



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110835373 A

(43)申请公布日 2020.02.25

(21)申请号 201911010357.7

(22)申请日 2011.03.01

(30)优先权数据

61/309,290 2010.03.01 US

(62)分案原申请数据

201180022078.8 2011.03.01

(71)申请人 拜耳医药保健有限公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 王卓智 潘俊亮 J.格鲁德津斯卡

C.沃特斯梅尔 J.特贝

J.伯肯菲尔德 N.沃布斯特

S.布吕克纳 S.施泰尼希

P.肖尔茨

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 张文辉

(51)Int.Cl.

C07K 16/38(2006.01)

权利要求书2页 说明书52页

序列表20页 附图4页

(54)发明名称

针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的优化的单克隆抗体

(57)摘要

本发明针对针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的优化的单克隆抗体。提供了结合人组织因子途径抑制剂(TFPI)的分离的单克隆抗体。还涵盖编码结合TFPI的单克隆抗体的分离的核酸分子。还提供了包含抗TFPI单克隆抗体的药物组合物和通过施用该抗体治疗凝固缺乏或缺陷的方法。还提供了生成所述抗体的方法。

1. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:1中所显示的氨基酸序列的重链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

2. 权利要求1的分离的单克隆抗体,其中所述修饰选自下组:取代、插入或缺失。

3. 权利要求2的分离的单克隆抗体,其中所述修饰是取代。

4. 权利要求3的分离的单克隆抗体,其中所述取代在选自下组的位置处:Q1, R30 S31, G33, M34, S35, S50, I51, R52, S54, S55, S56, K99和F104。

5. 权利要求4的分离的单克隆抗体,其中所述取代选自下组:Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L和F104Y。

6. 权利要求1的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组:IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。

7. 权利要求1的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代:Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L和F104Y。

8. 权利要求7的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列,其中所述序列包含选自下组的下列取代:

- (a) G33A+S35D+S55R+K99L;
- (b) G33P+I51D+S54F;
- (c) G33P+S35D+S54F+K99L;
- (d) I51D+S54F+K99L;
- (e) M34I+S35D+S55R+K99L;
- (f) M34K+S35D+S55R+K99L;
- (g) Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L;
- (h) Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L;
- (i) Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V;
- (j) Q1E+S35D+S55R+K99L;
- (k) R30S+S31V+I51D+S55R+K99V;
- (l) R30S+S35D+S55R+K99L;
- (m) S31V+G33A+I51D+S55R+K99V;
- (n) S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;
- (o) S31V+G33P+S35D;
- (p) S31V+I51D+R52S+S55R+K99V;
- (q) S31V+I51D+S54F+K99V;
- (r) S31V+I51D+S55R;
- (s) S31V+I51D+S55R+K99L;
- (t) S31V+I51D+S55R+K99V;
- (u) S31V+I51D+S55R+S56G+K99V;
- (v) S31V+I51E+S55R+K99V;
- (w) S31V+K99V;

- (x) S31V+S35D;
- (y) S31V+S35D+I51D+K99V;
- (z) S31V+S35D+S54F;
- (aa) S31V+S35D+S55R;
- (bb) S31V+S35L+I51D+S54F+K99V;
- (cc) S31V+S35L+I51E+S54F+K99V;
- (dd) S31V+S50A+I51D+S55R+K99V;
- (ee) S31V+S54F+K99L;
- (ff) S35D+I51D+K99L;
- (gg) S35D+I51D+S55R+K99V;
- (hh) S35D+I51E+S55R+K99L;
- (ii) S35D+K99L;
- (jj) S35D+R52S+K99L;
- (kk) S35D+R52S+S55R+K99L;
- (ll) S35D+S50A+K99L;
- (mm) S35D+S50A+S55R+K99L;
- (nn) S35D+S54F+S55R+K99L;
- (oo) S35D+S55G+K99L;
- (pp) S35D+S55R+K99L;
- (qq) S35D+S55R+S56G+K99L;
- (rr) S35D+S56G+K99L; 和
- (ss) S35L+S54F+K99V。

9. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

10. 权利要求9的分离的单克隆抗体,其中所述修饰选自下组:取代、插入或缺失。

针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的优化的单克隆抗体

[0001] 本申请是申请日为2011年03月01日,申请号为201510319455.4,发明名称为“针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的优化的单克隆抗体”的发明专利申请的分案申请。

[0002] Zhuozhi Wang, Junliang Pan, Joanna Grudzinska, Christian Votsmeier, Jan Tebbe, Joerg Birkenfeld, Nina Wobst, Simone Brückner, Susanne Steinig, Peter Scholz

[0003] 序列表提交

[0004] 与本申请有关的序列表经由EFS网以电子形式提交,并且在此通过提及而将其完整收入说明书中。

技术领域

[0005] 提供了结合人组织因子途径抑制剂(TFPI)的分离的单克隆抗体及其片段。

背景技术

[0006] 血液凝固(blood coagulation)是血液形成稳定的凝块以使流血停止的过程(process)。该过程牵涉血液中循环的许多酶原和辅因子原(或“凝固因子”)。那些酶原和辅因子原经由序贯或同时将它们转化成活化形式的数种途径而相互作用。最后,所述过程导致在存在因子Va、离子钙、和血小板的情况下由激活的因子X(FXa)将凝血酶原激活为凝血酶。激活的凝血酶继而诱导血小板聚集,而且将血纤蛋白原转化成血纤蛋白,其然后被激活的因子XIII(FXIIIa)交联以形成凝块。

[0007] 可以通过两种独特的途径来实施导致因子X激活的过程:接触激活途径(以前称为内源性途径)和组织因子途径(以前称为外源性途径)。先前认为,凝固级联由连接至共同途径的同等重要的两种途径组成。现在知道用于启动血液凝固的主要途径是组织因子途径。

[0008] 因子X可以被与激活的因子VII(FVIIa)联合的组织因子(TF)激活。因子VIIa和其必需的辅因子TF的复合物是凝固(clotting)级联的一种有力的引发剂(initiator)。

[0009] 凝固的组织因子途径受组织因子途径抑制剂(“TFPI”)负控制。TFPI是FVIIa/TF复合物的一种天然的、FXa依赖性反馈抑制剂。它是多价Kunitz型丝氨酸蛋白酶抑制剂的成员。在生理学上,TFPI结合激活的因子X(FXa)以形成异二聚体复合物,其随后与FVIIa/TF复合物相互作用以抑制其活性,如此关闭凝固的组织因子途径。原则上,阻断TFPI活性可以恢复FXa和FVIIa/TF活性,如此延长组织因子途径作用的持续时间,而且放大FXa的生成,所述FXa是血友病A和B的共同缺陷。

[0010] 实际上,一些初步实验证据已经指明,通过针对TFPI的抗体来阻断TFPI活性使延长的凝固时间正常化或者缩短流血时间。例如,Nordfang等显示了血友病血浆的延长的稀释凝血酶原时间(dilute prothrombin time)在用针对TFPI的抗体处理血浆后正常化(Thromb.Haemost,1991,66(4):464-467)。类似地,Erhardtsen等显示了通过抗TFPI抗体显著缩短血友病A兔模型中的流血时间(Blood Coagulation and Fibrinolysis,1995,6:388-394)。这些研究提示了抗TFPI抗体对TFPI的抑制对于治疗血友病A或B可以是有用的。

在这些研究中仅使用多克隆抗TFPI抗体。

[0011] 使用杂交瘤技术,制备并鉴定针对重组人TFPI (rhTFPI) 的单克隆抗体。参见Yang等,Chin.Med.J.,1998,111 (8) :718-721。测试了单克隆抗体对稀释凝血酶原时间 (PT) 和激活部分促凝血酶原激酶时间 (APTT) 的影响。实验显示了抗TFPI单克隆抗体缩短因子IX缺乏型血浆的稀释促凝血酶原激酶凝固时间。提示了组织因子途径不仅在生理学凝固而且在血友病出血中发挥重要作用 (Yang等,Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao,1997,22 (4) :297-300)。

[0012] 因而,需要对TFPI特异性的抗体来治疗血液学疾病和癌症。

[0013] 一般而言,已经使用遗传工程来创建鼠的、嵌合的、人源化的或完全人的抗体以生成用于人疾病的治疗性抗体。显示了鼠单克隆抗体作为治疗剂具有有限的用途,这是由于短的血清半衰期、不能触发人效应器功能、和人抗小鼠抗体的生成 (Brekke和Sandlie, "Therapeutic Antibodies for Human Diseases at the Dawn of the Twenty-first Century," Nature 2,53,52-62, (2003年1月)。已经显示了嵌合抗体引起人抗嵌合抗体应答。人源化抗体进一步使抗体的小鼠构件最小化。然而,完全人抗体完全避免与鼠元件有关的免疫原性。如此,需要开发完全人抗体以避免与其它形式的遗传工程化单克隆抗体有关的免疫原性。特别地,若使用具有鼠构件或鼠起源的抗体,则诸如用抗TFPI单克隆抗体的血友病治疗会需要的长期 (chronic) 预防处理具有形成对该治疗的免疫应答的高风险,这是由于需要的频繁剂量给药和长的疗法持续时间。例如,血友病A的抗体疗法可以每周需要剂量给药,持续患者一生。这对免疫系统会是连续的考验。如此,需要用于血友病和相关的遗传性和获得性凝固缺乏或缺陷的抗体疗法的完全人抗体。

[0014] 已经经由由Koehler和Milstein在 "Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity," Nature 256,495-497 (1975) 中所描述的杂交瘤技术来生成治疗性抗体。也可以在原核生物和真核生物中重组生成完全人抗体。治疗性抗体优选抗体在宿主细胞中的重组生成而不是杂交瘤生成。重组生成具有如下的优点,即较大的产物一致性、可能地较高的生产水平、和受控制的制备,其使动物衍生的蛋白质的存在最小化或消除动物衍生的蛋白质的存在。出于这些原因,想要具有重组生成的单克隆抗TFPI抗体。

[0015] 另外,因为TFPI以高亲和力结合活化的因子X (FXa),所以有效的抗TFPI抗体应当具有相当的亲和力。如此,期望具有可以与TFPI/FXa结合竞争的结合亲和力的抗TFPI抗体。

发明内容

[0016] 提供了针对人组织因子途径抑制剂 (TFPI) 的单克隆抗体。进一步提供了编码其的分离的核酸分子。还提供了包含抗TFPI单克隆抗体的药物组合物和治疗遗传性和获得性凝固缺乏或缺陷诸如血友病A和B的方法。还提供了用于缩短出血时间的方法,其通过对有此需要的患者施用抗TFPI单克隆抗体进行。还提供了用于生成依照本发明的结合人TFPI的单克隆抗体的方法。

[0017] 在一些实施方案中,已经优化提供的针对TFPI的单克隆抗体,例如以具有升高的亲和力或升高的功能活性。

[0018] 本发明还涉及如下方面:

[0019] 1.一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有

SEQ ID NO:1中所显示的氨基酸序列的重链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

[0020] 2. 项1的分离的单克隆抗体,其中所述修饰选自下组:取代、插入或缺失。

[0021] 3. 项2的分离的单克隆抗体,其中所述修饰是取代。

[0022] 4. 项3的分离的单克隆抗体,其中所述取代在选自下组的位置处:Q1,R30S31,G33,M34,S35,S50,I51,R52,S54,S55,S56,K99和F104。

[0023] 5. 项4的分离的单克隆抗体,其中所述取代选自下组:Q1E,R30S,S31P,S31V,G33A,G33K,G33P,M34I,M34K,S35L,S35D,S50A,I51D,I51E,R52S,S54F,S54D,S55A,S55G,S55R,S56G,K99V,K99L和F104Y。

[0024] 6. 项1的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组:IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgM,IgA1,IgA2,分泌性IgA,IgD和IgE抗体。

[0025] 7. 项1的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代:Q1E,R30S,S31P,S31V,G33A,G33K,G33P,M34I,M34K,S35L,S35D,S50A,I51D,I51E,R52S,S54F,S54D,S55A,S55G,S55R,S56G,K99V,K99L和F104Y。

[0026] 8. 项7的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列,其中所述序列包含选自下组的下列取代:

[0027] (a) G33A+S35D+S55R+K99L;

[0028] (b) G33P+I51D+S54F;

[0029] (c) G33P+S35D+S54F+K99L;

[0030] (d) I51D+S54F+K99L;

[0031] (e) M34I+S35D+S55R+K99L;

