	0.003843	1.64E-08
Hu 1573-3	1.44E+06	0.008182	5.70E-09	7.43E+05	0.01053	1.42E-08
Hu 1573-4	1.52E+06	0.007723	5.10E-09	7.43E+05	0.01053	1.42E-08
Hu 1573-5	1.54E+06	0.006397	4.16E-09	2.02E+05	0.002926	1.45E-08
Hu 1573-6	1.43E+06	0.008477	5.94E-09	6.27E+05	0.007074	1.13E-08
Hu 1573-7	1.36E+06	0.008574	6.33E-09	2.55E+05	0.004707	1.85E-08
Hu 1573-8	1.49E+06	0.005995	4.03E-09	3.63E+05	0.004466	1.23E-08
Hu 1573-9	1.45E+06	0.008152	5.63E-09	4.75E+05	0.007239	1.52E-08
Hu 1573-10	1.45E+06	0.006364	4.38E-09	4.34E+05	0.004786	1.10E-08
Hu 1573-11	1.38E+06	0.008958	6.49E-09	2.69E+05	0.004199	1.56E-08
Hu 1573-12	1.40E+06	0.008443	6.03E-09	3.37E+05	0.005404	1.61E-08
Hu 1573-13	1.40E+06	0.006553	4.69E-09	2.29E+05	0.00343	1.50E-08
Hu 1573-14	1.40E+06	0.008559	6.13E-09	2.99E+05	0.005241	1.76E-08
Hu 1573-15	1.37E+06	0.008448	6.15E-09	2.25E+05	0.004524	2.02E-08
Hu 1573-16	1.42E+06	0.006434	4.52E-09	2.36E+05	0.003725	1.58E-08
Hu 1573-17	1.45E+06	0.008329	5.75E-09	2.69E+05	0.004199	1.56E-08



【0172】 經純化抗體的結合ELISA。關於做為陰性對照的人類PC及猴PC，人化抗體在不同濃度下顯示非常微弱的反應。它們不結合至人類PC與猴PC抗原。結果顯示於圖5與圖6中。關於人類aPC及猴aPC，所有人化抗體顯示良好的結合親和力，確認Biacore分析(表4)。使用人化抗體的稀釋曲線，發明人也計算出各個抗體的EC₅₀，其顯示於表5中。

【0173】 嵌合與人化1573被選殖至CP表現載體中並在CP中生成。aPC與抗體(包括嵌合與人化)之間的交互作用被Biacore分析特徵鑑定為快速締合與快速解離。此外，所有人化1573變異體滿足親和力要件。Hu1573-1、2、5、8、10可能是不錯的候選物，因為它們有高於5 nM的親和力以及只帶有2-3個回復突變。

表5-1573人化抗體的EC₅₀

人化 Ab	馬來猴-APC EC50 (nM)	馬來猴-PC EC50 (nM)	人類-APC EC50 (nM)	人類-PC EC50 (nM)
1573 嵌合	0.8302	無結合	0.3337	無結合
Hu1573-1	0.8847	無結合	0.3093	無結合
Hu1573-2	0.7745	無結合	0.2652	無結合
Hu1573-3	0.8723	無結合	0.5915	無結合
Hu1573-4	0.9041	無結合	0.5834	無結合
Hu1573-5	1.0950	無結合	0.5520	無結合
Hu1573-6	0.8995	無結合	0.2741	無結合
Hu1573-7	0.8525	無結合	0.4446	無結合
Hu1573-8	0.7129	無結合	0.6972	無結合
Hu1573-9	0.9857	無結合	0.3134	無結合
Hu1573-10	0.6890	無結合	0.5752	無結合
Hu1573-11	1.466	無結合	0.6858	無結合
Hu1573-12	0.6418	無結合	0.3394	無結合
Hu1573-13	0.8045	無結合	0.2356	無結合
Hu1573-14	0.9838	無結合	0.2247	無結合
Hu1573-15	0.8691	無結合	0.2880	無結合
Hu1573-16	1.2290	無結合	0.2328	無結合
Hu1573-17	1.2100	無結合	0.6267	無結合

【0174】 本文揭示與主張的所有組合物及/或方法可以依據本揭示內容在無須過度實驗的情況下做出並執行。儘管已就特定具體例說明組成物及方法，對於習於技藝者來說在不偏離本揭示內容概念、精神與範疇的情況下對本文所述組成物及/或方法以及方法步驟或步驟順序實施變化是清楚的。更具體而言，某些化學上與生理學上相關的試劑可取代本文所述試劑同時達到相同或類似結果將會是清楚的。所有這些對於習於技藝者來說清楚的類似取代和修飾被視為落在如隨附申請專利範圍定義的精神、範疇與概念內。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

<110> ZHAO, Xiao-Yan
WANG, Zhuozhi
KIM, Ji-Yun
ZHU, Ying
TEBBE, Jan

<120> 抗活化蛋白C之人化單株抗體及其用途

<130> BAYR.P0002US.P1

<160> 34

<170> PatentIn第3.5版

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 1

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe Gly Ala Thr Phe Met His
1 5 10 15

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 2

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 3

Gln Gln Asn Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 4

Asn Tyr Tyr Leu Asn
1 5

<210> 5

<211> 19

<212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 5

Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu Ser
 1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6

<400> 6
 000

<210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 7

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
 20

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> Syntehtic peptide

<400> 8

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 9
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 9

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 10

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 11

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

Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 12

Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 13

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 13

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys Ile Arg
20 25 30

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 14

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

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

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

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

Ala Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 16

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

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

Gly Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 17

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

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

Gly Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18

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

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

Gly Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 19

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

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

Ala Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 20

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

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

Gly Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 21

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

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

Ala Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 22

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

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

Ala Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 23
<211> 100
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

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 Asp His
20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg
100

<210> 24
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 24

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 Asp His
20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 25
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 25

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Phe
20 25 30

Gly Ala Thr Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60

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

Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn
85 90 95

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

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 26

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Pro
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ile Gln Leu Pro
100

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 31

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

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

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

Ala Asp Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Glu Lys His Tyr Ala Glu
50 55 60

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

Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ile Arg Glu Gly Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 32

Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

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

<210> 33
 <211> 657
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 33
 tacattgttc tgaccagag tccggcaagc ctggcagtga gtctgggtca gcgtgcaacg 60
 atcagctgcc gtgcattcga aagtgtgat agctttgggt caaccttcat gcattggtat 120
 cagcagaaac cgggccagcc gccgaaactg ctgatttacc tggcgtctaa tctggaaagt 180
 ggtgtgccgg cccgttttag cggttctggc agtcgcaccg atttcaccct gacgatcgat 240
 ccggttgaag ccgatgatgc ggccacctat tactgccagc agaacaatga agatccgtat 300
 acgtttggcg gtggcaccaa actggaaatt aaacgtgcag atgcagcacc gaccgtgagc 360
 atcttcccgc cgagctctga acagctgacc agcgggtggcg cgtctgtggt ttgttttctg 420
 aacaacttct acccgaaaga tatcaacgtg aaatggaaaa tcgatgggtc tgaacgccag 480
 aacggcggtc tgaatagttg gacggatcag gattctaaag atagtaccta cagcatgagt 540
 agcaccttga cgctgaccaa agatgaatat gaacgtcata atagctacac gtgcgaagcg 600
 acccacaaaa cgagcacctc tccgattgtt aaatctttca accgcaatga atgttaa 657

<210> 34
 <211> 660
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 34
 gaagttaaac tggaagaaag cggcgggtggc ctgggtgcagc cgggtggcag catgaaactg 60
 tcttgcgttg caagtggttt taccttctct aactattacc tgaattgggt gcgtcagagt 120
 ccggaaaaag gcctggaatg ggttcagat attcgctga aaagcaacaa ctacgaaaaa 180
 cattacgagg aatctgtgaa aggtcgtttt accatcagcc gcgatgattc taaaagctct 240
 gigtatctgc agatgaacaa tctgcgtgcg gaagatacgg gtatttatta ctgcatccgc 300
 gaaggcgatt atttcgatta ctgggggtcag ggcaccacgc tgaccgtgag ctcagcgaaa 360
 accacgccgc cgagcgttta tccgctggca ccgggtagtg cagcacagac caacagcatg 420

gigacgctgg gttgtctggt taaaggctac tticcgggaac cggtgaccgt tacgtggaat	480
tctggtagtc tgtctagtagg cgtgcatacc ttcccggcgg ttctgcagag tgatctgtat	540
acgctgtcta gcagtgtagc cgttccgagc tctacgtggc cgtctgaaac cgtgacgtgc	600
aacgttgccc acccggcaag tagcaccaaa gtggataaga aaattgttcc gcgtgattgt	660

申請專利範圍

1. 一種抗體，其包含：
 - (a)包含由SEQ ID NO：1、2及3表示之重鏈CDR的重鏈；以及
 - (b)包含由SEQ ID NO：4、5及6表示之輕鏈CDR的輕鏈。
2. 如申請專利範圍第1項之抗體，其中該重鏈骨架區由SEQ ID NO：7、8、9及10表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。
3. 如申請專利範圍第1或2項之抗體，其中該輕鏈骨架區由SEQ ID NO：11、12、13及14表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。
4. 如申請專利範圍第2項之抗體，其中SEQ ID NO：8的殘基14被Ala置換。
5. 如申請專利範圍第2項之抗體，其中SEQ ID NO：9的殘基11、13與31被絲胺酸(殘基11)、纈胺酸(殘基13)與異白胺酸(殘基31)的一或多者置換。
6. 如申請專利範圍第1項之抗體，其中該重鏈包含SEQ ID NO：16-24。
7. 如申請專利範圍第3項之抗體，其中SEQ ID NO：11的殘基4被白胺酸置換。
8. 如申請專利範圍第3項之抗體，其中SEQ ID NO：13的殘基12被精胺酸置換。
9. 如申請專利範圍第1項之抗體，其中該輕鏈包含SEQ ID NO：26-30。
10. 如申請專利範圍第1項之抗體，其中該抗體為單鏈抗體。
11. 如申請專利範圍第1項之抗體，其中該抗體為抗體片段。

12. 如申請專利範圍第9項之抗體，其中該抗體片段進一步定義為 Fab'、Fab、F(ab')₂、單域抗體、Fv或scFv。
13. 一種細胞或細胞株，其包含編碼含有下列之抗體的核酸：
 - (a) 包含由SEQ ID NO：1、2及3表示之重鏈CDR的重鏈；以及
 - (b) 包含由SEQ ID NO：4、5及6表示之輕鏈CDR的輕鏈。
14. 如申請專利範圍第13項之細胞或細胞株，其中該重鏈骨架區由SEQ ID NO：7、8、9及10表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。
15. 如申請專利範圍第13或14項之細胞或細胞株，其中該輕鏈骨架區由SEQ ID NO：11、12、13及14表示，或具有5個或更少個保守性胺基酸置換。
16. 如申請專利範圍第14項之細胞或細胞株，其中SEQ ID NO：8的殘基14被Ala置換。
17. 如申請專利範圍第14項之細胞或細胞株，其中SEQ ID NO：9的殘基11、13與31被絲胺酸(殘基11)、纈胺酸(殘基13)與異白胺酸(殘基31)的一或多者置換。
18. 如申請專利範圍第13項之細胞或細胞株，其中該重鏈包含SEQ ID NO：16-24。
19. 如申請專利範圍第15項之細胞或細胞株，其中SEQ ID NO：11的殘基4被白胺酸置換。
20. 如申請專利範圍第15項之細胞或細胞株，其中SEQ ID NO：13的殘基12被精胺酸置換。
21. 如申請專利範圍第13項之細胞或細胞株，其中該輕鏈包含SEQ ID NO：26-30。

- 22.如申請專利範圍第13項之細胞或細胞株，其中該抗體為單鏈抗體。
- 23.如申請專利範圍第13項之細胞或細胞株，其中該抗體為抗體片段。
- 24.如申請專利範圍第23項之細胞或細胞株，其中該抗體片段進一步定義為Fab'、Fab、F(ab')₂、單域抗體、Fv或scFv。
- 25.一種醫藥組成物，其包含分散於醫藥可接受載劑中之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 26.一種在個體中抑制活化蛋白C抗凝血活性的方法，其包含對該個體投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 27.一種在個體中抑制活化蛋白C醯胺分解活性的方法，其包含對該個體投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 28.一種治療有需要凝血之個體的方法，其包含對該個體投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 29.一種治療罹患敗血症之個體的方法，其包含投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 30.如申請專利範圍第29項之方法，其進一步包含投與活化蛋白C。
- 31.一種治療罹患血友病之個體的方法，其包含投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 32.一種在個體中調節止血作用的方法，其包含投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 33.如申請專利範圍第32項之方法，其中該個體為創傷患者。
- 34.一種在個體中調節血栓形成(thrombosis)的方法，其包含投與有效量之如申請專利範圍第1-12項的抗體。

- 35.一種套組，其包含如申請專利範圍第1-12項的抗體。
- 36.如申請專利範圍第35項之套組，其中該抗體被標記。
- 37.如申請專利範圍第36項之套組，其中該標記為螢光團、放射性標記、化學發光標記、染料、量子點、珠粒或發色團。
- 38.如申請專利範圍第36項之套組，其進一步包含緩衝液或稀釋液。
- 39.如申請專利範圍第36項之套組，其進一步包含使用該抗體的使用說明。
- 40.如申請專利範圍第36項之套組，其中該抗體存在於水性懸服液中。