[0032] (f) M34K+S35D+S55R+K99L;

[0033] (g) Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L;

[0034] (h) Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L;

[0035] (i) Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V;

[0036] (j) Q1E+S35D+S55R+K99L;

[0037] (k) R30S+S31V+I51D+S55R+K99V;

[0038] (l) R30S+S35D+S55R+K99L;

[0039] (m) S31V+G33A+I51D+S55R+K99V;

[0040] (n) S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;

[0041] (o) S31V+G33P+S35D;

[0042] (p) S31V+I51D+R52S+S55R+K99V;

[0043] (q) S31V+I51D+S54F+K99V;

[0044] (r) S31V+I51D+S55R;

[0045] (s) S31V+I51D+S55R+K99L;

[0046] (t) S31V+I51D+S55R+K99V;

[0047] (u) S31V+I51D+S55R+S56G+K99V;

[0048] (v) S31V+I51E+S55R+K99V;

[0049] (w) S31V+K99V;

- [0050] (x) S31V+S35D;
- [0051] (y) S31V+S35D+I51D+K99V;
- [0052] (z) S31V+S35D+S54F;
- [0053] (aa) S31V+S35D+S55R;
- [0054] (bb) S31V+S35L+I51D+S54F+K99V;
- [0055] (cc) S31V+S35L+I51E+S54F+K99V;
- [0056] (dd) S31V+S50A+I51D+S55R+K99V;
- [0057] (ee) S31V+S54F+K99L;
- [0058] (ff) S35D+I51D+K99L;
- [0059] (gg) S35D+I51D+S55R+K99V;
- [0060] (hh) S35D+I51E+S55R+K99L;
- [0061] (ii) S35D+K99L;
- [0062] (jj) S35D+R52S+K99L;
- [0063] (kk) S35D+R52S+S55R+K99L;
- [0064] (ll) S35D+S50A+K99L;
- [0065] (mm) S35D+S50A+S55R+K99L;
- [0066] (nn) S35D+S54F+S55R+K99L;
- [0067] (oo) S35D+S55G+K99L;
- [0068] (pp) S35D+S55R+K99L;
- [0069] (qq) S35D+S55R+S56G+K99L;
- [0070] (rr) S35D+S56G+K99L;和
- [0071] (ss) S35L+S54F+K99V。
- [0072] 9. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有 SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。
- [0073] 10. 项9的分离的单克隆抗体,其中所述修饰选自下组:取代、插入或缺失。
- [0074] 11. 项10的分离的单克隆抗体,其中所述修饰是取代。
- [0075] 12. 项11的分离的单克隆抗体,其中所述取代在选自下组的位置处:D1,I2,A13,S21,N26,R28,N29,A32,H33,Y48,Y49,N51,N52,P54,G56,E80,S89,D91,D92,G93,V94,P95和V96。
- [0076] 13. 项12的分离的单克隆抗体,其中所述取代选自下组:D1S,I2Y,A13S,S21T,N26A,R28P,N29K,A32N,H33Y,Y48F,Y49R,N51S,N51V,N52G,P54L,G56D,E80M,S89A,D91L,D91R,D91W,D91K,D92S,D92T,G93S,V94T,P95V,P95A,V96G,V96M和V96W。
- [0077] 14. 项9的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组:IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgM,IgA1,IgA2,分泌性IgA,IgD和IgE抗体。
- [0078] 15. 项9的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代:D1S,I2Y,A13S,S21T,N26A,R28P,N29K,A32N,H33Y,Y48F,Y49R,N51S,N51V,N52G,P54L,G56D,E80M,S89A,D91L,D91R,D91W,D91K,D92S,D92T,G93S,V94T,P95V,P95A,V96G,V96M和V96W。

[0079] 16. 项15的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列,其中所述序列包含选自下组的下列取代:

- [0080] (a) A13S+Y48F+N51V+D91W;
- [0081] (b) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0082] (c) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0083] (d) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0084] (e) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0085] (f) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0086] (g) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0087] (h) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0088] (i) D1S+Y48F+N51V+D91W;
- [0089] (j) D91L+V96W;
- [0090] (k) H33Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0091] (l) I2Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0092] (m) N26A+Y48F+N51V+D91W;
- [0093] (n) N29K+Y48F+N51V+D91W;
- [0094] (o) N51V+D91K;
- [0095] (p) N51V+D91W;
- [0096] (q) R28P+Y48F+N51V+D91W;
- [0097] (r) S21T+Y48F+N51V+D91W;
- [0098] (s) Y48F+D91K;
- [0099] (t) Y48F+D91L+D92S+V96W;
- [0100] (u) Y48F+D91L+G93S+V96W;
- [0101] (v) Y48F+D91L+P95V+V96W;
- [0102] (w) Y48F+D91L+V94T+V96W;
- [0103] (x) Y48F+D91L+V96W;
- [0104] (y) Y48F+D91W;
- [0105] (z) Y48F+N51S+D91L+V96W;
- [0106] (aa) Y48F+N51V;
- [0107] (bb) Y48F+N51V+D91L;
- [0108] (cc) Y48F+N51V+D91L+V96W;
- [0109] (dd) Y48F+N51V+D91W;
- [0110] (ee) Y48F+N51V+D91W+D92S;
- [0111] (ff) Y48F+N51V+D91W+G93S;
- [0112] (gg) Y48F+N51V+D91W+P95V;
- [0113] (hh) Y48F+N51V+D91W+V94T;
- [0114] (ii) Y48F+N51V+E80M+D91W;

- [0115] (jj) Y48F+N51V+G56D+V96W;
- [0116] (kk) Y48F+N51V+S89A+D91W;
- [0117] (ll) Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A;
- [0118] (mm) Y48F+N51V+V96W;
- [0119] (nn) Y48F+N52G;
- [0120] (oo) Y48F+N52G+D91L+V96W; 和
- [0121] (pp) Y48F+S89A+D91L+V96W。
- [0122] 17. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含:
- [0123] (a) 包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链, 其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰; 和
- [0124] (b) 包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链, 其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。
- [0125] 18. 项17的分离的单克隆抗体, 其中所述重链修饰是取代。
- [0126] 19. 项18的分离的单克隆抗体, 其中所述重链取代包含选自下组的取代: Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L和F104Y。
- [0127] 20. 项17的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含两个或多个取代。
- [0128] 21. 项20的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含选自下组的取代:
- [0129] (a) G33A+S35D+S55R+K99L;
- [0130] (b) G33P+I51D+S54F;
- [0131] (c) G33P+S35D+S54F+K99L;
- [0132] (d) I51D+S54F+K99L;
- [0133] (e) M34I+S35D+S55R+K99L;
- [0134] (f) M34K+S35D+S55R+K99L;
- [0135] (g) Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L;
- [0136] (h) Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L;
- [0137] (i) Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V;
- [0138] (j) Q1E+S35D+S55R+K99L;
- [0139] (k) R30S+S31V+I51D+S55R+K99V;
- [0140] (l) R30S+S35D+S55R+K99L;
- [0141] (m) S31V+G33A+I51D+S55R+K99V;
- [0142] (n) S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;
- [0143] (o) S31V+G33P+S35D;
- [0144] (p) S31V+I51D+R52S+S55R+K99V;
- [0145] (q) S31V+I51D+S54F+K99V;
- [0146] (r) S31V+I51D+S55R;
- [0147] (s) S31V+I51D+S55R+K99L;
- [0148] (t) S31V+I51D+S55R+K99V;
- [0149] (u) S31V+I51D+S55R+S56G+K99V;

- [0150] (v) S31V+I51E+S55R+K99V;
- [0151] (w) S31V+K99V;
- [0152] (x) S31V+S35D;
- [0153] (y) S31V+S35D+I51D+K99V;
- [0154] (z) S31V+S35D+S54F;
- [0155] (aa) S31V+S35D+S55R;
- [0156] (bb) S31V+S35L+I51D+S54F+K99V;
- [0157] (cc) S31V+S35L+I51E+S54F+K99V;
- [0158] (dd) S31V+S50A+I51D+S55R+K99V;
- [0159] (ee) S31V+S54F+K99L;
- [0160] (ff) S35D+I51D+K99L;
- [0161] (gg) S35D+I51D+S55R+K99V;
- [0162] (hh) S35D+I51E+S55R+K99L;
- [0163] (ii) S35D+K99L;
- [0164] (jj) S35D+R52S+K99L;
- [0165] (kk) S35D+R52S+S55R+K99L;
- [0166] (ll) S35D+S50A+K99L;
- [0167] (mm) S35D+S50A+S55R+K99L;
- [0168] (nn) S35D+S54F+S55R+K99L;
- [0169] (oo) S35D+S55G+K99L;
- [0170] (pp) S35D+S55R+K99L;
- [0171] (qq) S35D+S55R+S56G+K99L;
- [0172] (rr) S35D+S56G+K99L;和
- [0173] (ss) S35L+S54F+K99V。
- [0174] 22. 项17的分离的单克隆抗体,其中所述轻链修饰是取代。
- [0175] 23. 项22的分离的单克隆抗体,其中所述轻链取代包含选自下组的取代:D1S, I2Y, A13S, S21T, N26A, R28P, N29K, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, P54L, G56D, E80M, S89A, D91L, D91R, D91W, D91K, D92S, D92T, G93S, V94T, P95V, P95A, V96G, V96M和V96W。
- [0176] 24. 项17的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含两个或多个取代。
- [0177] 25. 项24的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含选自下组的取代:
- [0178] (a) A13S+Y48F+N51V+D91W;
- [0179] (b) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0180] (c) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0181] (d) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0182] (e) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0183] (f) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0184] (g) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W;

- [0185] (h) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0186] (i) D1S+Y48F+N51V+D91W;
- [0187] (j) D91L+V96W;
- [0188] (k) H33Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0189] (l) I2Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0190] (m) N26A+Y48F+N51V+D91W;
- [0191] (n) N29K+Y48F+N51V+D91W;
- [0192] (o) N51V+D91K;
- [0193] (p) N51V+D91W;
- [0194] (q) R28P+Y48F+N51V+D91W;
- [0195] (r) S21T+Y48F+N51V+D91W;
- [0196] (s) Y48F+D91K;
- [0197] (t) Y48F+D91L+D92S+V96W;
- [0198] (u) Y48F+D91L+G93S+V96W;
- [0199] (v) Y48F+D91L+P95V+V96W;
- [0200] (w) Y48F+D91L+V94T+V96W;
- [0201] (x) Y48F+D91L+V96W;
- [0202] (y) Y48F+D91W;
- [0203] (z) Y48F+N51S+D91L+V96W;
- [0204] (aa) Y48F+N51V;
- [0205] (bb) Y48F+N51V+D91L;
- [0206] (cc) Y48F+N51V+D91L+V96W;
- [0207] (dd) Y48F+N51V+D91W;
- [0208] (ee) Y48F+N51V+D91W+D92S;
- [0209] (ff) Y48F+N51V+D91W+G93S;
- [0210] (gg) Y48F+N51V+D91W+P95V;
- [0211] (hh) Y48F+N51V+D91W+V94T;
- [0212] (ii) Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0213] (jj) Y48F+N51V+G56D+V96W;
- [0214] (kk) Y48F+N51V+S89A+D91W;
- [0215] (ll) Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A;
- [0216] (mm) Y48F+N51V+V96W;
- [0217] (nn) Y48F+N52G;
- [0218] (oo) Y48F+N52G+D91L+V96W; 和
- [0219] (pp) Y48F+S89A+D91L+V96W。
- [0220] 26. 项17的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。
- [0221] 27. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:3中显示的且包含一个或多个氨基酸修饰的氨基酸序列。