圖式

1/22

圖 1

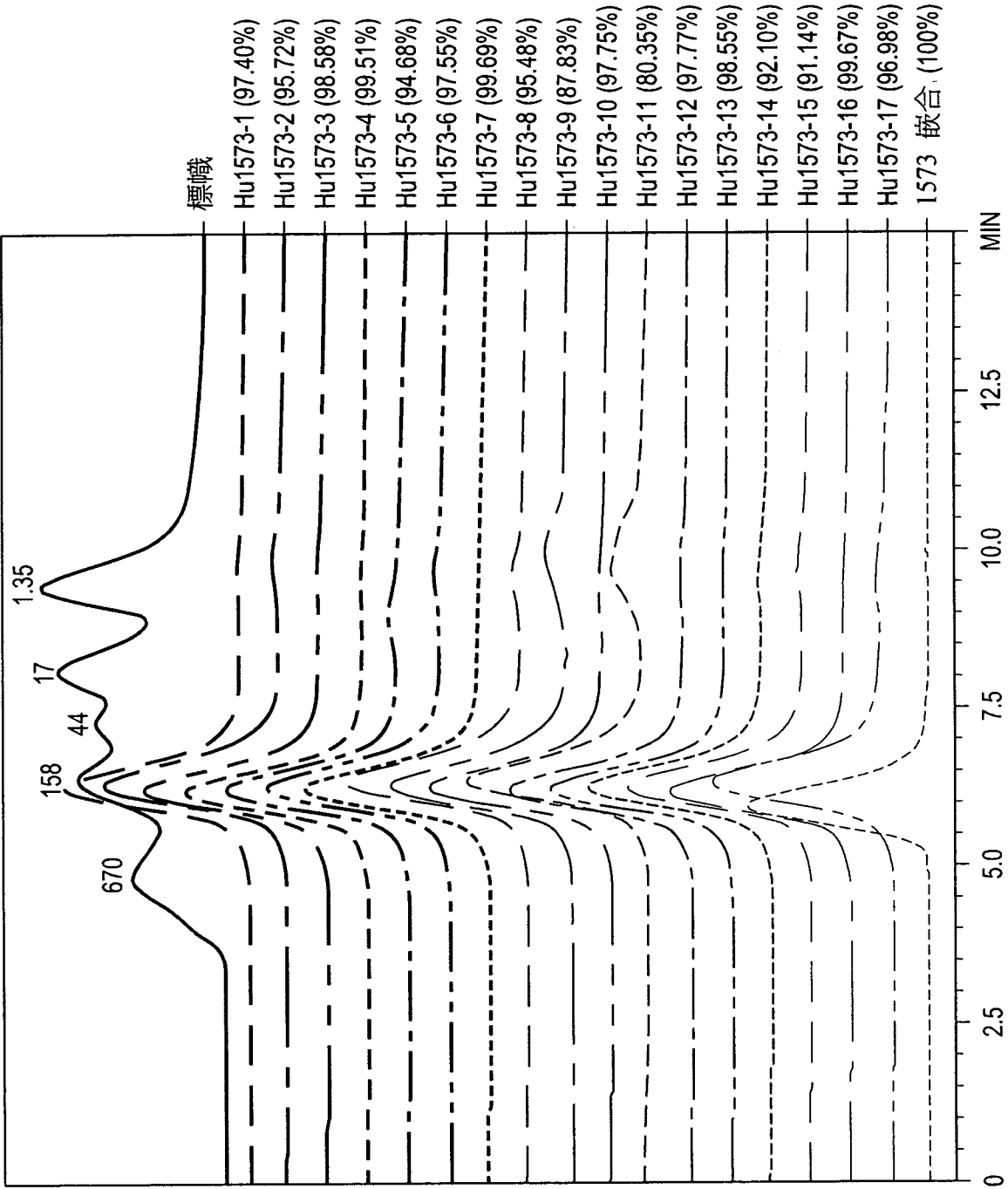
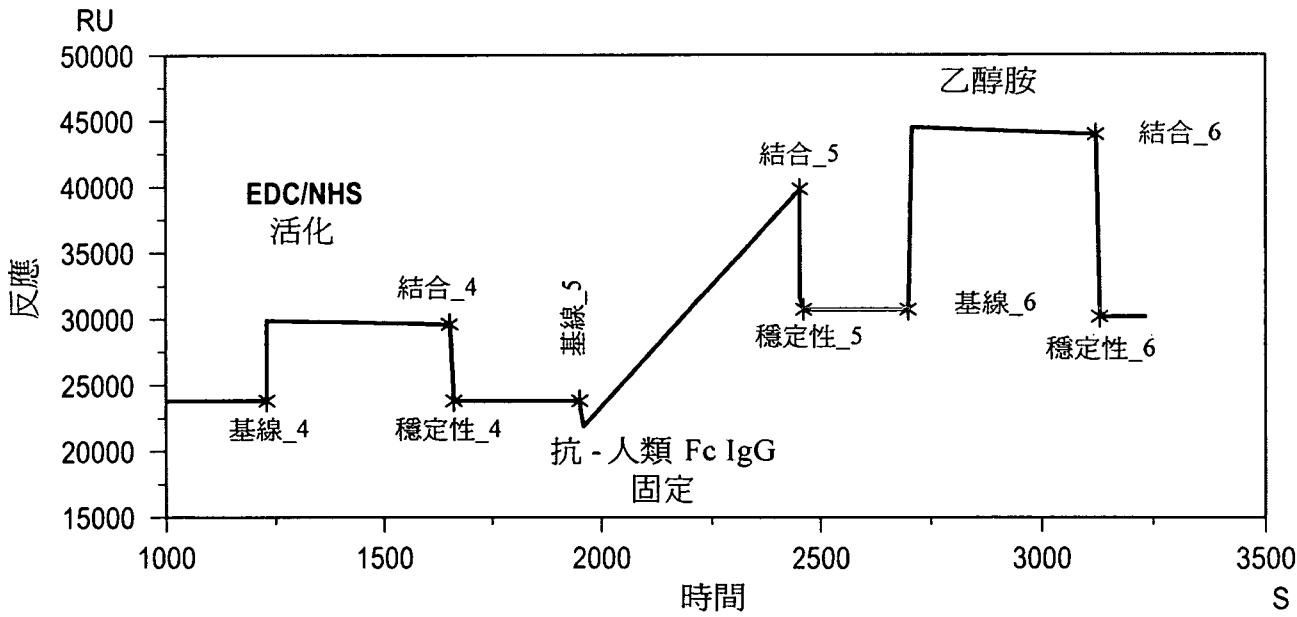
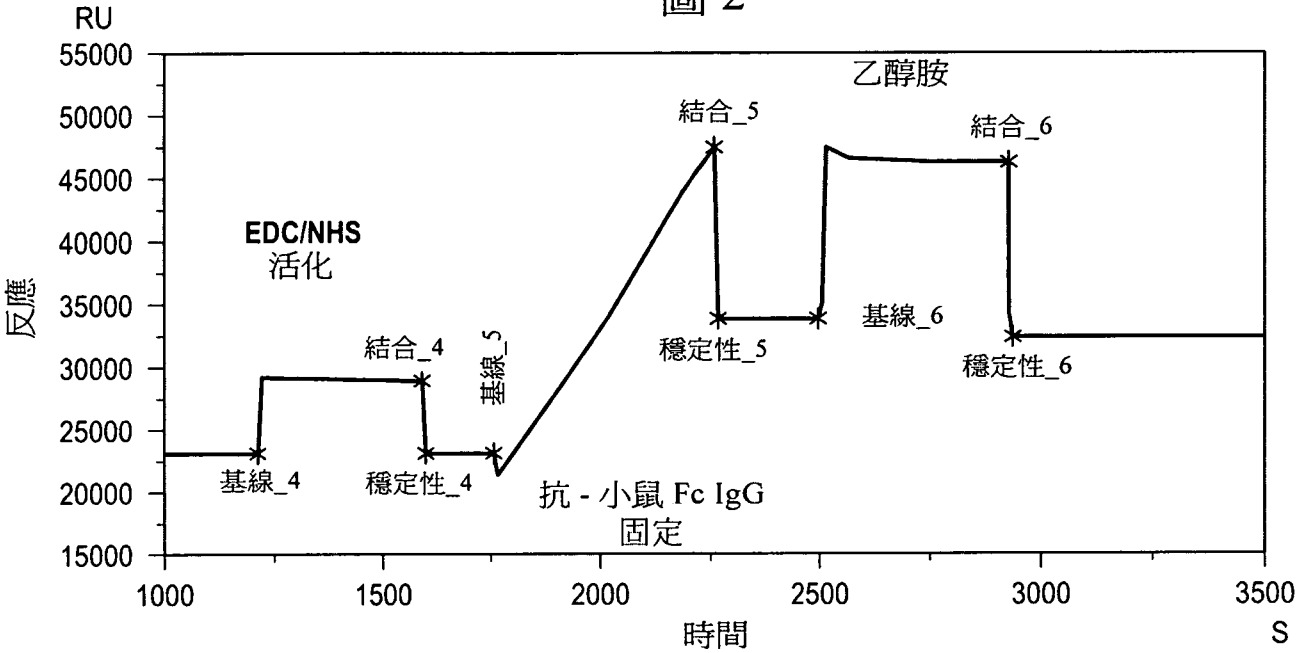
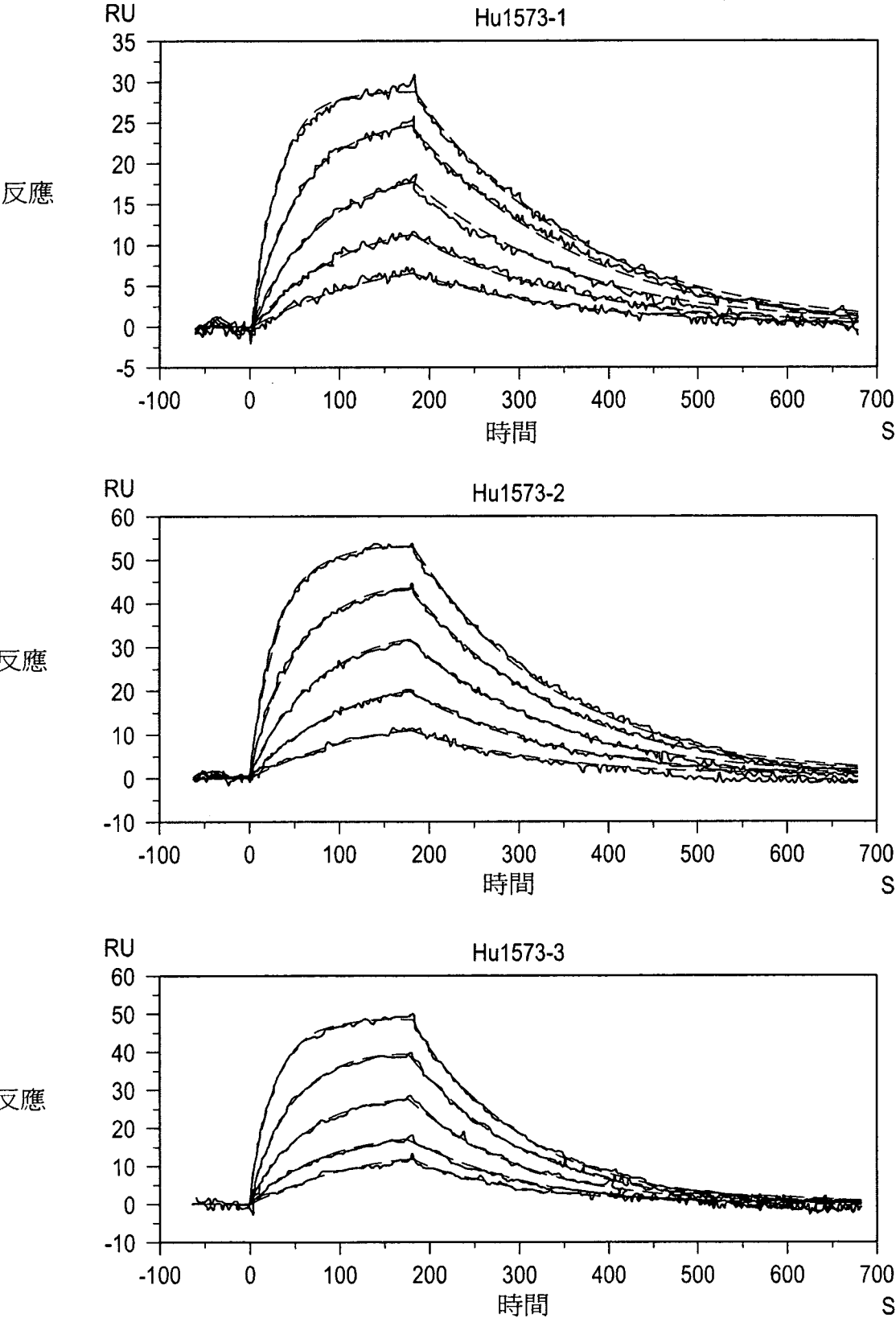


圖 2



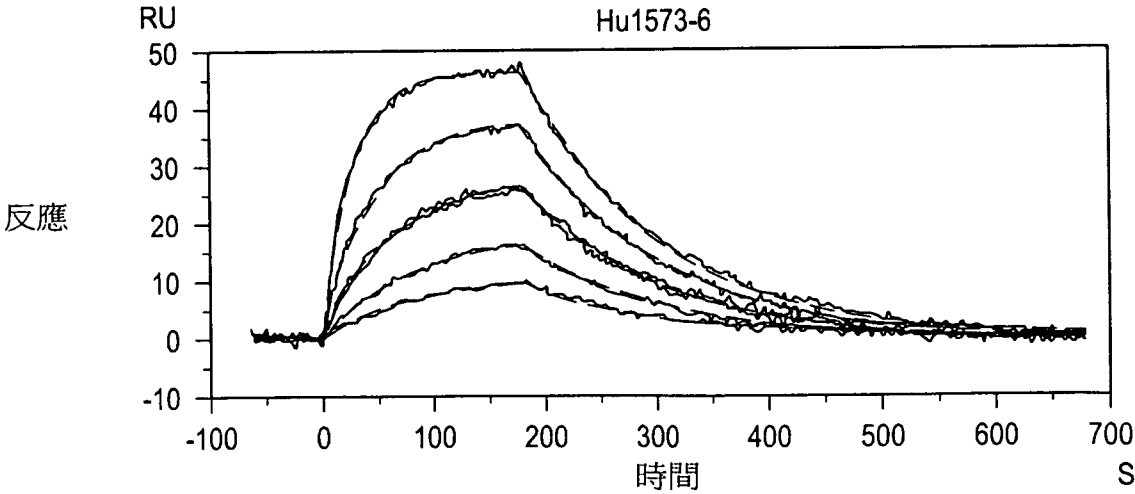
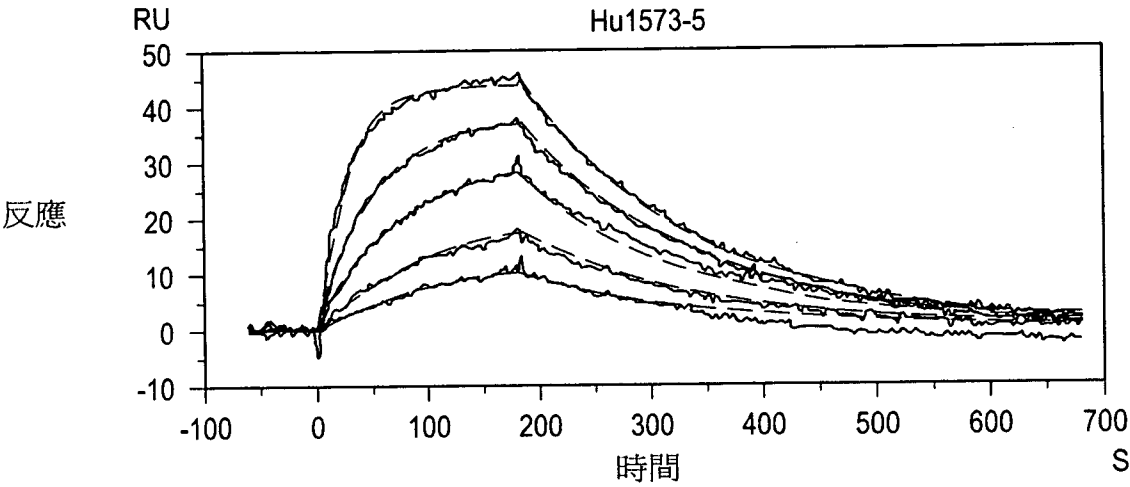
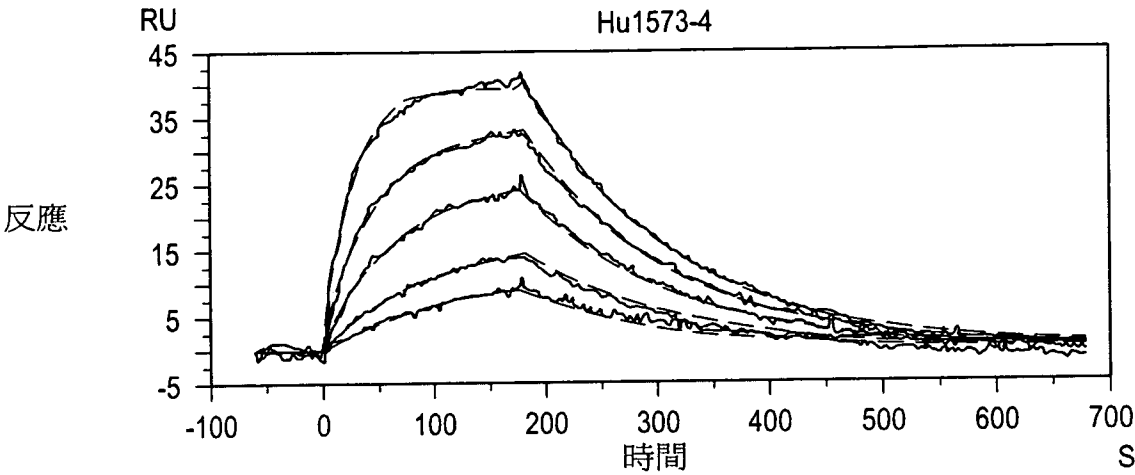
3/22

圖 3



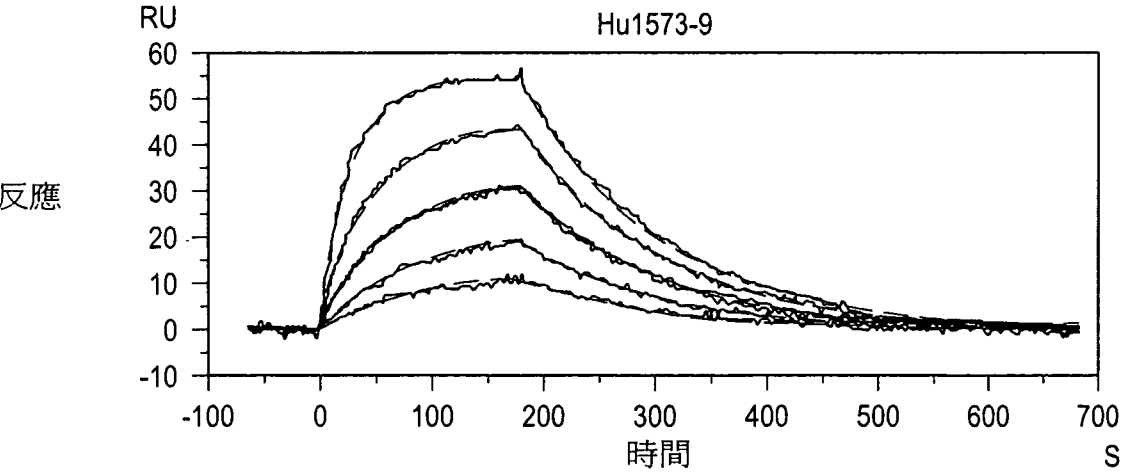
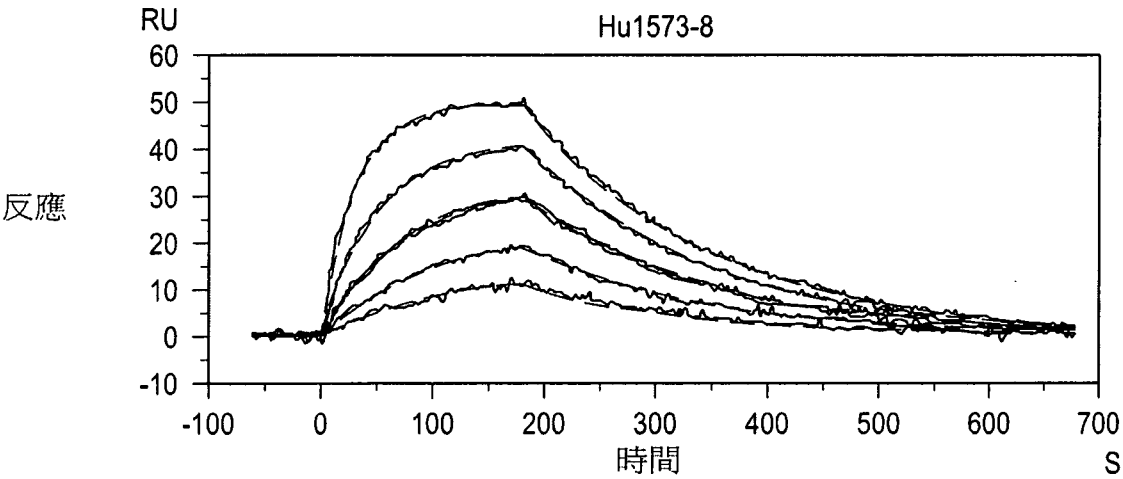
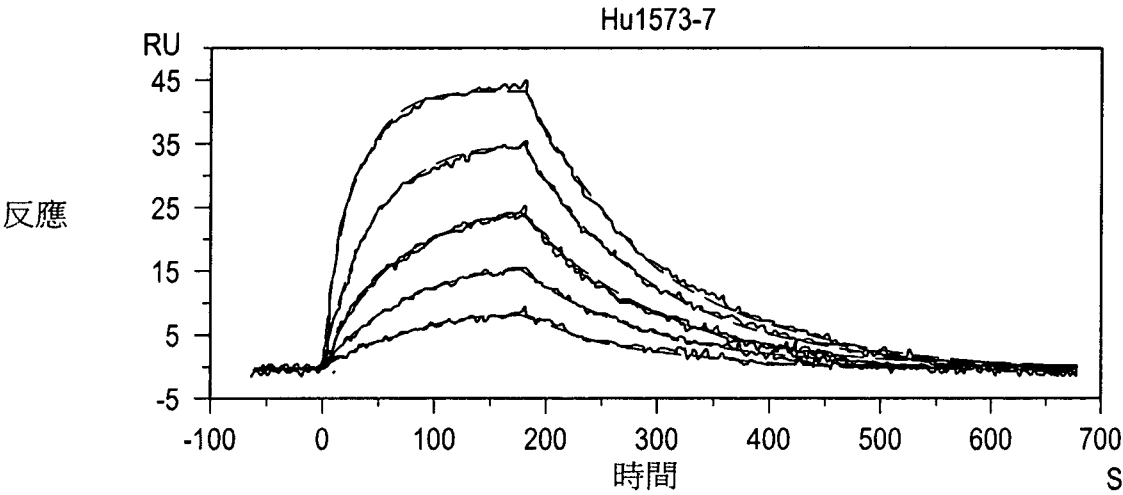
4/22

圖 3, 續



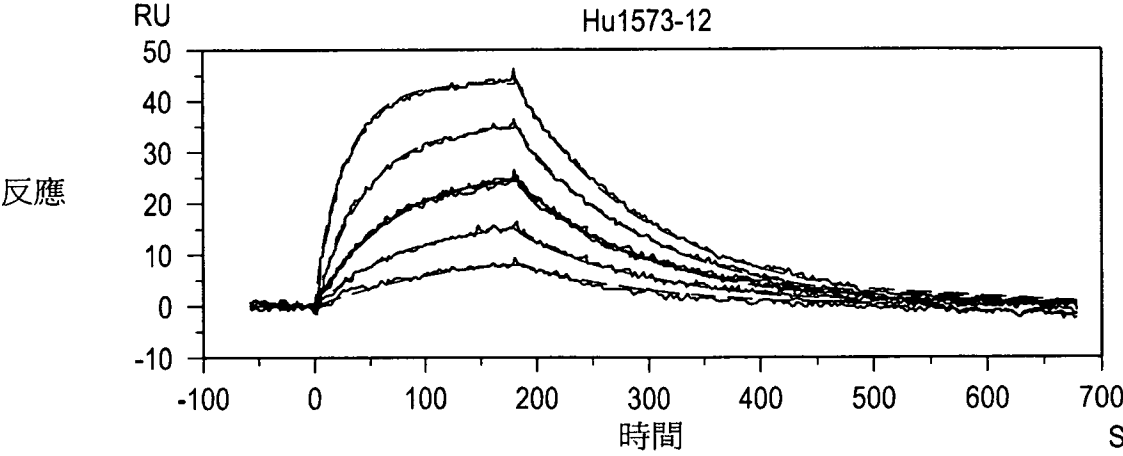
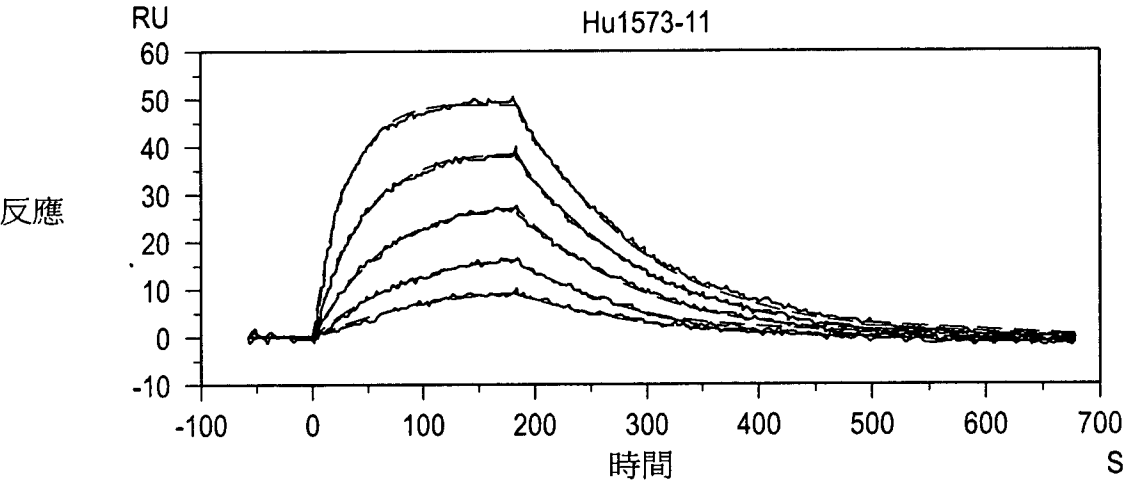
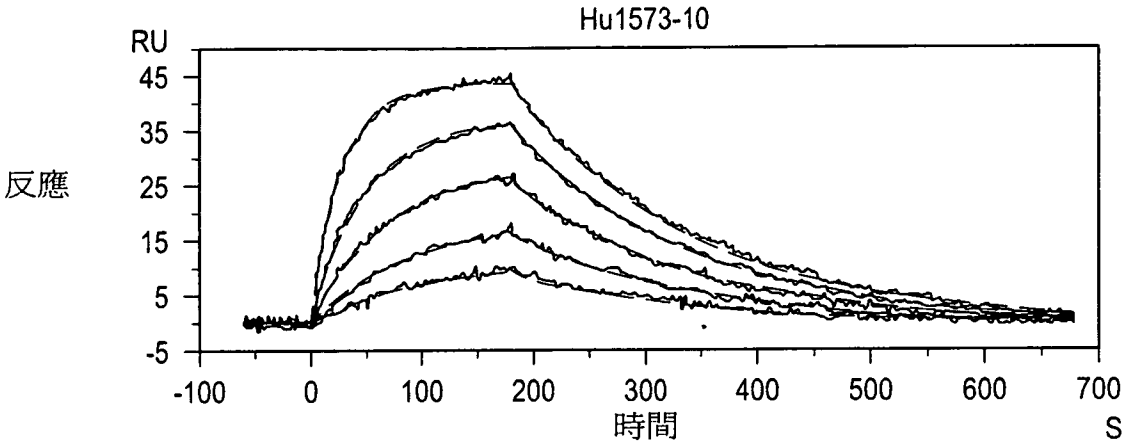
5/22