- [0222] 28. 项27的分离的单克隆抗体,其中所述修饰选自下组:取代、插入或缺失。
- [0223] 29. 项28的分离的单克隆抗体,其中所述修饰是取代。
- [0224] 30. 项29的分离的单克隆抗体,其中所述取代在选自下组的位置处:Q1, S30, N32, S37, G44, I53, K55, S57, K58, N61, D62, H103, H107, G109和Y112。
- [0225] 31. 项30的分离的单克隆抗体,其中所述取代选自下组:Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A和Y112D。
- [0226] 32. 项27的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代:Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A和Y112D。
- [0227] 33. 项32的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列,其中所述序列包含选自下组的下列取代:
- [0228] (a) D62Q+H107M+Y112D;
- [0229] (b) D62Q+Y112D;
- [0230] (c) D62R+H107M+Y112D;
- [0231] (d) D62R+Y112D;
- [0232] (e) D62S+H107M+Y112D;
- [0233] (f) N32D+D62K+Y112D;
- [0234] (g) N32D+D62Q+H107M+Y112D;
- [0235] (h) N32D+D62Q+Y112D;
- [0236] (i) N32D+D62R+H103D;
- [0237] (j) N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;
- [0238] (k) N32D+D62R+H107M;
- [0239] (l) N32D+D62R+H107M+Y112D;
- [0240] (m) N32D+D62R+Y112D;
- [0241] (n) N32D+D62S+H107M+Y112D;
- [0242] (o) N32D+G44S+D62R+Y112D;
- [0243] (p) N32D+I53T+D62Q+Y112D;
- [0244] (q) N32D+I53T+D62R+Y112D;
- [0245] (r) N32D+K55Y+D62Q+Y112D;
- [0246] (s) N32D+K55Y+D62R+Y112D;
- [0247] (t) N32D+S37N+D62R+Y112D;
- [0248] (u) Q1E+N32D+D62R+Y112D;
- [0249] (v) Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D;
- [0250] (w) N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D
- [0251] (x) S30R+S57K;
- [0252] (y) N61G+D62V; 和
- [0253] (z) K58M+D62N。
- [0254] 34. 项27的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组:IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,

IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。

[0255] 35. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含SEQ ID NO:4中显示的且包含一个或多个氨基酸修饰的氨基酸序列。

[0256] 36. 项35的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰选自下组: 取代、插入或缺失。

[0257] 37. 项36的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰是取代。

[0258] 38. 项37的分离的单克隆抗体, 其中所述取代在选自下组的位置处: M4, V30, F31, S32, D33, N35, T36, Y37, N39, L42, K44, Q50, L51, Y54, K55, G56, S57, A60, S61, D97和S98。

[0259] 39. 项38的分离的单克隆抗体, 其中所述取代选自下组: M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, F31H, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, L51R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T和S98H。

[0260] 40. 项35的分离的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代: M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, F31H, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, L51R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T和S98H。

[0261] 41. 项40的分离的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列, 其中所述序列包含选自下组的下列取代:

[0262] (a) D33F+N35I;

[0263] (b) D33F+N35I+D97T;

[0264] (c) D33F+N35T+Y37F;

[0265] (d) D33R+N35I;

[0266] (e) D33R+N35I+D97T;

[0267] (f) D33R+N35T;

[0268] (g) F31H+S32R+D33F+N35I+D97T;

[0269] (h) F31I+D33F+N35I;

[0270] (i) F31I+D33F+N35I+D97T;

[0271] (j) F31I+D33F+N35I+K44R;

[0272] (k) F31I+D33F+N35I+L42Q;

[0273] (l) F31I+D33F+N35I+S98H;

[0274] (m) F31I+D33F+N35I+T36N;

[0275] (n) F31I+D33R;

[0276] (o) F31I+D33R+N35I;

[0277] (p) F31I+N35I;

[0278] (q) F31I+S32R+D33F+N35I+D97T;

[0279] (r) F31I+S32R+D33F+N35T;

[0280] (s) F31I+S32R+D33R+N35I+D97T;

[0281] (t) F31I+S32R+N35I+D97T;

[0282] (u) F31M+D33F;

[0283] (v) F31M+D33F+N35I;

[0284] (w) F31M+D33F+N35T;

- [0285] (x) F31M+D33F+N35T+Y37F;
- [0286] (y) F31M+D33R;
- [0287] (z) F31M+D33R+N35I;
- [0288] (aa) F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;
- [0289] (bb) F31M+S32R+D33F+D97T;
- [0290] (cc) F31M+S32R+D33F+N35I;
- [0291] (dd) F31M+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0292] (ee) F31M+S32R+D33R;
- [0293] (ff) F31M+S32R+D33R+N35I;
- [0294] (gg) F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0295] (hh) F31M+S32R+D33R+N35T;
- [0296] (ii) F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0297] (jj) M4I+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0298] (kk) M4L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0299] (ll) N35T+D97T;
- [0300] (mm) S32R+D33F;
- [0301] (nn) S32R+D33F+N35I;
- [0302] (oo) S32R+D33F+N35I+A60D+D97T;
- [0303] (pp) S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0304] (qq) S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;
- [0305] (rr) S32R+D33F+N35I+G56V+D97T;
- [0306] (ss) S32R+D33F+N35I+K44R+D97T;
- [0307] (tt) S32R+D33F+N35I+K55L+D97T;
- [0308] (uu) S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T;
- [0309] (vv) S32R+D33F+N35I+L51R+D97T;
- [0310] (ww) S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;
- [0311] (xx) S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T;
- [0312] (yy) S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
- [0313] (zz) S32R+D33F+N35T;
- [0314] (aaa) S32R+D33R;
- [0315] (bbb) S32R+D33R+N35I;
- [0316] (ccc) S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0317] (ddd) S32R+D33R+N35T;
- [0318] (eee) S32R+N35I;
- [0319] (fff) S32R+N35T;
- [0320] (ggg) S32R+N35T+D97T;
- [0321] (hhh) V30L+F31I+D33F+N35I;
- [0322] (iii) V30L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0323] (jjj) V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;

- [0324] (kkk) V30L+S32R+N35I+T36N;
- [0325] (lll) N35V+G56D;
- [0326] (mmm) N35L+G56A;和
- [0327] (nnn) D33F+Y54F。
- [0328] 42. 项35的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组:IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgM,IgA1,IgA2,分泌性IgA,IgD和IgE抗体。
- [0329] 43. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:
- [0330] (a) 包含SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰;和
- [0331] (b) 包含SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。
- [0332] 44. 项43的分离的单克隆抗体,其中所述重链修饰是取代。
- [0333] 45. 项44的分离的单克隆抗体,其中所述重链取代包含选自下组的取代:Q1E,S30R,N32D,N32E,S33G,S37N,G44S,I53T,K55Y,S57K,S57R,K58M,N61G,N61T,D62I,D62R,D62Q,D62L,D62S,D62V,D62N,D62K,H103D,H103G,H107M,G109A和Y112D。
- [0334] 46. 项43的分离的单克隆抗体,其中所述重链包含两个或多个取代。
- [0335] 47. 项46的分离的单克隆抗体,其中所述重链包含选自下组的取代:
- [0336] (a) D62Q+H107M+Y112D;
- [0337] (b) D62Q+Y112D;
- [0338] (c) D62R+H107M+Y112D;
- [0339] (d) D62R+Y112D;
- [0340] (e) D62S+H107M+Y112D;
- [0341] (f) N32D+D62K+Y112D;
- [0342] (g) N32D+D62Q+H107M+Y112D;
- [0343] (h) N32D+D62Q+Y112D;
- [0344] (i) N32D+D62R+H103D;
- [0345] (j) N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;
- [0346] (k) N32D+D62R+H107M;
- [0347] (l) N32D+D62R+H107M+Y112D;
- [0348] (m) N32D+D62R+Y112D;
- [0349] (n) N32D+D62S+H107M+Y112D;
- [0350] (o) N32D+G44S+D62R+Y112D;
- [0351] (p) N32D+I53T+D62Q+Y112D;
- [0352] (q) N32D+I53T+D62R+Y112D;
- [0353] (r) N32D+K55Y+D62Q+Y112D;
- [0354] (s) N32D+K55Y+D62R+Y112D;
- [0355] (t) N32D+S37N+D62R+Y112D;
- [0356] (u) Q1E+N32D+D62R+Y112D;
- [0357] (v) Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D;

- [0358] (w) N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D
- [0359] (x) S30R+S57K;
- [0360] (y) N61G+D62V;和
- [0361] (z) K58M+D62N。
- [0362] 48. 项43的分离的单克隆抗体,其中所述轻链修饰是取代。
- [0363] 49. 项48的分离的单克隆抗体,其中所述轻链取代包含选自下组的取代:M4I,M4L, V30L,F31I,F31M,F31Y,F31H,S32L,S32R,S32Y,D33F,D33R,N35I,N35L,N35T,N35V,T36N, Y37F,N39D,L42Q,K44R,Q50R,L51R,Y54F,K55L,G56D,G56A,G56V,S57Y,A60D,S61C,D97M, D97T和S98H。
- [0364] 50. 项43的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含两个或多个取代。
- [0365] 51. 项50的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含选自下组的取代:
- [0366] (a) D33F+N35I;
- [0367] (b) D33F+N35I+D97T;
- [0368] (c) D33F+N35T+Y37F;
- [0369] (d) D33R+N35I;
- [0370] (e) D33R+N35I+D97T;
- [0371] (f) D33R+N35T;
- [0372] (g) F31H+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0373] (h) F31I+D33F+N35I;
- [0374] (i) F31I+D33F+N35I+D97T;
- [0375] (j) F31I+D33F+N35I+K44R;
- [0376] (k) F31I+D33F+N35I+L42Q;
- [0377] (l) F31I+D33F+N35I+S98H;
- [0378] (m) F31I+D33F+N35I+T36N;
- [0379] (n) F31I+D33R;
- [0380] (o) F31I+D33R+N35I;
- [0381] (p) F31I+N35I;
- [0382] (q) F31I+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0383] (r) F31I+S32R+D33F+N35T;
- [0384] (s) F31I+S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0385] (t) F31I+S32R+N35I+D97T;
- [0386] (u) F31M+D33F;
- [0387] (v) F31M+D33F+N35I;
- [0388] (w) F31M+D33F+N35T;
- [0389] (x) F31M+D33F+N35T+Y37F;
- [0390] (y) F31M+D33R;
- [0391] (z) F31M+D33R+N35I;
- [0392] (aa) F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;
- [0393] (bb) F31M+S32R+D33F+D97T;

- [0394] (cc) F31M+S32R+D33F+N35I;
- [0395] (dd) F31M+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0396] (ee) F31M+S32R+D33R;
- [0397] (ff) F31M+S32R+D33R+N35I;
- [0398] (gg) F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0399] (hh) F31M+S32R+D33R+N35T;
- [0400] (ii) F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0401] (jj) M4I+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0402] (kk) M4L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0403] (ll) N35T+D97T;
- [0404] (mm) S32R+D33F;
- [0405] (nn) S32R+D33F+N35I;
- [0406] (oo) S32R+D33F+N35I+A60D+D97T;
- [0407] (pp) S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0408] (qq) S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;
- [0409] (rr) S32R+D33F+N35I+G56V+D97T;
- [0410] (ss) S32R+D33F+N35I+K44R+D97T;
- [0411] (tt) S32R+D33F+N35I+K55L+D97T;
- [0412] (uu) S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T;
- [0413] (vv) S32R+D33F+N35I+L51R+D97T;
- [0414] (ww) S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;
- [0415] (xx) S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T;
- [0416] (yy) S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
- [0417] (zz) S32R+D33F+N35T;
- [0418] (aaa) S32R+D33R;
- [0419] (bbb) S32R+D33R+N35I;
- [0420] (ccc) S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0421] (ddd) S32R+D33R+N35T;
- [0422] (eee) S32R+N35I;
- [0423] (fff) S32R+N35T;
- [0424] (ggg) S32R+N35T+D97T;
- [0425] (hhh) V30L+F31I+D33F+N35I;
- [0426] (iii) V30L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0427] (jjj) V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
- [0428] (kkk) V30L+S32R+N35I+T36N;
- [0429] (lll) N35V+G56D;
- [0430] (mmm) N35L+G56A; 和
- [0431] (nnn) D33F+Y54F。
- [0432] 52. 项43的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4,

IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。

[0433] 53. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含:

[0434] (a) 包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链, 其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰; 和

[0435] (b) 包含SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的轻链, 其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

[0436] 54. 项53的分离的单克隆抗体, 其中所述重链修饰是取代。

[0437] 55. 项54的分离的单克隆抗体, 其中所述重链取代包含选自下组的取代: Q1E, R30S, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I, M34K, S35L, S35D, S50A, I51D, I51E, R52S, S54F, S54D, S55A, S55G, S55R, S56G, K99V, K99L, 和F104Y。

[0438] 56. 项53的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含两个或多个取代。

[0439] 57. 项56的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含选自下组的取代:

[0440] (a) G33A+S35D+S55R+K99L;

[0441] (b) G33P+I51D+S54F;

[0442] (c) G33P+S35D+S54F+K99L;