圖 3, 續



6/22

圖 3, 續



7/22

圖 3, 續

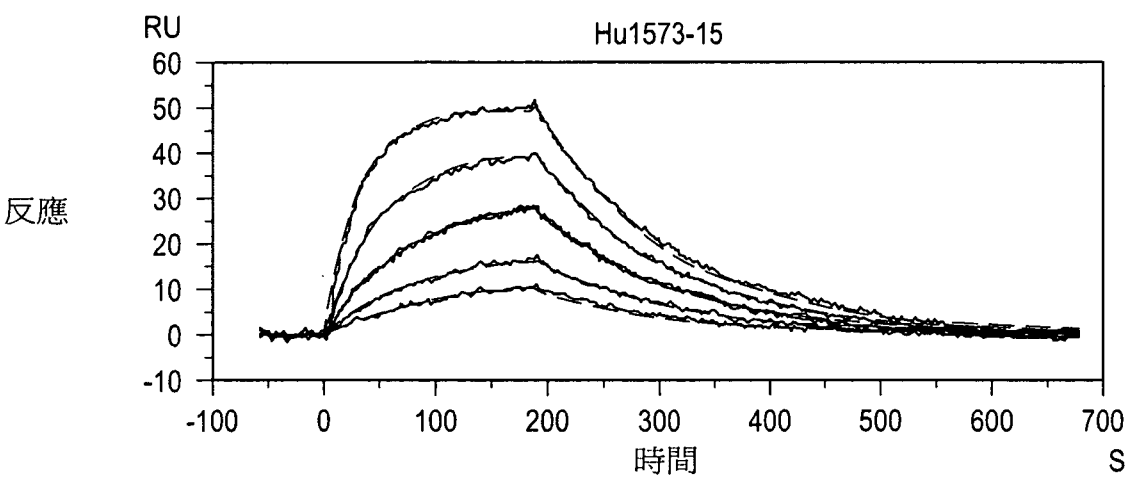
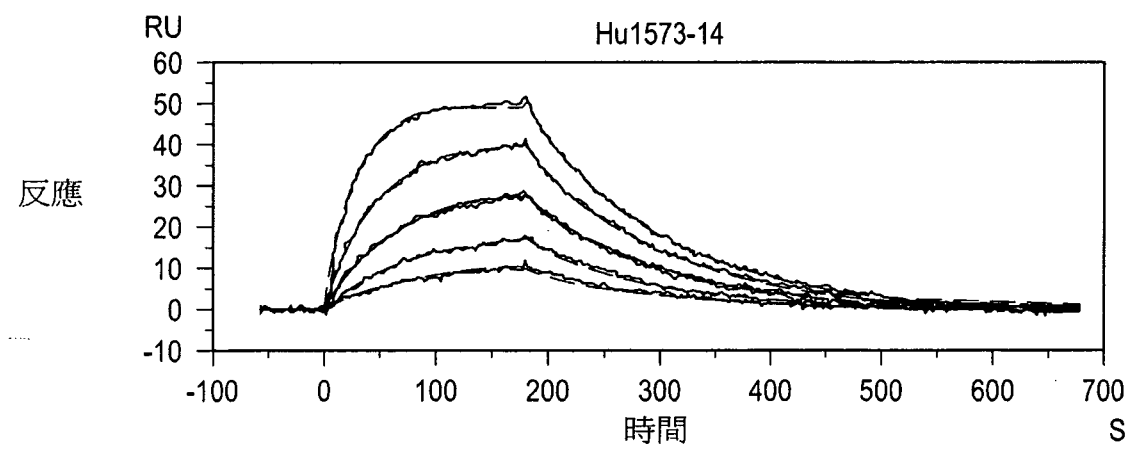
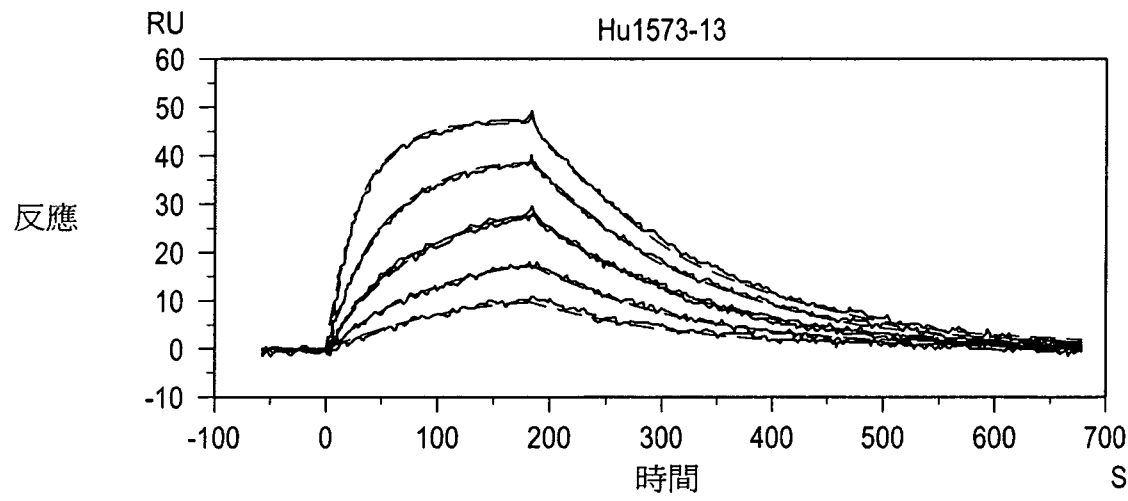
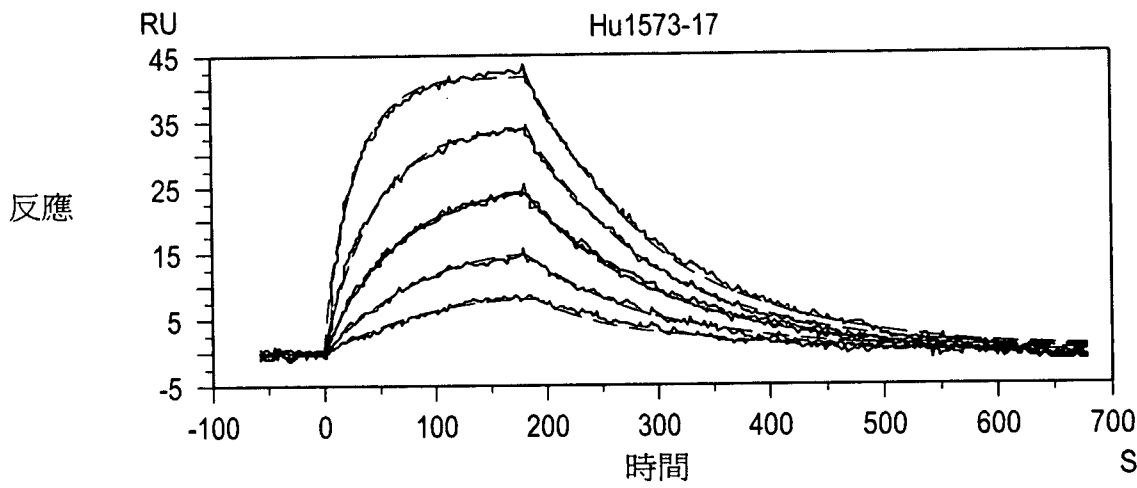
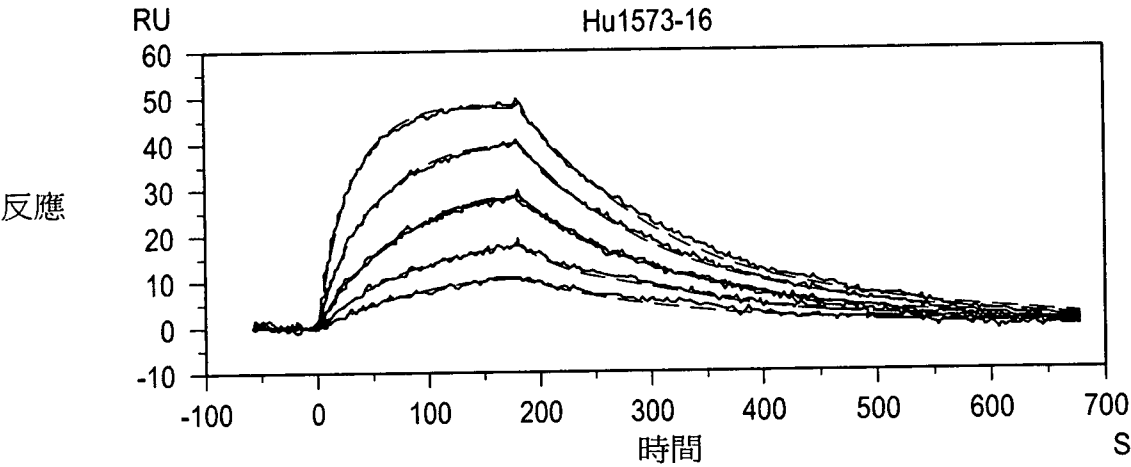


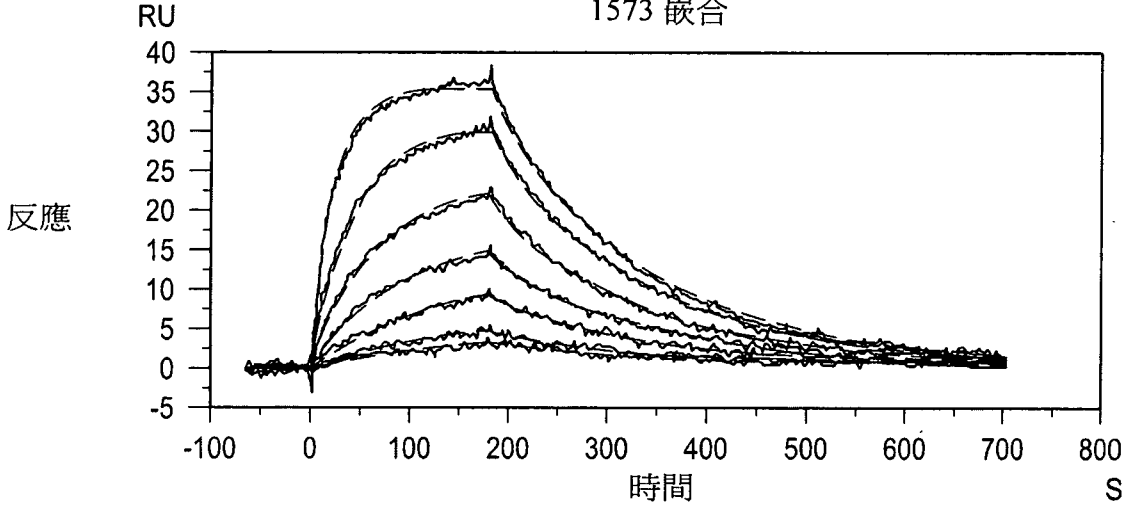
圖 3, 續



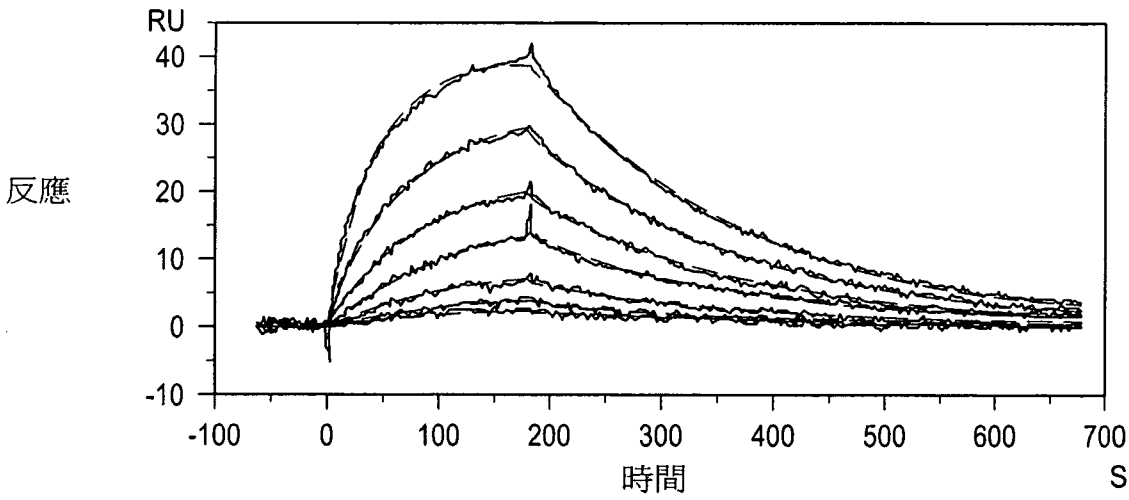
9/22

圖 3, 續

1573 嵌合

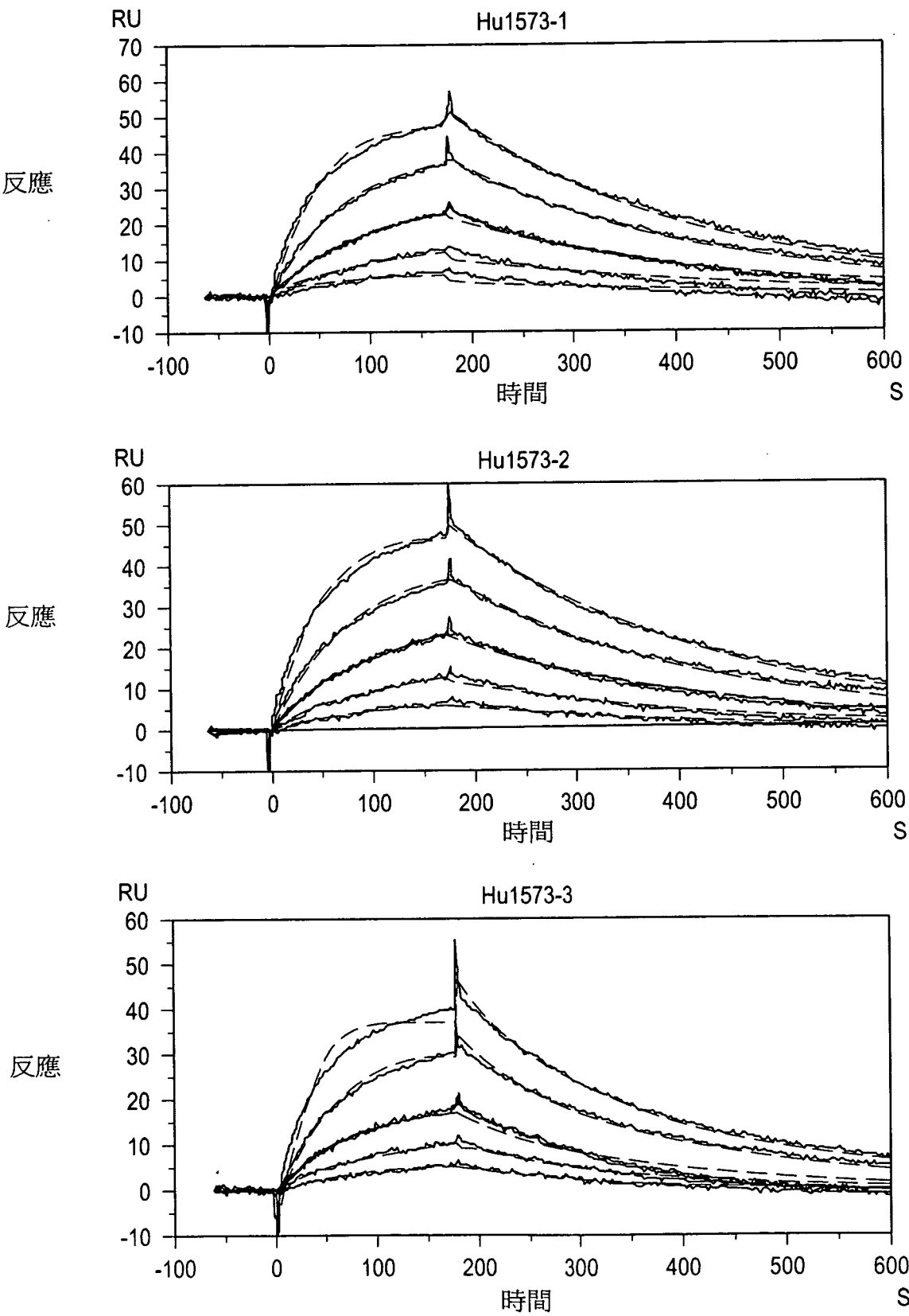


1573 小鼠

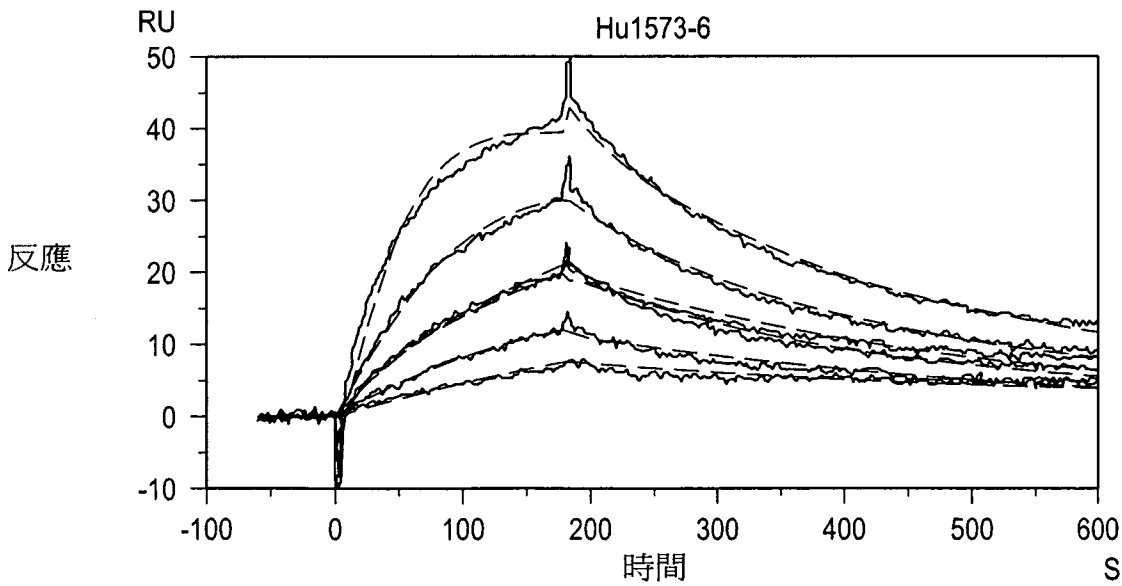
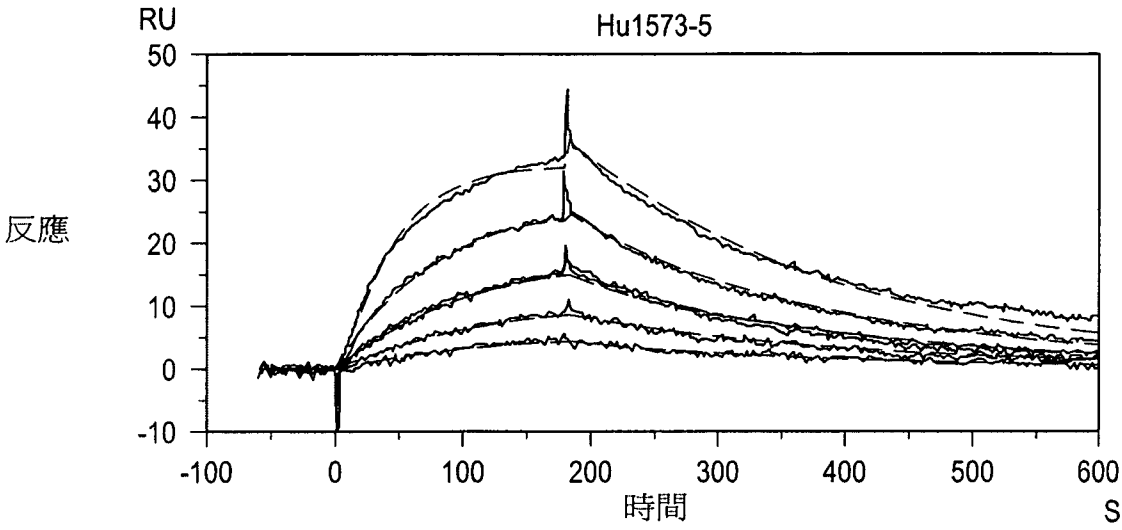
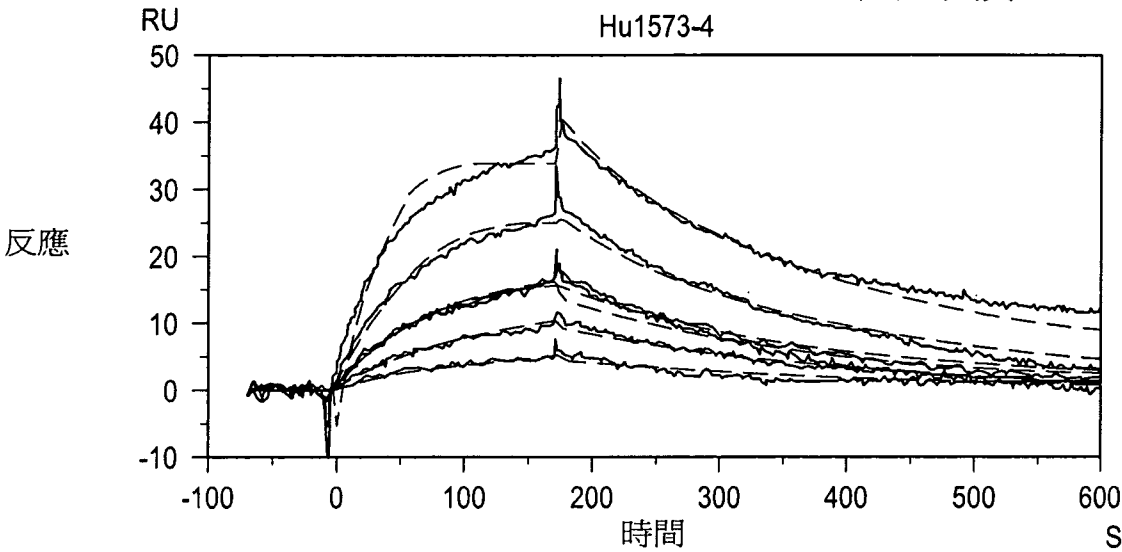


10/22

圖 4

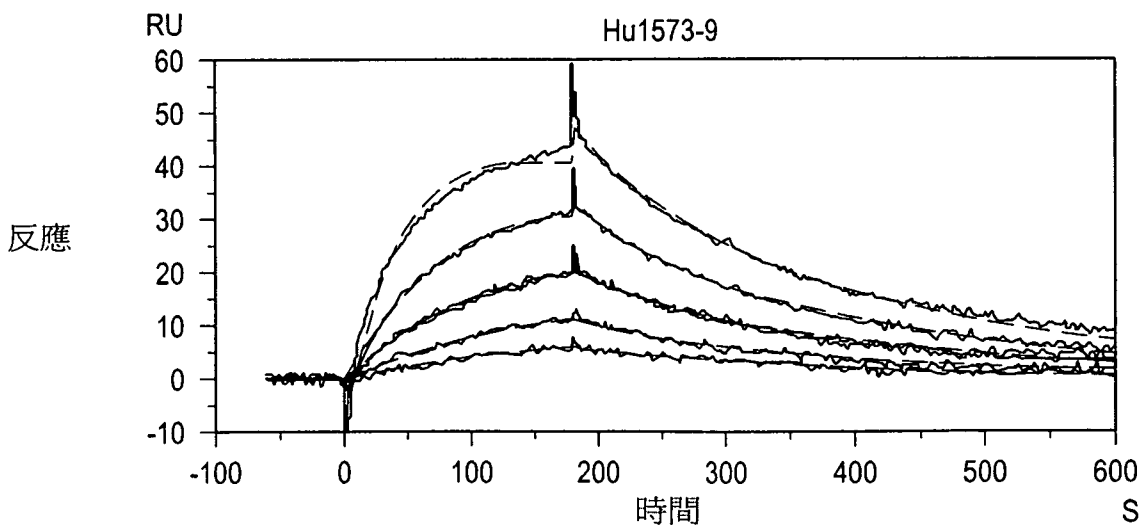
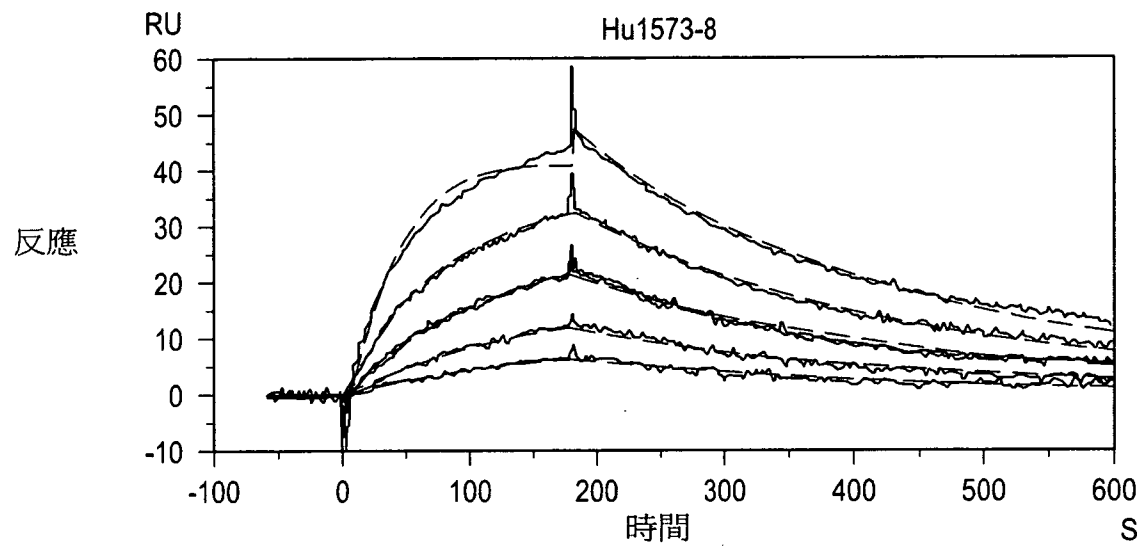
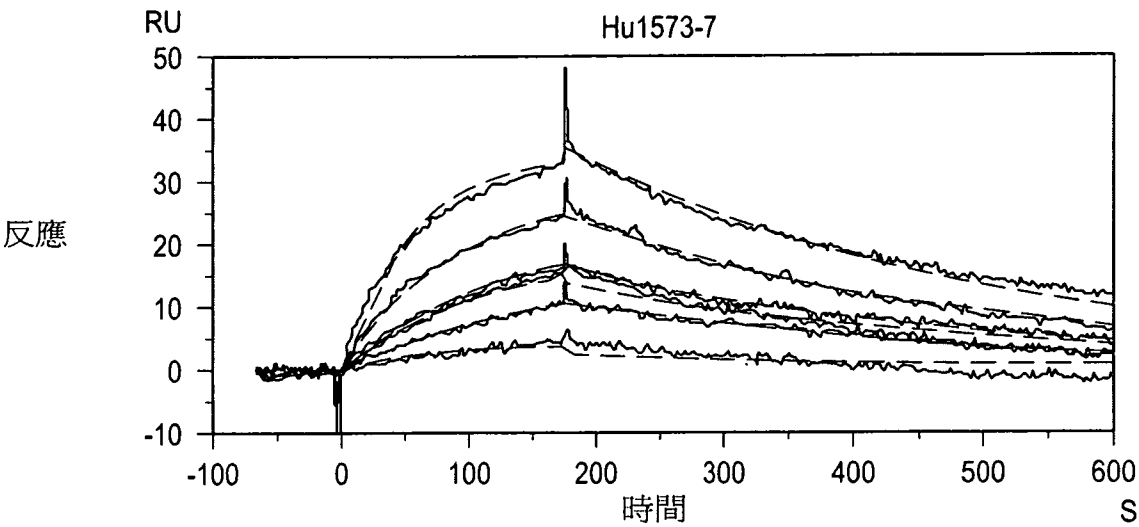