[0443] (d) I51D+S54F+K99L;

[0444] (e) M34I+S35D+S55R+K99L;

[0445] (f) M34K+S35D+S55R+K99L;

[0446] (g) Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L;

[0447] (h) Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L;

[0448] (i) Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V;

[0449] (j) Q1E+S35D+S55R+K99L;

[0450] (k) R30S+S31V+I51D+S55R+K99V;

[0451] (l) R30S+S35D+S55R+K99L;

[0452] (m) S31V+G33A+I51D+S55R+K99V;

[0453] (n) S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;

[0454] (o) S31V+G33P+S35D;

[0455] (p) S31V+I51D+R52S+S55R+K99V;

[0456] (q) S31V+I51D+S54F+K99V;

[0457] (r) S31V+I51D+S55R;

[0458] (s) S31V+I51D+S55R+K99L;

[0459] (t) S31V+I51D+S55R+K99V;

[0460] (u) S31V+I51D+S55R+S56G+K99V;

[0461] (v) S31V+I51E+S55R+K99V;

[0462] (w) S31V+K99V;

[0463] (x) S31V+S35D;

[0464] (y) S31V+S35D+I51D+K99V;

[0465] (z) S31V+S35D+S54F;

[0466] (aa) S31V+S35D+S55R;

- [0467] (bb) S31V+S35L+I51D+S54F+K99V;
- [0468] (cc) S31V+S35L+I51E+S54F+K99V;
- [0469] (dd) S31V+S50A+I51D+S55R+K99V;
- [0470] (ee) S31V+S54F+K99L;
- [0471] (ff) S35D+I51D+K99L;
- [0472] (gg) S35D+I51D+S55R+K99V;
- [0473] (hh) S35D+I51E+S55R+K99L;
- [0474] (ii) S35D+K99L;
- [0475] (jj) S35D+R52S+K99L;
- [0476] (kk) S35D+R52S+S55R+K99L;
- [0477] (ll) S35D+S50A+K99L;
- [0478] (mm) S35D+S50A+S55R+K99L;
- [0479] (nn) S35D+S54F+S55R+K99L;
- [0480] (oo) S35D+S55G+K99L;
- [0481] (pp) S35D+S55R+K99L;
- [0482] (qq) S35D+S55R+S56G+K99L;
- [0483] (rr) S35D+S56G+K99L; 和
- [0484] (ss) S35L+S54F+K99V。
- [0485] 58. 项53的分离的单克隆抗体,其中所述轻链修饰是取代。
- [0486] 59. 项58的分离的单克隆抗体,其中所述轻链取代包含选自下组的取代:M4I, M4L, V30L, F31I, F31M, F31Y, F31H, S32L, S32R, S32Y, D33F, D33R, N35I, N35L, N35T, N35V, T36N, Y37F, N39D, L42Q, K44R, Q50R, L51R, Y54F, K55L, G56D, G56A, G56V, S57Y, A60D, S61C, D97M, D97T和S98H。
- [0487] 60. 项53的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含两个或多个取代。
- [0488] 61. 项60的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含选自下组的取代:
- [0489] (a) D33F+N35I;
- [0490] (b) D33F+N35I+D97T;
- [0491] (c) D33F+N35T+Y37F;
- [0492] (d) D33R+N35I;
- [0493] (e) D33R+N35I+D97T;
- [0494] (f) D33R+N35T;
- [0495] (g) F31H+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0496] (h) F31I+D33F+N35I;
- [0497] (i) F31I+D33F+N35I+D97T;
- [0498] (j) F31I+D33F+N35I+K44R;
- [0499] (k) F31I+D33F+N35I+L42Q;
- [0500] (l) F31I+D33F+N35I+S98H;
- [0501] (m) F31I+D33F+N35I+T36N;
- [0502] (n) F31I+D33R;

- [0503] (o) F31I+D33R+N35I;
- [0504] (p) F31I+N35I;
- [0505] (q) F31I+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0506] (r) F31I+S32R+D33F+N35T;
- [0507] (s) F31I+S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0508] (t) F31I+S32R+N35I+D97T;
- [0509] (u) F31M+D33F;
- [0510] (v) F31M+D33F+N35I;
- [0511] (w) F31M+D33F+N35T;
- [0512] (x) F31M+D33F+N35T+Y37F;
- [0513] (y) F31M+D33R;
- [0514] (z) F31M+D33R+N35I;
- [0515] (aa) F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;
- [0516] (bb) F31M+S32R+D33F+D97T;
- [0517] (cc) F31M+S32R+D33F+N35I;
- [0518] (dd) F31M+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0519] (ee) F31M+S32R+D33R;
- [0520] (ff) F31M+S32R+D33R+N35I;
- [0521] (gg) F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0522] (hh) F31M+S32R+D33R+N35T;
- [0523] (ii) F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0524] (jj) M4I+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0525] (kk) M4L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0526] (ll) N35T+D97T;
- [0527] (mm) S32R+D33F;
- [0528] (nn) S32R+D33F+N35I;
- [0529] (oo) S32R+D33F+N35I+A60D+D97T;
- [0530] (pp) S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0531] (qq) S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;
- [0532] (rr) S32R+D33F+N35I+G56V+D97T;
- [0533] (ss) S32R+D33F+N35I+K44R+D97T;
- [0534] (tt) S32R+D33F+N35I+K55L+D97T;
- [0535] (uu) S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T;
- [0536] (vv) S32R+D33F+N35I+L51R+D97T;
- [0537] (ww) S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;
- [0538] (xx) S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T;
- [0539] (yy) S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
- [0540] (zz) S32R+D33F+N35T;
- [0541] (aaa) S32R+D33R;

- [0542] (bbb) S32R+D33R+N35I;
- [0543] (ccc) S32R+D33R+N35I+D97T;
- [0544] (ddd) S32R+D33R+N35T;
- [0545] (eee) S32R+N35I;
- [0546] (fff) S32R+N35T;
- [0547] (ggg) S32R+N35T+D97T;
- [0548] (hhh) V30L+F31I+D33F+N35I;
- [0549] (iii) V30L+S32R+D33F+N35I+D97T;
- [0550] (jjj) V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;
- [0551] (kkk) V30L+S32R+N35I+T36N;
- [0552] (lll) N35V+G56D;
- [0553] (mmm) N35L+G56A; 和
- [0554] (nnn) D33F+Y54F。
- [0555] 62. 项53的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体选自下组: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。
- [0556] 63. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含:
- [0557] (a) 包含SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的重链, 其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰; 和
- [0558] (b) 包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链, 其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。
- [0559] 64. 项63的分离的单克隆抗体, 其中所述重链修饰是取代。
- [0560] 65. 项64的分离的单克隆抗体, 其中所述重链取代包含选自下组的取代: Q1E, S30R, N32D, N32E, S33G, S37N, G44S, I53T, K55Y, S57K, S57R, K58M, N61G, N61T, D62I, D62R, D62Q, D62L, D62S, D62V, D62N, D62K, H103D, H103G, H107M, G109A和Y112D。
- [0561] 66. 项63的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含两个或多个取代。
- [0562] 67. 项66的分离的单克隆抗体, 其中所述重链包含选自下组的取代:
- [0563] (a) D62Q+H107M+Y112D;
- [0564] (b) D62Q+Y112D;
- [0565] (c) D62R+H107M+Y112D;
- [0566] (d) D62R+Y112D;
- [0567] (e) D62S+H107M+Y112D;
- [0568] (f) N32D+D62K+Y112D;
- [0569] (g) N32D+D62Q+H107M+Y112D;
- [0570] (h) N32D+D62Q+Y112D;
- [0571] (i) N32D+D62R+H103D;
- [0572] (j) N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;
- [0573] (k) N32D+D62R+H107M;
- [0574] (l) N32D+D62R+H107M+Y112D;
- [0575] (m) N32D+D62R+Y112D;

- [0576] (n) N32D+D62S+H107M+Y112D;
- [0577] (o) N32D+G44S+D62R+Y112D;
- [0578] (p) N32D+I53T+D62Q+Y112D;
- [0579] (q) N32D+I53T+D62R+Y112D;
- [0580] (r) N32D+K55Y+D62Q+Y112D;
- [0581] (s) N32D+K55Y+D62R+Y112D;
- [0582] (t) N32D+S37N+D62R+Y112D;
- [0583] (u) Q1E+N32D+D62R+Y112D;
- [0584] (v) Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D;
- [0585] (w) N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D
- [0586] (x) S30R+S57K;
- [0587] (y) N61G+D62V; 和
- [0588] (z) K58M+D62N。
- [0589] 68. 项63的分离的单克隆抗体,其中所述轻链修饰是取代。
- [0590] 69. 项68的分离的单克隆抗体,其中所述轻链取代包含选自下组的取代:D1S, I2Y, A13S, S21T, N26A, R28P, N29K, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, P54L, G56D, E80M, S89A, D91L, D91R, D91W, D91K, D92S, D92T, G93S, V94T, P95V, P95A, V96G, V96M和V96W。
- [0591] 70. 项63的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含两个或多个取代。
- [0592] 71. 项70的分离的单克隆抗体,其中所述轻链包含选自下组的取代:(a) A13S+Y48F+N51V+D91W;
- [0593] (b) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0594] (c) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0595] (d) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0596] (e) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0597] (f) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;
- [0598] (g) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0599] (h) D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;
- [0600] (i) D1S+Y48F+N51V+D91W;
- [0601] (j) D91L+V96W;
- [0602] (k) H33Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0603] (l) I2Y+Y48F+N51V+D91W;
- [0604] (m) N26A+Y48F+N51V+D91W;
- [0605] (n) N29K+Y48F+N51V+D91W;
- [0606] (o) N51V+D91K;
- [0607] (p) N51V+D91W;
- [0608] (q) R28P+Y48F+N51V+D91W;
- [0609] (r) S21T+Y48F+N51V+D91W;

- [0610] (s) Y48F+D91K;
- [0611] (t) Y48F+D91L+D92S+V96W;
- [0612] (u) Y48F+D91L+G93S+V96W;
- [0613] (v) Y48F+D91L+P95V+V96W;
- [0614] (w) Y48F+D91L+V94T+V96W;
- [0615] (x) Y48F+D91L+V96W;
- [0616] (y) Y48F+D91W;
- [0617] (z) Y48F+N51S+D91L+V96W;
- [0618] (aa) Y48F+N51V;
- [0619] (bb) Y48F+N51V+D91L;
- [0620] (cc) Y48F+N51V+D91L+V96W;
- [0621] (dd) Y48F+N51V+D91W;
- [0622] (ee) Y48F+N51V+D91W+D92S;
- [0623] (ff) Y48F+N51V+D91W+G93S;
- [0624] (gg) Y48F+N51V+D91W+P95V;
- [0625] (hh) Y48F+N51V+D91W+V94T;
- [0626] (ii) Y48F+N51V+E80M+D91W;
- [0627] (jj) Y48F+N51V+G56D+V96W;
- [0628] (kk) Y48F+N51V+S89A+D91W;
- [0629] (ll) Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A;
- [0630] (mm) Y48F+N51V+V96W;
- [0631] (nn) Y48F+N52G;
- [0632] (oo) Y48F+N52G+D91L+V96W;和
- [0633] (pp) Y48F+S89A+D91L+V96W。
- [0634] 72. 项63的分离的单克隆抗体,其中所述抗体选自下组: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, 分泌性IgA, IgD和IgE抗体。
- [0635] 73. 前述项中任一项的项的抗体,其中在存在所述抗体的情况中的血液凝固时间是缩短的。
- [0636] 74. 前述项中任一项的抗体,其中所述抗体具有升高的对TFPI的亲合力。
- [0637] 75. 前述项中任一项的抗体,其中所述抗体具有升高的对TFPI的阻断活性。
- [0638] 76. 一种药物组合物,其包含治疗有效量的项1-72中任一项的单克隆抗体和药学可接受载体。
- [0639] 77. 一种用于治疗遗传性或获得性凝固缺乏或缺陷的方法,包括对患者施用治疗有效量的项76的药物组合物。
- [0640] 78. 项77的方法,其中所述方法治疗血友病A,B或C。
- [0641] 79. 一种用于缩短出血时间的方法,包括对患者施用治疗有效量的项76的药物组合物。
- [0642] 80. 一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个

或多个氨基酸修饰。

[0643] 81. 一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链, 其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

[0644] 82. 一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的重链, 其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