11/22 圖 4, 續



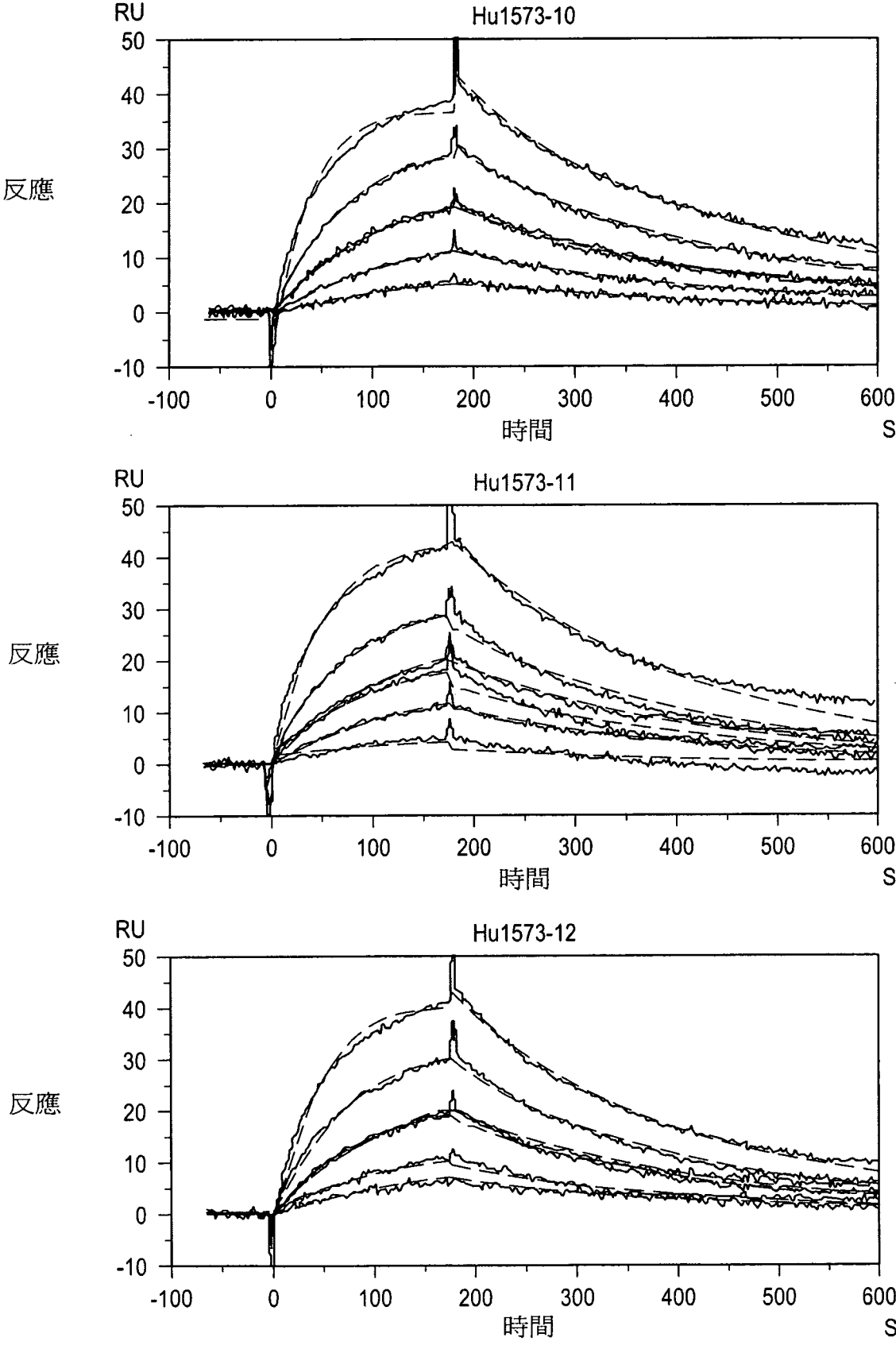
12/22

圖 4, 續



13/22

圖 4, 續



14/22

圖 4, 續

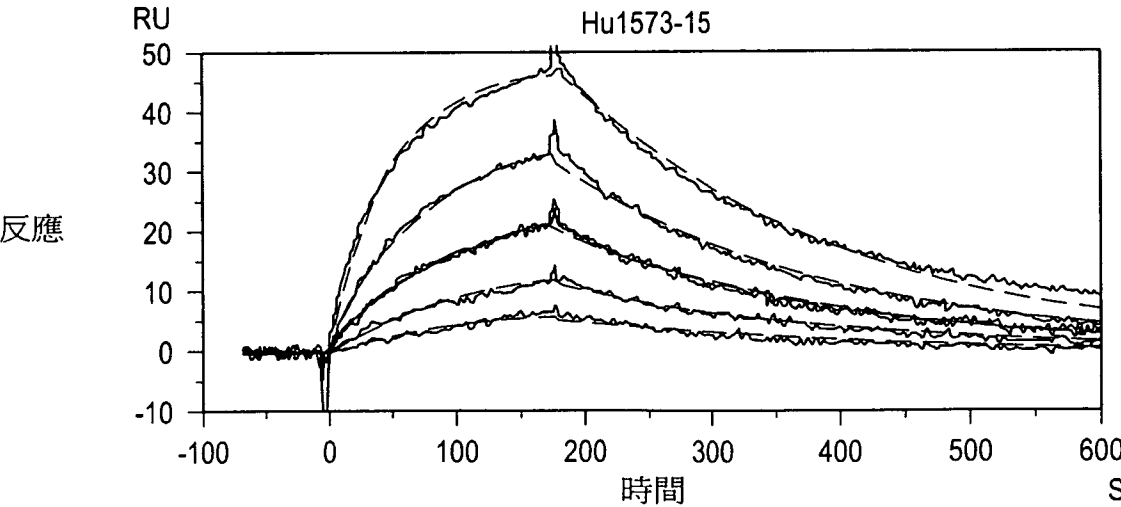
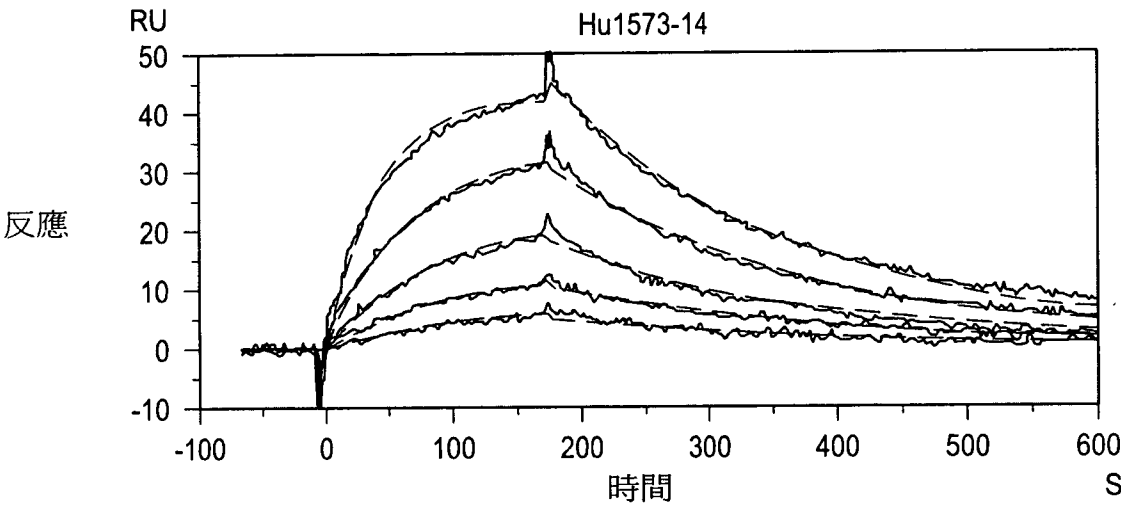
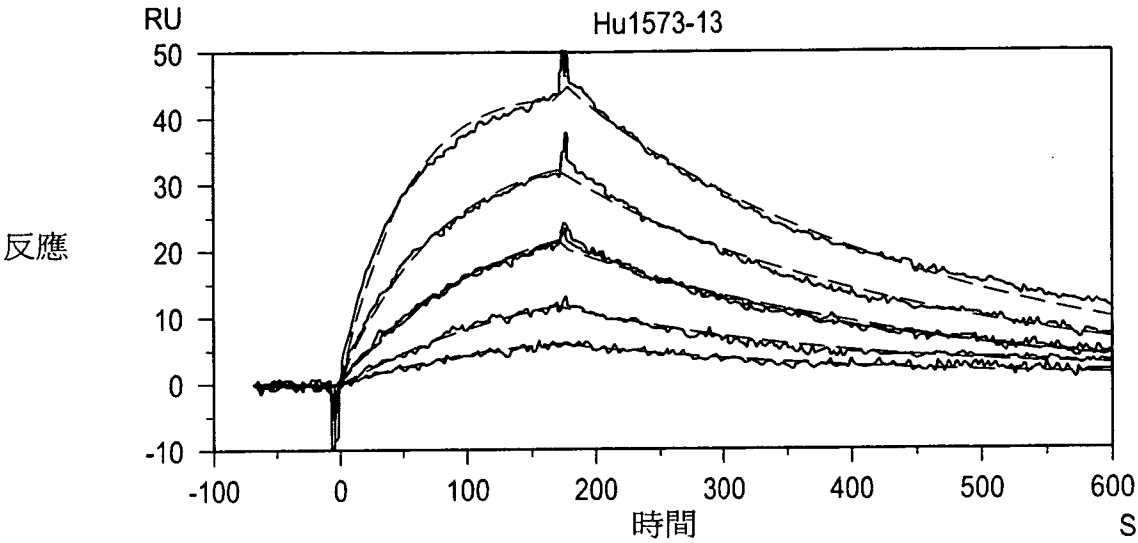


圖 4, 續

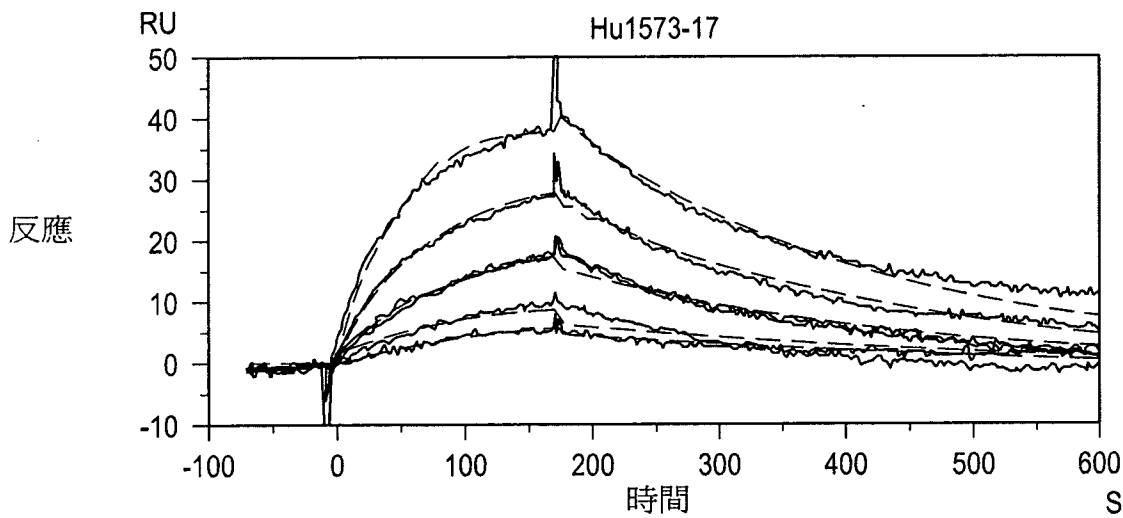
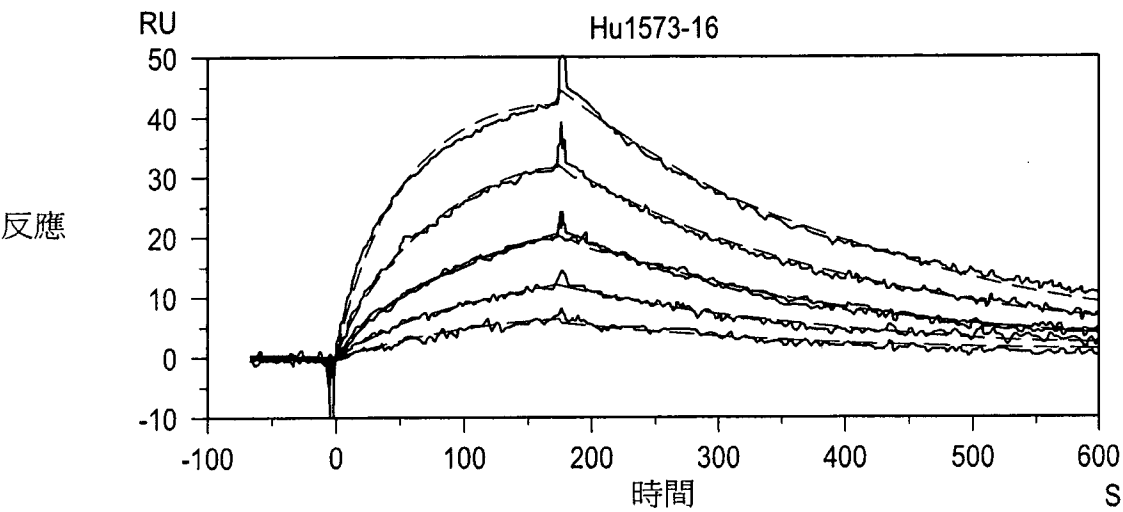
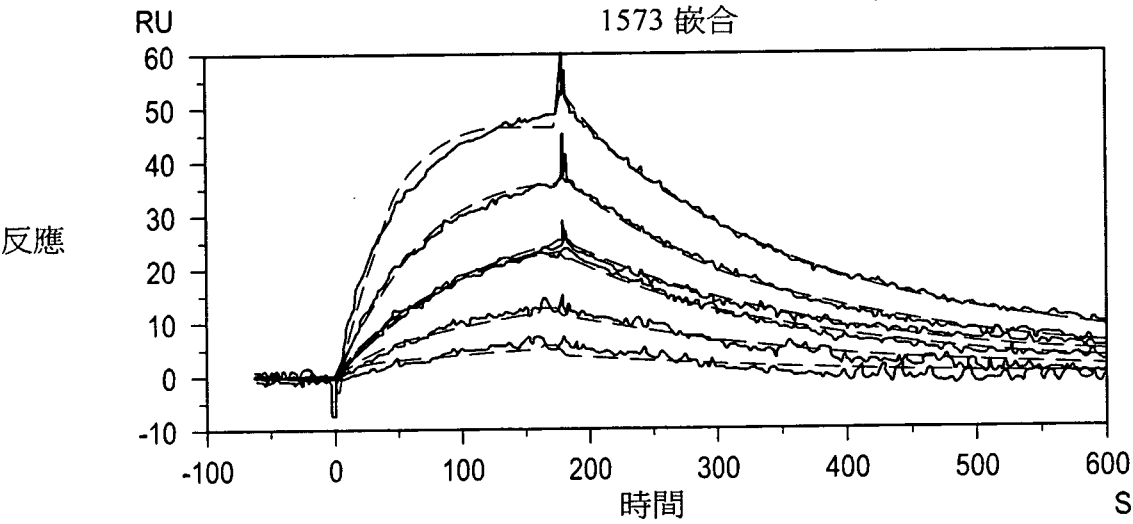
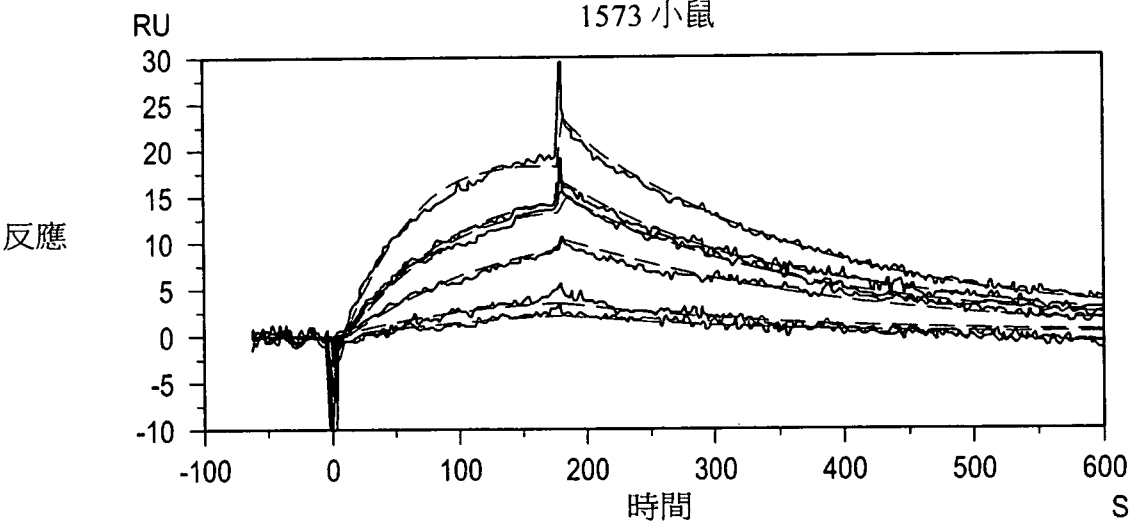


圖 4, 續

1573 嵌合



1573 小鼠



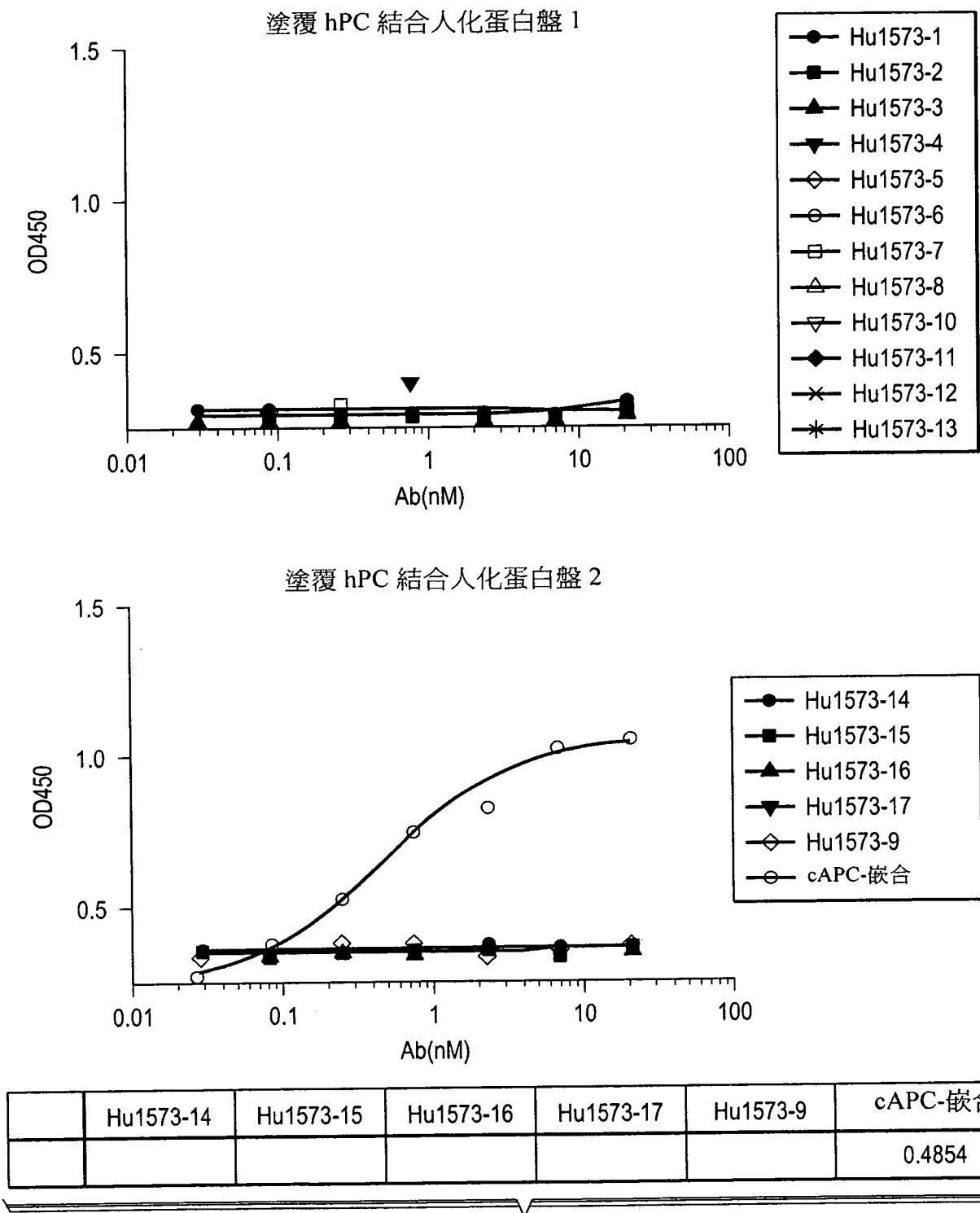
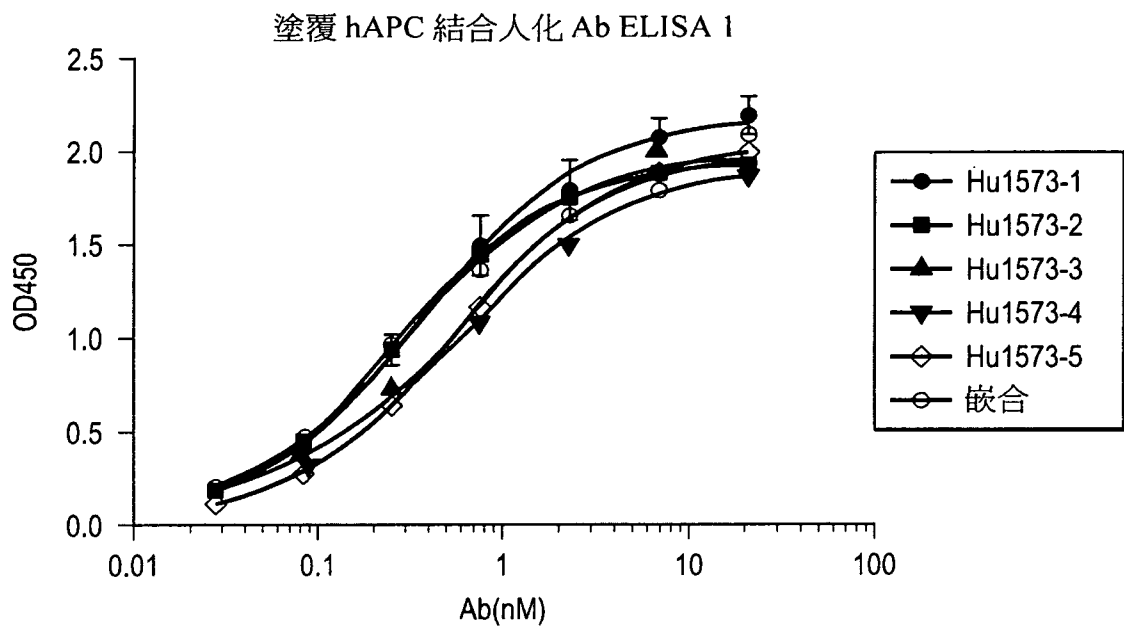
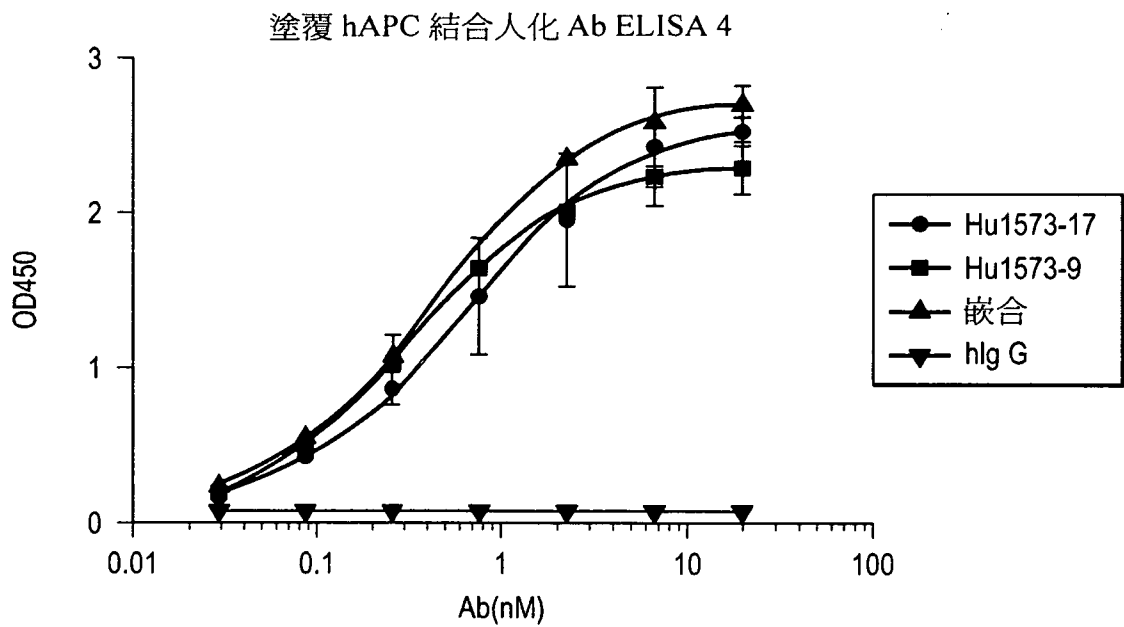


圖 5

18/22



	Hu1573-1	Hu1573-2	Hu1573-3	Hu1573-4	Hu1573-5	嵌合
EC50	0.3693	0.2652	0.5914	0.5634	0.5520	0.3280

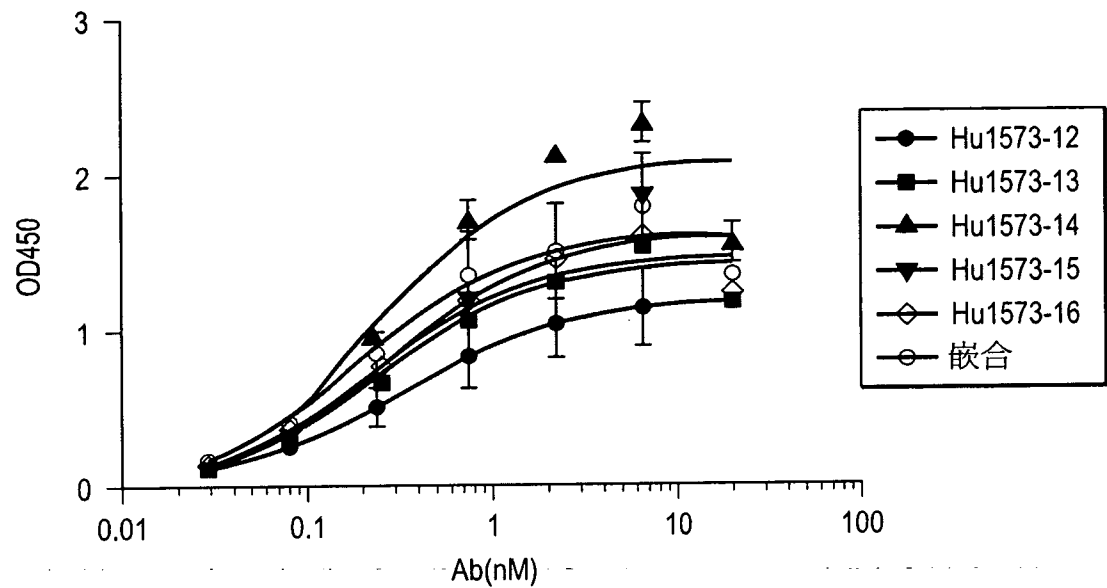


	Hu1573-17	Hu1573-9	嵌合	hlgG
EC50	0.6267	0.3134	0.4412	~ 1.0015

圖 5, 續

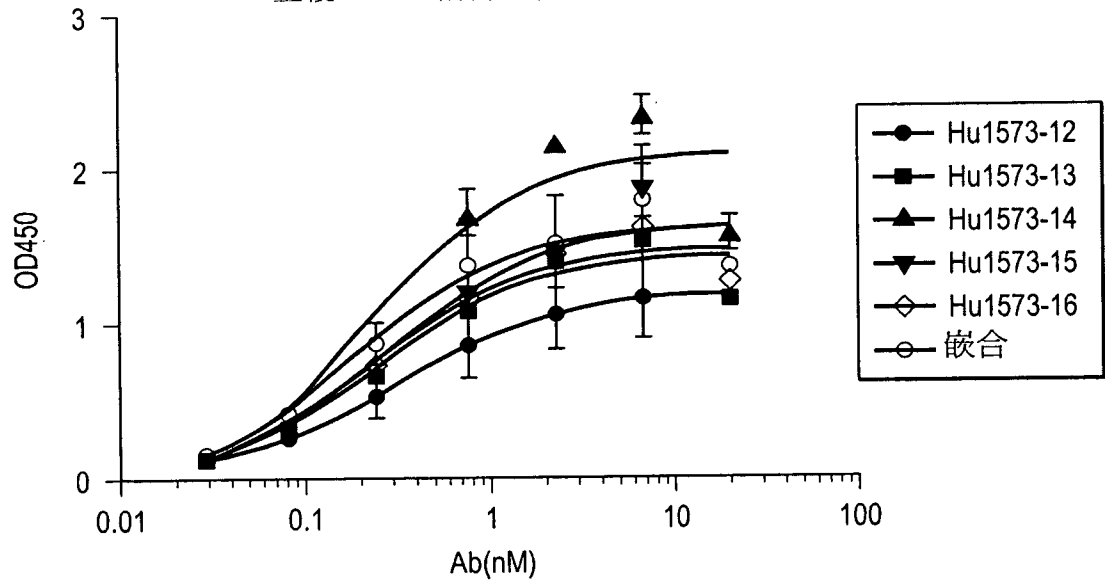
19/22

塗覆 hAPC 結合人化 Ab ELISA 3



	Hu1573-12	Hu1573-13	Hu1573-14	Hu1573-15	Hu1573-16	CHIMERIC
EC50	0.3394	0.2356	0.2247	0.2880	0.2328	0.1832