[0645] 83. 一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子, 其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的轻链, 其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。

[0646] 84. 一种载体, 其包含项80, 81, 82或83的核酸分子。

[0647] 85. 一种宿主细胞, 其包含项84的载体。

[0648] 86. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的重链: SEQ ID NO:5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25和26。

[0649] 87. 一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体, 其中所述抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的轻链: SEQ ID NO:12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33和34。

[0650] 本发明还提供了以下内容:

[0651] 1. 一种结合人组织因子途径抑制剂(TFPI)的Kunitz 2域的分离的同种型IgG人单克隆抗体, 其中所述抗体包含重链和轻链, 和其中重链被包含于SEQ ID NO:1所显示的氨基酸序列, 和其中所述氨基酸序列包含增加针对TFPI的抗体的亲和力的对于SEQ ID NO:1的一个或多个氨基酸修饰。

[0652] 2. 项1的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰是在选自下组的位置处的取代: Q1, S31, G33, M34, S35, S50, S55, 和K99以及其组合。

[0653] 3. 项1的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰是选自下组的取代: Q1E, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I (M34I/M34L), M34K, S35L, S35D, S50A, S55A, S55G, S55R, K99V, 和K99L 以及其组合。

[0654] 4. 项1的分离的单克隆抗体, 其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代: Q1E, S31P, S31V, G33A, G33K, G33P, M34I (M34I/M34L), M34K, S35L, S35D, S50A, S55A, S55G, S55R, K99V, 和K99L, 以及其组合。

[0655] 5. 项1的人的单克隆抗体, 其中轻链包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列, 其中所述氨基酸序列包含针对TFPI的升高抗体亲和力的对于SEQ ID NO:2的一个或多个氨基酸修饰。

[0656] 6. 项5的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰是在选自下组的位置处的取代: D1, I2, N26, R28, A32, H33, Y48, Y49, N51, N52, G56, D91, P95和V96, 以及其组合。

[0657] 7. 项5的分离的单克隆抗体, 其中所述修饰是选自下组的取代: D1S, I2, N26A, R28P, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, G56D, D91L, D91R, D91W, D91K, P95V, P95A, V96G, V96M和V96W, 以及其组合。

[0658] 8. 项5的分离的单克隆抗体,其中所述单克隆抗体包含选自下组的两个或多个取代:D1S, I2, N26A, R28P, A32N, H33Y, Y48F, Y49R, N51S, N51V, N52G, G56D, D91L, D91R, D91W, D91K, V94T, P95V, P95A, V96G, V96M和V96W以及其组合。

[0659] 9. 分离的人单克隆IgG抗体,其特异性结合人组织因子途径抑制剂,其中抗体包括:

[0660] (a) 包含下述的人重链:

[0661] 具有FTFRSYGMS所示的氨基酸序列的CDR 1区,任选包含R30S或S35D或二者的取代;

[0662] 具有SIRGSSSSTYYADSVKG所示的氨基酸序列的CDR2区,任选包含S55R或S56G或二者的取代;

[0663] 具有KYRYWFDY所示的氨基酸序列的CDR3区,任选包含取代K99L;

[0664] (b) 包含下述的人轻链:

[0665] 具有SGDNLRNYAH所示的氨基酸序列的CDR1区,任选包含取代R28P或N29K;

[0666] 具有YYDNNRPS所示的氨基酸序列的CDR2区,任选包含至少一个选自下组的取代:Y48F和N51V以及其组合;

[0667] 具有QSWDDGVPV所示的氨基酸序列的CDR3区,任选包含取代S89A, D91W, D92S, G93S, 和V94T, 以及其组合。

[0668] 10. 药物组合物,其包含治疗有效量的项1-9中任一项所述的单克隆抗体和药理学可接受的载体。

附图说明

[0669] 图1描绘的柱状图显示了具有单个氨基酸取代的选择的2A8变体,其使用dPT测定法在人血友病A血浆中在缩短凝固时间上显示更多的效力。

[0670] 图2描绘的图显示了选择的单个氨基酸突变的抗TFPI抗体对抗因子VIII抗体诱导的人血友病血液的凝固时间的影响。

[0671] 图3描绘的图显示了与亲本4B7抗体相比且在更小程度上与2A8内的单个氨基酸取代相比,4B7-D62R在人抗体诱导的血友病A血液在缩短凝固时间上具有多得多的效力。

[0672] 图4描绘的两幅图显示了与对照小鼠IgG1 (CTX IgG1) 相比以剂量依赖性方式用亲本抗体2A8和具有多个氨基酸取代的2A8变体 (A200) 处理的血友病A小鼠的存活。

[0673] 图5描绘的图显示了2A8变体以剂量依赖性方式增强人血友病C (FXI缺乏的) 血浆中的凝固,并且其效果与重组FVIIa的效果相当。

具体实施方式

[0674] 定义

[0675] 如本文中所使用的,术语“组织因子途径抑制剂”或“TFPI”指由细胞天然表达的人TFPI的任何变体、同等型和物种同系物。在本发明的一个优选的实施方案中,本发明的抗体对TFPI的结合减少血液凝固时间。

[0676] 如本文中所使用的,“抗体”指整个抗体及其任何抗原结合片段(即“抗原结合部分”)或单链。该术语包括天然存在的或由正常的免疫球蛋白基因片段重组过程形成的全长

免疫球蛋白分子(例如IgG抗体),或免疫球蛋白分子中保留特异性结合活性的免疫学活性部分诸如抗体片段。不管结构,抗体片段与由全长抗体识别的相同抗原结合。例如,抗TFPI单克隆抗体片段结合TFPI的表位。抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体的术语“抗原结合部分”内涵盖的结合片段的例子包括(i) Fab片段,即一种由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 域构成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,即一种包含由铰链区处的二硫化物桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) Fd片段,其由 V_H 和 C_H1 域构成;(iv) Fv片段,其由抗体的单条臂的 V_L 和 V_H 域构成,(v) dAb片段(Ward等,(1989) Nature 341:544-546),其由 V_H 域构成;(vi) 分离的互补决定区(CDR);(vii) 微型抗体(minibody)、双抗体、三抗体、四抗体、和kappa体(见例如Ill等,Protein Eng 1997;10:949-57);(viii) 骆驼IgG;和(ix) IgNAR。此外,虽然Fv片段的两个域,即 V_L 和 V_H 是由不同基因编码的,但是可以使用重组方法通过合成的接头来连接它们,所述合成的接头使它们能够作为单条蛋白质链生成,其中 V_L 和 V_H 区配对以形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等(1988) Science 242:423-426;及Huston等(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA85:5879-5883)。此类单链抗体也意图涵盖在抗体的术语“抗原结合部分”内。使用对于本领域技术人员已知的常规技术来获得这些抗体片段,并以与完整的抗体相同的方式来对片段分析功效。

[0677] 此外,涵盖的是,抗体模拟物中可以涵盖抗原结合片段。如本文中所使用的,术语“抗体模拟物”或“模拟物”意指展现出与抗体类似的结合,但是是更小的备选抗体或非抗体蛋白质的蛋白质。此类抗体模拟物可以包含在支架中。术语“支架”指用于以改编的功能和特征工程化改造新产物的多肽平台。

[0678] 如本文中所使用的,术语“抑制结合”和“阻断结合”(例如,指抑制/阻断TFPI配体对TFPI的结合)可互换使用,涵盖部分和完全抑制或阻断两者。抑制和阻断还意图包括与不与抗TFPI抗体接触的TFPI相比在与抗TFPI抗体接触时TFPI对生理学底物的结合亲和力的任何可测量降低,例如阻断TFPI与因子Xa的相互作用或者阻断TFPI-因子Xa复合物与组织因子、因子VIIa或组织因子/因子VIIa的复合物的相互作用达至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%。

[0679] 如本文中所使用的,术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指单一分子组成的抗体分子的制备物。单克隆抗体组合物展示对特定表位的单一结合特异性和亲和力。因而,术语“人单克隆抗体”指具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变区和恒定区的展示单一结合特异性的抗体。本发明的人抗体可以包括不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定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0680] 如本文中所使用的,“分离的抗体”意图指基本上没有具有不同抗原性特异性的其它抗体的抗体(例如结合TFPI的分离的抗体基本上没有结合与TFPI不同的抗原的抗体)。然而,结合人TFPI的表位、同等型或变体的分离的抗体可以具有与其它相关抗原(例如来自其它物种的(例如TFPI物种同系物))的交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上没有其它细胞材料和/或化学物。

[0681] 如本文中所使用的,“特异性结合”指抗体对预定抗原的结合。典型地,抗体以至少约 $10^5 M^{-1}$ 的亲和力结合,而且以比其结合与预定抗原或紧密相关抗原不同的无关抗原(例如BSA、酪蛋白)的亲和力高(例如大至少两倍)的亲和力结合预定抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异性的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0682] 如本文中所使用的,关于IgG抗体的术语“高亲和力”指至少约 10^7M^{-1} 、在一些实施方案中至少约 10^8M^{-1} 、在一些实施方案中至少约 10^9M^{-1} 、 10^{10}M^{-1} 、 10^{11}M^{-1} 或更大,例如多至 10^{13}M^{-1} 或更大的结合亲和力。然而,对于其它抗体同种型,“高亲和力”结合可以有所变化。例如,IgM同种型的“高亲和力”结合指至少约 $1.0 \times 10^7\text{M}^{-1}$ 的结合亲和力。如本文中所使用的,“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体种类(例如IgM或IgG1)。

[0683] “互补决定区”或“CDR”指抗体分子的重链可变区或轻链可变区内形成与结合的抗原的三维结构互补的N端抗原结合表面的三个高变区之一。从重链或轻链的N端出发,这些互补决定区分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。CDR牵涉抗原-抗体结合,而且CDR3包含对于抗原-抗体结合特异性的独特区域。因此,抗原结合位点可以包括6个CDR,其包含来自各个重链和轻链V区的CDR区。

[0684] 如本文中所使用的,“保守取代”指牵涉用一种或多种氨基酸取代具有相似生物化学特性的氨基酸且不导致多肽的生物学或生物化学功能损失的多肽修饰。“保守氨基酸取代”指用具有相似侧链的氨基酸残基替换氨基酸残基的。本领域中已经限定了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、beta-分支的侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。涵盖的是,本发明的抗体可以具有保守的氨基酸取代,而且仍保留活性。

[0685] 对于核酸和多肽,术语“实质的同源性”指明在最佳比对和比较时两个核酸或两个多肽或其指定序列在至少约80%的核苷酸或氨基酸,通常至少约85%,优选地约90%、91%、92%、93%、94%、或95%,更优选地至少约96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、或99.5%的核苷酸或氨基酸中是相同的,具有适当的核苷酸或氨基酸插入或缺失。或者,区段会在选择性杂交条件下与该链的互补物杂交时存在核酸的实质同源性。本发明包括与本文中所列举的特定核酸序列和氨基酸序列具有实质同源性的核酸序列和多肽序列。

[0686] 两个序列间的百分比同一性是序列共享的相同位置的数目的函数(即,%同源性=相同位置的数目/位置总数 \times 100),其考虑缺口的数目和每个缺口的长度,它们需要被引入以进行两个序列的最佳比对。可以使用数学算法(诸如不限于VectorNTI™(Invitrogen Corp.,Carlsbad,CA)的AlignX™模块)来实现两个序列间的序列比较和百分比同一性测定。对于AlignX™,多重比对的缺省参数是:缺口开放罚分:10;缺口延伸罚分:0.05;缺口分开罚分范围:8;比对延迟的%同一性:40。(进一步的详情参见<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>)。

[0687] 可以使用CLUSTALW计算机程序(Thompson等,Nucleic Acids Research,1994,2(22):4673-4680)来测定用于测定询问序列(本发明的序列)与主题序列之间的最好总体匹配的另一种方法(也称为全局序列比对),所述CLUSTALW计算机程序基于Higgins等(Computer Applications in the Biosciences(CABIOS),1992,8(2):189-191)的算法。在

序列比对中,询问和主题序列都是DNA序列。所述全局序列比对的结果按百分比同一性计。DNA序列的CLUSTALW比对中经由成对比对来计算百分比同一性所使用的优选参数是:矩阵=IUB,k-元组=1,顶部对角线的数目=5,缺口罚分=3,缺口开放罚分=10,缺口延伸罚分=0.1。对于多重比对,优选下列CLUSTALW参数:缺口开放罚分=10,缺口延伸参数=0.05;缺口分开罚分范围=8;比对延迟的%同一性=40。

[0688] 核酸可以存在于全细胞中、细胞溶胞物中,或者以部分纯化的或基本上纯的形式存在。核酸在纯化得离开与其在天然环境中正常相关的其它细胞成分时是“分离的”或“给予基本上纯的”。为了分离核酸,可以使用标准的技术诸如下列各项:碱/SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域中公知的其它技术。

[0689] 在高亲和力和功能活性方面优化的单克隆抗体

[0690] 几种抗TFPI抗体在先前的研究中鉴定并且记载于2009年8月4日提交的PCT申请No. PCT/US2009/052702,在此为了所有目的通过提及而将其收录。这些抗TFPI抗体可以例如通过改善其对TFPI的亲合力和阻断活性来进一步优化。可以例如通过利用对抗体的互补决定区(CDR)或与CDR紧密接近的残基,即与CDR相邻的约3或4个残基的位点饱和诱变实施此类优化。

[0691] 还提供了对TFPI具有升高或高的亲和力的单克隆抗体。在一些实施方案中,抗TFPI抗体具有至少约 $10^7 M^{-1}$,在一些实施方案中,至少约 $10^8 M^{-1}$,在一些实施方案中,至少约 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 或更大,例如多至 $10^{13} M^{-1}$ 或更大的结合亲和力。

[0692] 利用两种抗TFPI亲本抗体(本文中称为2A8和4B7)的CDR中及附近的位点饱和诱变来对抗体优化亲和力和功能活性。还涵盖的是,可以对先前PCT/US2009/052702中描述的任何抗体实施相同优化。

[0693] 在一些实施方案中,可以对抗TFPI抗体完成CDR的位点饱和诱变。对于2A8,SEQ ID NO:1中显示的重链中的CDR对应于残基FTFRSYGMS(残基27至35)、SIRGSSSSTYYADSVKG(残基50至66)和KYRYWFDY(残基99至106)。对于SEQ ID NO:2中显示的2A8轻链,CDR对应于残基SGDNLRNYYAH(残基23至33)、YYDNNRPS(残基48至55)和QSWDDGVPV(残基88至96)。对于4B7,SEQ ID NO:3中显示的重链中的CDR对应于残基DSVSSNSAAWS(残基27至37)、IIYKRKQWYNDYAVSVKS(残基52至70)和WHSDKHGWFYDY(残基102至112)。对于SEQ ID NO:4中显示的4B7轻链,CDR对应于SEQ ID NO:4的残基RSSQSLVFSQGNTYLN(残基24至39)、KGSNRAS(残基55至61)和QQYDSYPLT(残基94至102)。可以在6种CDR之任一中单独或组合做出修饰。此外,可以在单一CDR中做出两个或多个修饰。在其它实施方案中,也可以极其接近CDR(例如在每个CDR的任一侧的约3或4个残基)引入修饰。

[0694] 简言之,引入并分析单个和/或多个(single and/or multiple)氨基酸修饰以优化,例如改善亲本抗体2A8和4B7的亲和力。首先,将单个氨基酸修饰引入每个抗体的6个CDR中或CDR附近,接着分析TFPI结合特性。选择对TFPI的结合信号升高的修饰与与一个或多个其它修饰组合,并分析结合信号的进一步升高。在每次分析后,使用选定的抗体变体来测量其对TFPI的亲合力和在阻断TFPI活性和缩短凝固时间方面的活性。如此,在一些实施方案中,提供了与未修饰的亲本抗体相比对TFPI具有升高的亲和力的结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体。此外,在一些实施方案中,提供了与未修饰的亲本抗体相比具有升高对TFPI的阻断活性的结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体。在一些实施方案

中,提供了与未修饰的亲本抗体相比具有缩短的凝固时间的结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体。

[0695] 在一些实施方案中,引入其它氨基酸修饰以降低与种系序列的趋异。在其它实施方案中,引入氨基酸修饰以便于大规模生产方法的抗体生成。

[0696] 抗体可以是物种特异性的或者可以与多种物种起交叉反应。在一些实施方案中,抗体可以与人、小鼠、大鼠、兔、豚鼠、猴、猪、犬、猫或其它哺乳动物物种的TFPI特异性起反应或起交叉反应。

[0697] 抗体可以是各类抗体之任一种的,诸如但不限于IgG1,IgG2,IgG3,IgG4,IgM,IgA1,IgA2,分泌性IgA,IgD和IgE抗体。

[0698] 在一个实施方案中,提供了针对人组织因子途径抑制剂的分离的完全人的单克隆抗体。

[0699] 在另一个实施方案中,提供了针对人组织因子途径抑制剂的Kunitz域2的分离的完全人的单克隆抗体。

[0700] 2A8变体

[0701] 因而,在一些实施方案中,提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,2A8的重链的修饰是取代、插入或缺失。

[0702] 在一些实施方案中,取代位于2A8的重链的CDR中。在其它实施方案中,取代位于2A8的重链的CDR外部。

[0703] 在一些实施方案中,2A8的重链的取代在选自下组的位置处:S31,G33,S35,I51,S54,S55,K99和F104。在一些实施方案中,2A8的重链的取代还可以包括选自下组的位置:Q1,R30,M34,S50,R52和S56。例如,取代可以选自:Q1E,R30S,S31P,S31V,G33A,G33K,G33P,M34I,M34K,S35L,S35D,S50A,I51D,I51E,R52S,S54F,S54D,S55A,S55G,S55R,S56G,K99V,K99L和F104Y。此外,在一些实施方案中,抗体可以包含选自下述的两个或多个取代:Q1E,R30S,S31P,S31V,G33A,G33K,G33P,M34I,M34K,S35L,S35D,S50A,I51D,I51E,R52S,S54F,S54D,S55A,S55G,S55R,S56G,K99V,K99L和F104Y。

[0704] 在一些实施方案中,2A8的重链相对于SEQ ID NO:1具有下列取代:S31V+I51D+S54F+K99V;G33P+S35D+S54F+K99L;S35D+I51D+S55R+K99V;S35L+S54F+K99V;S31V+G33P+S35D;S35D+I51D+K99L;S31V+I51D+S55R+K99L;S31V+S35D+I51D+K99V;G33P+I51D+S54F;I51D+S54F+K99L;S35D+K99L;S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;S35D+I51E+S55R+K99L;S31V+K99V;S31V+I51E+S55R+K99V;S35D+S55R+K99L;S31V+S54F+K99L;S31V+I51D+S55R+K99V;S31V+S35D+S55R;S31V+S35D;S31V+I51D+S55R;S35D+S54F+S55R+K99L;S31V+S35D+S54FS31V+S35L+I51D+S54F+K99V;和S31V+S35L+I51E+S54F+K99V。

[0705] 在一些实施方案中,2A8的重链相对于SEQ ID NO:1具有下列取代:G33A+S35D+S55R+K99L;G33P+I51D+S54F;G33P+S35D+S54F+K99L;I51D+S54F+K99L;M34I+S35D+S55R+K99L;M34K+S35D+S55R+K99L;Q1E+R30S+S35D+S55G+S56G+K99L;

[0706] Q1E+R30S+S35D+S55R+S56G+K99L;

[0707] Q1E+S31V+S50A+I51D+S55R+S56G+K99V;Q1E+S35D+S55R+K99L;R30S+S31V+I51D+

S55R+K99V;R30S+S35D+S55R+K99L;S31V+G33A+I51D+S55R+K99V;S31V+G33P+I51D+S54F+K99V;

[0708] S31V+G33P+S35D;S31V+I51D+R52S+S55R+K99V;S31V+I51D+S54F+K99V;

[0709] S31V+I51D+S55R;S31V+I51D+S55R+K99L;S31V+I51D+S55R+K99V;S31V+I51D+S55R+S56G+K99V;S31V+I51E+S55R+K99V;S31V+K99V;S31V+S35D;

[0710] S31V+S35D+I51D+K99V;S31V+S35D+S54F;S31V+S35D+S55R;S31V+S35L+I51D+S54F+K99V;S31V+S35L+I51E+S54F+K99V;S31V+S50A+I51D+S55R+K99V;S31V+S54F+K99L;S35D+I51D+K99L;S35D+I51D+S55R+K99V;S35D+I51E+S55R+K99L;S35D+K99L;S35D+R52S+K99L;

[0711] S35D+R52S+S55R+K99L;S35D+S50A+K99L;S35D+S50A+S55R+K99L;S35D+S54F+S55R+K99L;S35D+S55G+K99L;S35D+S55R+K99L;S35D+S55R+S56G+K99L;S35D+S56G+K99L;和S35L+S54F+K99V。

[0712] 在一些实施方案中,2A8的重链具有一个或多个缺失。在一些实施方案中,缺失位于2A8的重链的CDR中。在其它实施方案中,缺失位于2A8的重链的CDR外部。在一些实施方案中,例如,缺失在选自下组的位置处:I51,S56和S57。

[0713] 此外,提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。在一些实施方案中,修饰是取代、插入或缺失。

[0714] 在一些实施方案中,取代位于2A8的轻链的CDR中。在其它实施方案中,取代位于2A8的轻链的CDR外部。

[0715] 在一些实施方案中,2A8的轻链的取代在选自下组的位置处:A32,Y48,N51,N52,P54,D91,D92和V96。在一些实施方案中,2A8的轻链的取代还可以包括选自下组的位置:D1,I2,A13,S21,N26,R28,N29,H33,Y49,G56,E80,S89,G93,V94和P95。例如,取代可以选自:D1S,I2Y,A13S,S21T,N26A,R28P,N29K,A32N,H33Y,Y48F,Y49R,N51S,N51V,N52G,P54L,G56D,E80M,S89A,D91L,D91R,D91W,D91K,D92S,D92T,G93S,V94T,P95V,P95A,V96G,V96M和V96W。此外,在一些实施方案中,抗体可以包含选自下组的两个或多个:D1S,I2Y,A13S,S21T,N26A,R28P,N29K,A32N,H33Y,Y48F,Y49R,N51S,N51V,N52G,P54L,G56D,E80M,S89A,D91L,D91R,D91W,D91K,D92S,D92T,G93S,V94T,P95V,P95A,V96G,V96M和V96W。

[0716] 在一些实施方案中,2A8的轻链相对于SEQ ID NO:2具有下列取代:Y48F+N51V;Y48F+N52G;Y48F+D91K;Y48F+D91L+V96W;Y48F+D91W;Y48F+N52G+D91L+V96W;Y48F+N51V+V96W;D91L+V96W;Y48F+N51V+D91W;Y48F+N51V+D91L+V96W;N51V+D91W;Y48F+N51V+G56D+V96W;Y48F+N51V+D91L;和N51V+D91K。

[0717] 在一些实施方案中,2A8的轻链相对于SEQ ID NO:2具有下列取代:A13S+Y48F+N51V+D91W;

[0718] D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;

[0719] D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+D91W;D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+N51V+E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;

[0720] D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+N29K+Y48F+Y49R+N51S+E80M+D91L+D92S+V94T+V96W;D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+E80M+D91W;D1S+I2Y+A13S+S21T+R28P+Y48F+N51V+

E80M+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T;D1S+Y48F+N51V+D91W;D91L+V96W;H33Y+Y48F+N51V+D91W;I2Y+Y48F+N51V+D91W;N26A+Y48F+N51V+D91W;N29K+Y48F+N51V+D91W;N51V+D91K;N51V+D91W;R28P+Y48F+N51V+D91W;S21T+Y48F+N51V+D91W;Y48F+D91K;Y48F+D91L+D92S+V96W;Y48F+D91L+G93S+V96W;Y48F+D91L+P95V+V96W;Y48F+D91L+V94T+V96W;Y48F+D91L+V96W;Y48F+D91W;Y48F+N51S+D91L+V96W;Y48F+N51V;Y48F+N51V+D91L;Y48F+N51V+D91L+V96W;Y48F+N51V+D91W;Y48F+N51V+D91W+D92S;Y48F+N51V+D91W+G93S;Y48F+N51V+D91W+P95V;Y48F+N51V+D91W+V94T;Y48F+N51V+E80M+D91W;Y48F+N51V+G56D+V96W;Y48F+N51V+S89A+D91W;Y48F+N51V+S89A+D91W+D92S+G93S+V94T+P95A;Y48F+N51V+V96W;Y48F+N52G;Y48F+N52G+D91L+V96W;和Y48F+S89A+D91L+V96W。