塗覆 hAPC 結合人化 Ab ELISA 3

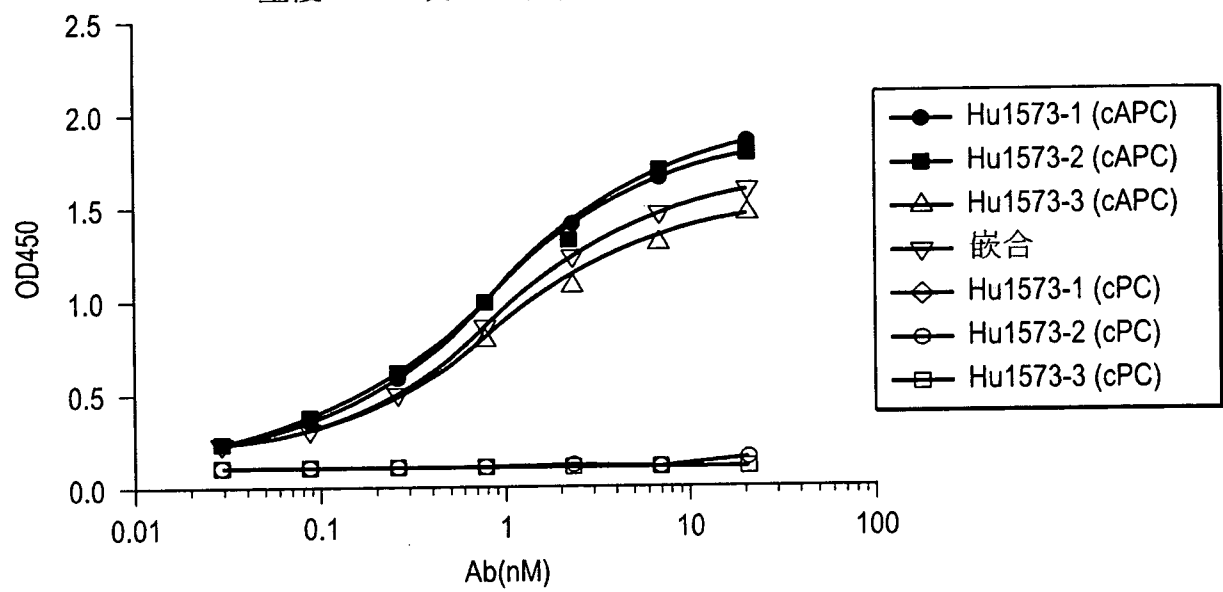


	Hu1573-12	Hu1573-13	Hu1573-14	Hu1573-15	Hu1573-16	嵌合
EC50	0.3394	0.2356	0.2247	0.2880	0.2328	0.1832

圖 5, 續

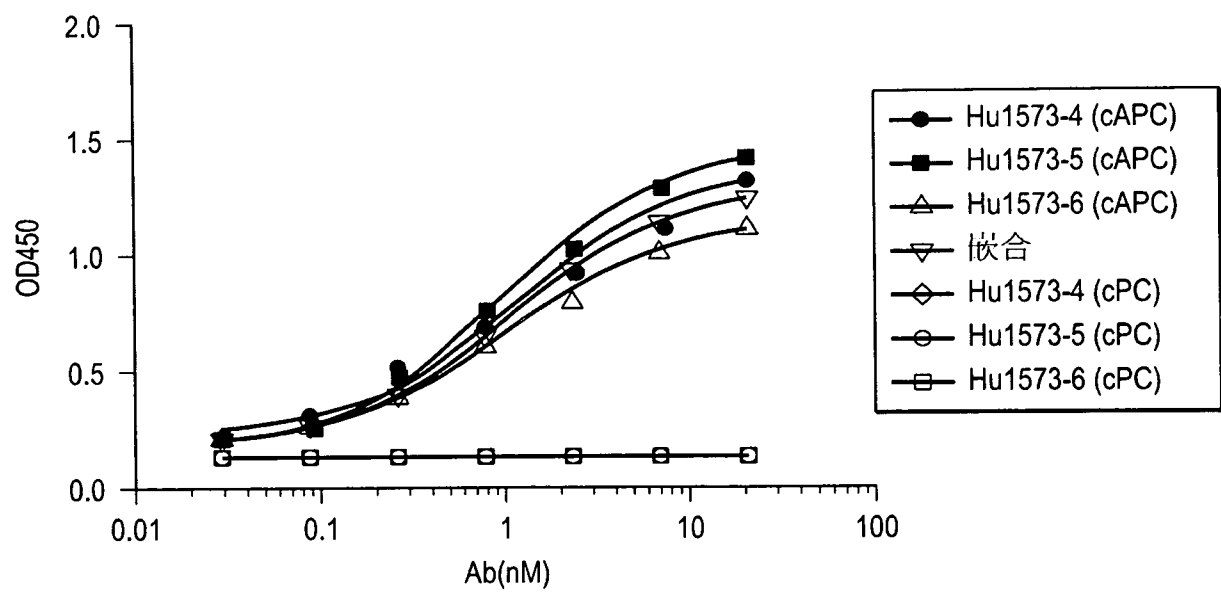
20/22

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 1



	Hu1573-1 (cAPC)	Hu1573-2 (cAPC)	Hu1573-3 (cAPC)	嵌合
EC50	0.8647	0.7745	0.8723	0.9041

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 2

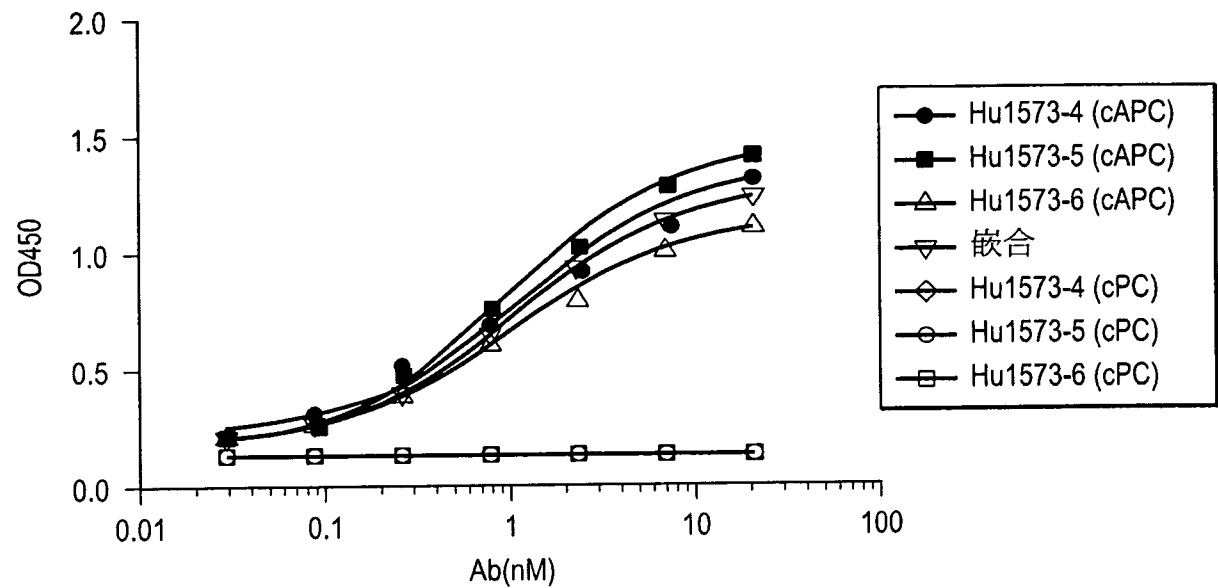


	Hu1573-4 (cAPC)	Hu1573-5 (cAPC)	Hu1573-6 (cAPC)	CHIMERIC
EC50	1.095	0.8995	0.9364	1.068

圖 6

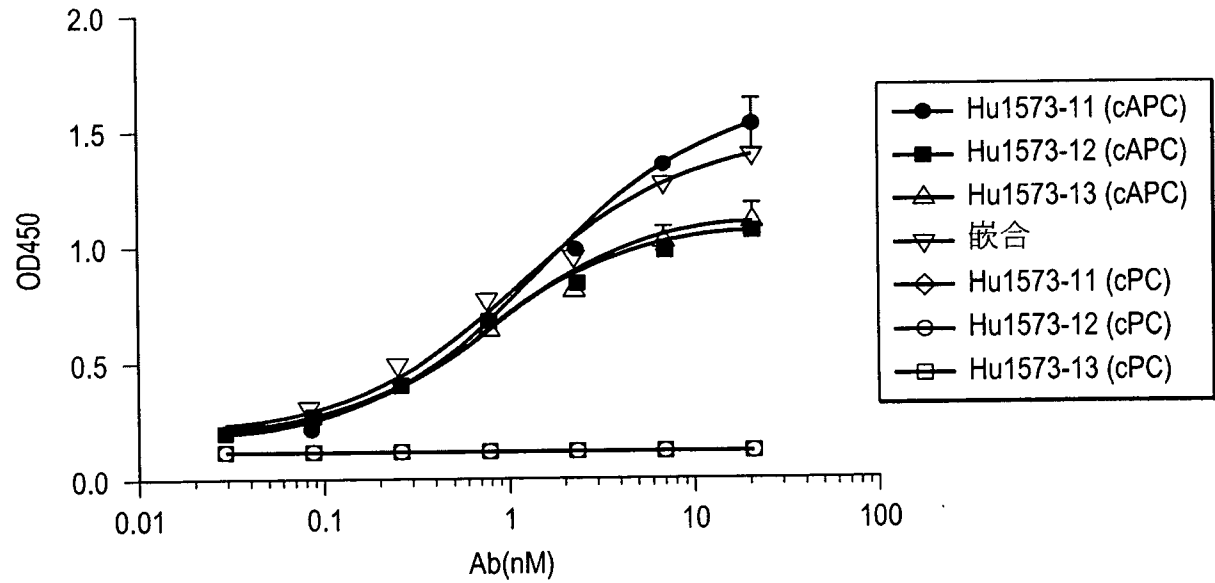
21/22

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 2



	Hu1573-4 (cAPC)	Hu1573-5 (cAPC)	Hu1573-6 (cAPC)	嵌合
EC50	1.095	0.8995	0.9364	1.068

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 4

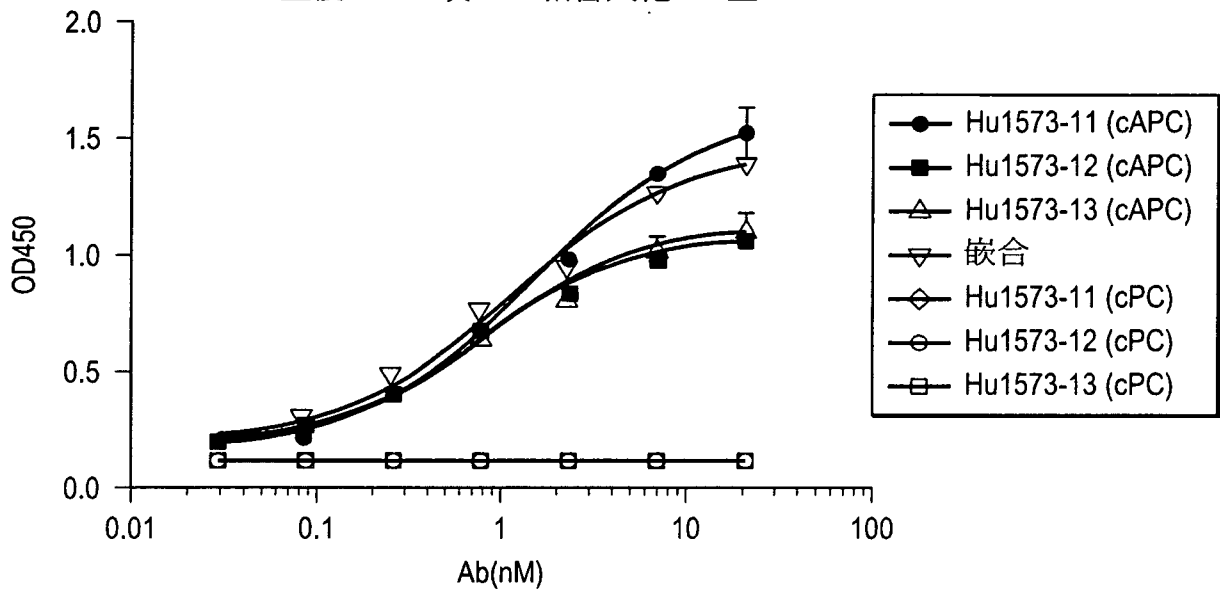


	Hu1573-11 (cAPC)	Hu1573-12 (cAPC)	Hu1573-13 (cAPC)	嵌合
EC50	1.466	0.6418	0.8045	1.074

圖 6, 續

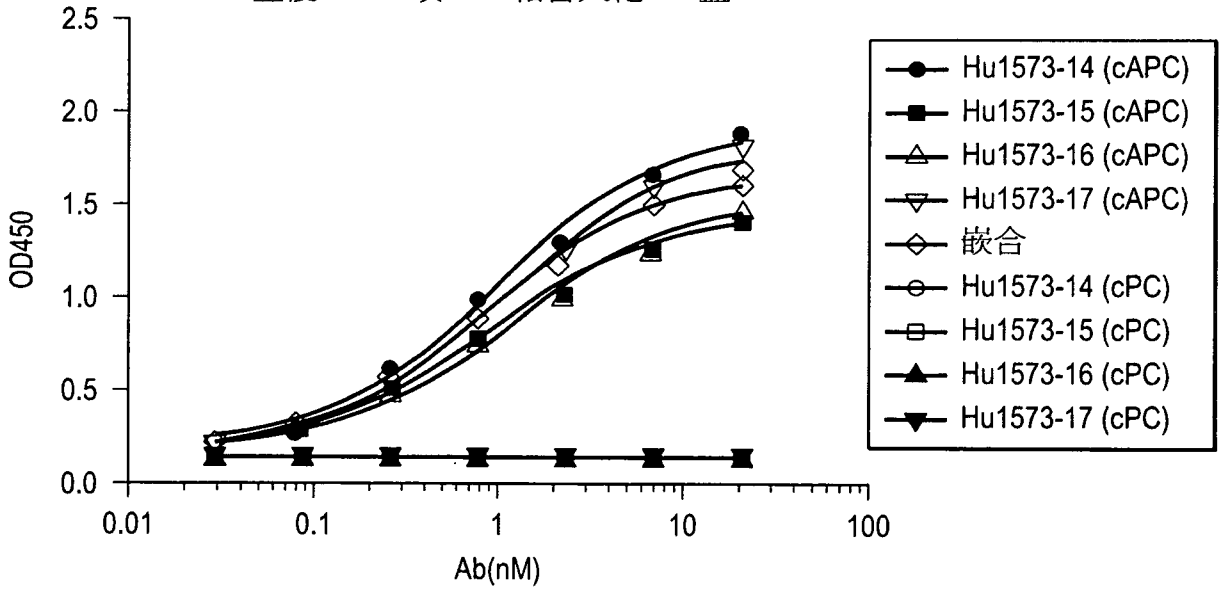
22/22

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 4



	Hu1573-11 (cAPC)	Hu1573-12 (cAPC)	Hu1573-13 (cAPC)	嵌合
EC50	1.466	0.6418	0.8045	1.074

塗覆 cAPC 或 cPC 結合人化 Ab 盤 5



	Hu1573-14 (cAPC)	Hu1573-15 (cAPC)	Hu1573-16 (cAPC)	Hu1573-17 (cAPC)	嵌合
EC50	0.9656	0.2001	1.229	1.210	0.9045

圖 6, 續