[0721] 还提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:a)包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰;和b)包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文提供了可以做出修饰的例子。

[0722] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的重链:SEQ ID NO:5,6,7,8,9,10和11。

[0723] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的轻链:SEQ ID NO:12,13,14,15,16,17和18。

[0724] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含选自下组的氨基酸序列的重链:SEQ ID NO:5,6,7,8,9,10和11;和b)包含选自下组的氨基酸序列的轻链:SEQ ID NO:12,13,14,15,16,17和18。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:5中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:12中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:6中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:13中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:7中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:14中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:8中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:15中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:9中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:16中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:10中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:17中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:11中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:18中显示的氨基酸序列的轻链。

[0725] 4B7变体

[0726] 还提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:3中显示且包含一个或多个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,4B7的重链的修饰是取代、插入或缺失。

[0727] 在一些实施方案中,取代位于4B7的重链的CDR中。在其它实施方案中,取代位于

4B7的重链的CDR外部。

[0728] 在一些实施方案中,4B7的重链的取代在选自下组的位置处:S30,N32,S57,K58,N61,D62,H103,H107,G109和Y112。在一些实施方案中,4B7的重链的取代还可以包括选自下组的位置:Q1,S37,G44,I53和K55。另外,取代可以选自Q1E,S30R,N32D,N32E,S33G,S37N,G44S,I53T,K55Y,S57K,S57R,K58M,N61G,N61T,D62I,D62R,D62Q,D62L,D62S,D62V,D62N,D62K,H103D,H103G,H107M,G109A和Y112D。此外,在一些实施方案中,抗体可以包含选自下组的两个或多个取代:Q1E,S30R,N32D,N32E,S33G,S37N,G44S,I53T,K55Y,S57K,S57R,K58M,N61G,N61T,D62I,D62R,D62Q,D62L,D62S,D62V,D62N,D62K,H103D,H103G,H107M,G109A和Y112D。

[0729] 在一些实施方案中,4B7的重链相对于SEQ ID NO:3具有下列取代:

[0730] N32D+D62Q+H107M+Y112D;N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;N32D+D62R+H107M+Y112D;N32D+D62R+Y112D;D62Q+Y112D;D62R+Y112D;D62R+H107M+Y112D;N32D+D62Q+Y112D;N32D+D62R+H107M;N32D+D62S+H107M+Y112D;D62Q+H107M+Y112D;N32D+D62R+H103D;D62S+H107M+Y112D;S30R+S57K;N61G+D62V;和K58M+D62N。在一些实施方案中,4B7的重链相对于SEQ ID NO:3具有下列取代:D62Q+H107M+Y112D;D62Q+Y112D;D62R+H107M+Y112D;D62R+Y112D;D62S+H107M+Y112D;N32D+D62K+Y112D;N32D+D62Q+H107M+Y112D;N32D+D62Q+Y112D;N32D+D62R+H103D;N32D+D62R+H103D+H107M+Y112D;N32D+D62R+H107M;N32D+D62R+H107M+Y112D;N32D+D62R+Y112D;N32D+D62S+H107M+Y112D;N32D+G44S+D62R+Y112D;N32D+I53T+D62Q+Y112D;N32D+I53T+D62R+Y112D;N32D+K55Y+D62Q+Y112D;N32D+K55Y+D62R+Y112D;N32D+S37N+D62R+Y112D;Q1E+N32D+D62R+Y112D;Q1E+N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D;N32D+G44S+K55Y+D62R+Y112D;S30R+S57K;N61G+D62V;和K58M+D62N。

[0731] 此外,提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:4中显示且包含一个或多个氨基酸修饰的氨基酸序列。在一些实施方案中,4B7的轻链的修饰选自取代、插入或缺失。

[0732] 在一些实施方案中,取代位于4B7的轻链的CDR中。在其它实施方案中,取代位于4B7的轻链的CDR外部。

[0733] 在一些实施方案中,4B7的轻链的CDR在选自下组的位置处:F31,S32,D33,N35,Y37,Y54,G56,S57,S61和D97。在一些实施方案中,4B7的轻链的CDR还可以包括选自下组的位置:M4,V30,T36,N39,L42,K44,Q50,L51,K55,A60和S98。例如,取代可以选自M4I,M4L,V30L,F31I,F31M,F31Y,F31H,S32L,S32R,S32Y,D33F,D33R,N35I,N35L,N35T,N35V,T36N,Y37F,N39D,L42Q,K44R,Q50R,L51R,Y54F,K55L,G56D,G56A,G56V,S57Y,A60D,S61C,D97M,D97T和S98H。此外,在一些实施方案中,抗体可以包含选自下组的两个或多个取代:M4I,M4L,V30L,F31I,F31M,F31Y,S32L,S32R,S32Y,D33F,D33R,N35I,N35L,N35T,N35V,T36N,Y37F,N39D,L42Q,K44R,Q50R,Y54F,K55L,G56D,G56A,G56V,S57Y,A60D,S61C,D97M,D97T和S98H。

[0734] 在一些实施方案中,4B7的轻链相对于SEQ ID NO:4具有下列取代:S32R+N35T;S32R+N35T+D97T;S32R+D33F+N35I;S32R+D33F+N35I+D97T;S32R+D33F+N35T;S32R+D33F;S32R+D33R+N35I;S32R+D33R+N35I+D97T;S32R+D33R;S32R+D33R+N35T;N35T+D97T;D33F+N35I;D33F+N35I+D97T;D33F+N35T+Y37F;D33R+N35I;D33R+N35I+D97T;D33R+N35T;F31I+

S32R+N35I+D97T;F31I+S32R+D33F+N35I+D97T;F31I+S32R+D33F+N35T;F31I+S32R+D33R+N35I+D97T;F31I+N35I;F31I+D33F+N35I;F31I+D33F+N35I+D97T;F31I+D33R+N35I;F31I+D33R;F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;F31M+S32R+D33F+N35I;F31M+S32R+D33F+N35I+D97T;F31M+S32R+D33F+D97T;F31M+S32R+D33R+N35I;F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;F31M+S32R+D33R;F31M+S32R+D33R+N35T;F31M+D33F+N35I;F31M+D33F;F31M+D33F+N35T;F31M+D33R+N35I;F31M+D33R;S32R+N35I;F31M+D33F+N35T+Y37F;N35V+G56D;N35L+G56A;和D33F+Y54F。

[0735] 在一些实施方案中,4B7的轻链相对于SEQ ID NO:4具有下列取代:D33F+N35I;D33F+N35I+D97T;D33F+N35T+Y37F;D33R+N35I;D33R+N35I+D97T;D33R+N35T;F31H+S32R+D33F+N35I+D97T;F31I+D33F+N35I;F31I+D33F+N35I+D97T;F31I+D33F+N35I+K44R;F31I+D33F+N35I+L42Q;F31I+D33F+N35I+S98H;F31I+D33F+N35I+T36N;F31I+D33R;F31I+D33R+N35I;F31I+N35I;F31I+S32R+D33F+N35I+D97T;F31I+S32R+D33F+N35T;F31I+S32R+D33R+N35I+D97T;F31I+S32R+N35I+D97T;F31M+D33F;F31M+D33F+N35I;F31M+D33F+N35T;F31M+D33F+N35T+Y37F;F31M+D33R;F31M+D33R+N35I;F31M+S32L+D33R+N35I+D97T;F31M+S32R+D33F+D97T;F31M+S32R+D33F+N35I;F31M+S32R+D33F+N35I+D97T;F31M+S32R+D33R;F31M+S32R+D33R+N35I;F31M+S32R+D33R+N35I+D97T;F31M+S32R+D33R+N35T;F31Y+S32R+D33F+N35I+D97T;M4I+S32R+D33F+N35I+D97T;M4L+S32R+D33F+N35I+D97T;N35T+D97T;S32R+D33F;S32R+D33F+N35I;S32R+D33F+N35I+A60D+D97T;S32R+D33F+N35I+D97T;S32R+D33F+N35I+D97T+S98H;S32R+D33F+N35I+G56V+D97T;S32R+D33F+N35I+K44R+D97T;S32R+D33F+N35I+K55L+D97T;S32R+D33F+N35I+L42Q+D97T;S32R+D33F+N35I+L51R+D97T;S32R+D33F+N35I+N39D+D97T;S32R+D33F+N35I+Q50R+D97T;S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;S32R+D33F+N35T;S32R+D33R;S32R+D33R+N35I;S32R+D33R+N35I+D97T;S32R+D33R+N35T;S32R+N35I;S32R+N35T;S32R+N35T+D97T;V30L+F31I+D33F+N35I;V30L+S32R+D33F+N35I+D97T;V30L+S32R+D33F+N35I+T36N+D97T;V30L+S32R+N35I+T36N;N35V+G56D;N35L+G56A;和D33F+Y54F。

[0736] 还提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:a)包含SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰;和b)包含SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文提供了可以做出的修饰的例子。

[0737] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的重链:SEQ ID NO:19,20,21,22,23,24,25和26。

[0738] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含含有选自下组的氨基酸序列的轻链:SEQ ID NO:27,28,29,30,31,32,33和34。

[0739] 在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含选自下组的氨基酸序列的重链:SEQ ID NO:19,20,21,22,23,24,25和26;和b)包含选自下组的氨基酸序列的轻链:SEQ ID NO:27,28,29,30,31,32,33和34。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:19中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:27中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:20中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:28中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:21中显示的氨基酸序列

的重链;和b)包含SEQ ID NO:29中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:22中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:30中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:23中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:31中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:24中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:32中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:25中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:33中显示的氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体包含:a)包含SEQ ID NO:26中显示的氨基酸序列的重链;和b)包含SEQ ID NO:34中显示的氨基酸序列的轻链。

[0740] 2A8/4B7变体组合

[0741] 还涵盖的是,结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体可以包含2A8和4B7的重和轻链的组合。

[0742] 因而,提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:a)包含SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的2A8重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰;和b)包含SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的4B7轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文提供了可以做出的修饰的例子。

[0743] 还提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:a)包含SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的4B7重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰;和b)包含SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的2A8轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文提供了可以做出的修饰的例子。

[0744] 在一些实施方案中,提供了一种结合人组织因子途径抑制剂的分离的单克隆抗体,其中所述抗体包含:a)包含选自下组的氨基酸序列的重链:SEQ ID NO:5,6,7,8,9,10,11,19,20,21,22,23,24,25和26;和b)包含选自下组的氨基酸序列的轻链:SEQ ID NO:12,13,14,15,16,17,18,27,28,29,30,31,32,33和34。

[0745] 核酸、载体和宿主细胞

[0746] 还提供了编码上文所描述的任何单克隆抗体的分离的核酸分子。

[0747] 如此,提供了一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:1中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文描述了此类修饰的例子。

[0748] 还提供了一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:2中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文描述了此类修饰的例子。

[0749] 还提供了一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:3中显示的氨基酸序列的重链,其中所述重链氨基酸序列包含一个或多个氨基酸修饰。上文描述了此类修饰的例子。

[0750] 还提供了一种编码结合人组织因子途径抑制剂的抗体的分离的核酸分子,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:4中显示的氨基酸序列的轻链,其中所述轻链氨基酸序列包含

一个或多个氨基酸修饰。上文描述了此类修饰的例子。

[0751] 此外,还提供了包含编码上文所描述的任何单克隆抗体的分离的核酸分子的载体和包含此类载体的宿主细胞。

[0752] 制备针对TFPI的抗体的方法

[0753] 可以通过在宿主细胞中表达编码依照本发明的实施方案的单克隆抗体的可变区的核苷酸序列来重组生成单克隆抗体。借助于表达载体,可以将含有所述核苷酸序列的核酸在适合于生成的宿主细胞中转染并表达。因而,还提供了一种用于生成与人TFPI结合的单克隆抗体的方法,包括:

[0754] (a) 将编码本发明的单克隆抗体的核酸分子转染入宿主细胞中,

[0755] (b) 培养所述宿主细胞以便在宿主细胞中表达所述单克隆抗体,和任选地(c) 分离并纯化所生成的单克隆抗体,其中所述核酸分子包含编码本发明的单克隆抗体的核苷酸序列。

[0756] 在一个例子中,为了表达抗体或其抗体片段,将通过标准的分子生物学技术获得的编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体中以使基因与转录和翻译控制序列可操作连接。在此背景中,术语“可操作连接”意图指将抗体基因连接入载体中以使载体内的转录和翻译控制序列服务其预期的调节抗体基因转录和翻译的功能。表达载体和表达控制序列选择为与所使用的表达宿主细胞相容。可以将抗体轻链基因和抗体重链基因插入分开的载体中,或者更典型地,将这两种基因都插入同一表达载体中。通过标准的方法来将抗体基因插入表达载体中(例如,连接抗体基因片段和载体上的互补的限制性位点,或者若没有限制性位点存在,则为平端连接)。可以使用本文中所描述的抗体的轻链和重链可变区来创建任何抗体同种型的全长抗体基因,其通过将它们插入已经编码想要的同种型的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中以使V_H区段与载体内的C_H区段可操作连接并使V_L区段与载体内的C_L区段可操作连接来实现。另外/或者,重组表达载体可以编码促进抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可以将抗体链基因克隆入载体中以使信号肽以符合读码框方式与抗体链基因的氨基末端连接。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽或异源信号肽(即来自非免疫球蛋白蛋白质的信号肽)。

[0757] 在抗体链编码基因外,本发明的重组表达载体携带调节序列,其在宿主细胞中控制抗体链基因的表达。术语“调节序列”意图包括启动子、增强子和其它表达控制元件(例如多聚腺苷酸化信号),其控制抗体链基因的转录或翻译。此类调节序列记载于例如Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。本领域技术人员会领会的是,表达载体的设计(包括调节序列的选择)可以取决于诸如要转化的宿主细胞的选择、想要的蛋白质表达水平等因素。供哺乳动物宿主细胞表达用的调节序列的例子包括指导哺乳动物细胞中高水平的蛋白质表达的病毒元件,诸如巨细胞病毒(CMV)、猿病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤衍生的启动子和/增强子。或者,可以使用非病毒调节序列,诸如泛素启动子或β-珠蛋白启动子。

[0758] 在抗体链基因和调节序列外,重组表达载体可以携带别的序列,诸如调节载体在宿主细胞中复制的序列(例如复制起点)和选择标志基因。选择标志基因促进已经导入载体的宿主细胞的选择(参见例如均为Axel等的美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,

017)。例如,典型地,选择标志基因对已经导入载体的宿主细胞赋予对药物诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。选择标志基因的例子包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于通过甲氨蝶呤选择/扩增在dhfr-宿主细胞中使用)和neo基因(用于G418选择)。

[0759] 对于轻链和重链的表达,通过标准的技术将编码重链和轻链的表达载体转染入宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意图涵盖极其多种通常用于将外源DNA导入原核或真核宿主细胞中的技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖苷转染等。虽然理论上有可能在原核或真核宿主细胞中表达本发明的抗体,但是抗体在真核细胞,且最优选地哺乳动物宿主细胞中的表达是最优选的,这是因为此类真核细胞,且特别地哺乳动物细胞比原核细胞更有可能装配并分泌正确折叠且有免疫学活性的抗体。

[0760] 用于表达重组抗体的哺乳动物宿主细胞的例子包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括与DHFR选择标志(例如如记载于R. J. Kaufman和P. A. Sharp(1982) Mol. Biol. 159:601-621的)一起使用的dhfr-CHO细胞,其记载于Urlaub和Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、HKB11细胞和SP2细胞。在将编码抗体基因的重组表达载体导入哺乳动物宿主细胞中时,通过培养宿主细胞达足以容许抗体在宿主细胞中表达或将抗体分泌入培养宿主细胞的培养基中的一段时间来生成抗体。可以使用标准的蛋白质纯化方法诸如超滤、大小排阻层析、离子交换层析和离心来从培养基回收抗体。

[0761] 部分抗体序列表达完整抗体的用途

[0762] 抗体主要经由位于6个重链和轻链CDR的氨基酸残基与靶抗原相互作用。出于此原因,CDR内的氨基酸序列比CDR外部的序列在各抗体间更加多种多样。因为CDR序列负责大多数抗体-抗原相互作用,所以有可能表达模拟特定天然存在抗体的特性的重组抗体,其通过构建包含嫁接到来自具有不同特性的不同抗体的框架序列的来自特定天然存在抗体的CDR序列的表达载体来实现(参见例如Riechmann, L. 等,1998, Nature 332:323-327; Jones, P. 等,1986, Nature 321:522-525; 及Queen, C. 等,1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033)。此类框架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库获得。这些种系序列会与成熟的抗体基因序列不同,因为它们不会包括完全装配的可变基因,其在B细胞成熟过程中通过V(D)J连接而形成。获得特定抗体的整个DNA序列以再创建具有与初始抗体的那些结合特性相似的结合特性的完整重组抗体是不必要的(参见WO 99/45962)。跨越CDR区的部分重链和轻链序列对于此目的通常是足够的。使用部分序列来确定哪些种系可变和连接基因区段促成重组的抗体可变基因。然后,使用种系序列来填充可变区的缺少部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟过程中被切割,而且不促成最终抗体的特性。出于此原因,对表达构建体使用相应的种系前导序列是必要的。为了添加缺少的序列,可以通过连接或PCR扩增来组合克隆的cDNA序列与合成的寡核苷酸。或者,整个可变区可以合成为一套短的、重叠的寡核苷酸,并通过PCR扩增来组合以创建完全合成的可变区克隆。此方法具有某些优点,诸如消除或包含特定的限制性位点,或优化特定的密码子。

[0763] 使用重链和轻链转录物的核苷酸序列来设计重叠的一组合成的寡核苷酸,以创建与天然序列具有相同的氨基酸编码能力的合成的V序列。合成的重链和轻链序列可以与天然序列不同。例如,中断重复核苷酸碱基串以便于寡核苷酸合成和PCR扩增;依照Kozak的规则(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)来掺入最佳的翻译起始位点;及在翻译起始位点上游或下游工程化改造限制位点。

[0764] 对于重链和轻链可变区两者,近似地在相应的非编码寡核苷酸的中点将经优化的编码和相应的非编码链序列分解为30-50个核苷酸的部分。如此,对于每条链,可以将寡核苷酸装配成跨越150-400个核苷酸的区段的重叠双链组。然后,使用集合作为模板来生成150-400个核苷酸的PCR扩增产物。典型地,会将单一可变区寡核苷酸组分解为两个集合,对它们进行分开扩增以生成两种重叠的PCR产物。然后,通过PCR扩增来组合这些重叠的产物以形成完整的可变区。可能还想要包括PCR扩增中的重链或轻链恒定区的重叠片段以生成可以容易地克隆入表达载体构建体中的片段。

[0765] 然后,将再构建的重链和轻链可变区与克隆的启动子、翻译启动、恒定区、3' 非翻译的多聚腺苷酸化、和转录终止序列组合以形成表达载体构建体。可以将重链和轻链表达构建体组合入单一载体中,共转染、连续转染、或分开转染入宿主细胞中,然后将所述宿主细胞融合以形成表达这两条链的宿主细胞。

[0766] 如此,在另一个方面,使用人抗TFPI抗体的结构特征来创建保留结合TFPI的功能的结构相关人抗TFPI抗体。更具体地,可以将本发明的单克隆抗体的明确鉴定的重链和轻链区的一个或多个CDR与已知的人框架区和CDR重组组合以创建本发明的别的、经重组工程化改造的人抗TFPI抗体。

[0767] 药物组合物

[0768] 还提供了药物组合物,其包含治疗有效量的抗TFPI单克隆抗体和药学可接受载体。“药学可接受载体”是可以添加至活性成分以帮助配制或稳定制剂而不对患者引起显著不利的毒理学效果的物质。此类载体的例子是本领域技术人员公知的,包括水、糖诸如麦芽糖或蔗糖、清蛋白、盐诸如氯化钠等。其它载体记载于例如E.W.Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences。此类组合物会含有治疗有效量的至少一种抗TFPI单克隆抗体。

[0769] 药学可接受载体包括无菌水溶液或分散体和和供即时制备无菌可注射溶液或分散体用的无菌粉剂。对药学活性物质使用此类介质和药剂是本领域中已知的。优选地,组合物配制用于胃肠外注射。组合物可以配制为溶液、微乳、脂质体、或其它适合于高药物浓度的有序结构。载体可以是溶剂或分散介质,其包含例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇、及液态聚乙二醇等)、及其合适的混合物。在一些情况中,它在组合物中会包含等张剂,例如糖、多元醇诸如甘露醇、山梨醇、或氯化钠。

[0770] 可以如下制备无菌可注射溶液,即根据需要在具有上文所列举的一种成分或成分组合的合适溶剂中掺入需要量的活性化合物,接着过滤灭菌。一般而言,通过将活性化合物掺入无菌媒介中来制备分散体,所述无菌媒介含有基础分散介质及来自那些上文所列举的成分的其它所需成分。在供制备无菌可注射溶液用的无菌粉剂的情况中,一些制备方法是自其先前无菌过滤的溶液产生活性成分和任何其它想要成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥(冻干)。

[0771] 药学用途

[0772] 可以为治疗目的使用单克隆抗体来制备遗传性和获得性凝结缺乏或缺陷。例如,可以使用上文所描述的实施方案中的单克隆抗体来阻断TFPI与FXa的相互作用,或者以阻止对TF/FVIIa活性的TFPI依赖性抑制。另外,还可以使用单克隆抗体来恢复TF/FVIIa驱动的FXa生成以回避FVIII或FIX依赖性FXa扩增的不足。

[0773] 单克隆抗体在止血病症诸如血小板减少(thrombocytopenia)、血小板病症和流血

病症(例如血友病A、血友病B和血友病C)的治疗中具有治疗用途。可以通过对所有需要的患者施用治疗有效量的抗TFPI单克隆抗体来治疗此类病症。单克隆抗体在治疗诸如外伤和出血性中风(hemorrhagic stroke)等的适应症中不受控制的流血中也具有治疗用途。如此,还提供了一种用于缩短流血时间的方法,包括对所有需要的患者施用治疗有效量的本发明的抗TFPI单克隆抗体。

[0774] 抗体可以作为单一疗法或者与其它疗法联合使用以解决止血病症。例如,认为本发明的一种或多种抗体与凝固因子诸如因子VIIa、因子VIII或因子IX的共施用对于治疗血友病是有用的。在一个实施方案中,提供了一种用于治疗遗传性和获得性凝结缺乏或缺陷的方法,包括施用(a)第一量的结合人组织因子途径抑制剂的单克隆抗体和(b)第二量的因子VIII或因子IX,其中所述第一和第二量在一起对于治疗所述缺乏或缺陷是有效的。在另一个实施方案中,提供了一种用于治疗遗传性和获得性凝结缺乏或缺陷的方法,包括施用(a)第一量的结合人组织因子途径抑制剂的单克隆抗体和(b)第二量的因子VIII或因子IX,其中所述第一和第二量在一起对于治疗所述缺乏或缺陷是有效的,且进一步其中因子VII不是共施用的。本发明还包括药物组合物,其包含治疗有效量的本发明的单克隆抗体和因子VIII或因子IX的组合,其中所述组合物不含因子VII。“因子VII”包括因子VII和因子VIIa。这些联合疗法有可能降低凝固因子的必要输注频率。共施用或联合疗法意指各自分开配制或在一种组合物中共同配制且当分开配制时在近似相同时间或在不同时间,但在相同治疗期里施用的两种治疗药物的施用。

[0775] 在一些实施方案中,本文中所描述的一种或多种抗体可以组合使用以决定止血病症。例如,认为本文中所描述的两种或更多种抗体的共施用可用于治疗血友病或其它止血病症。

[0776] 可以以如下剂量和频率对患有血友病A或B的受试者胃肠外施用药物组合物,所述剂量和频率可以随流血事件的严重程度而变化,或者在预防疗法的情况中,可以随患者的凝固缺乏的严重程度而变化。

[0777] 可以以推注或者通过连续输注来对有所需要的患者施用组合物。例如,作为Fab片段存在的发明性抗体的推注施用可以在0.0025至100mg/kg体重、0.025至0.25mg/kg、0.010至0.10mg/kg或0.10-0.50mg/kg的量中。对于连续输注,可以以0.001至100mg/kg体重/分钟、0.0125至1.25mg/kg/分钟、0.010至0.75mg/kg/分钟、0.010至1.0mg/kg/分钟或0.10-0.50mg/kg/分钟施用作为Fab片段存在的发明性抗体,持续一段1-24小时、1-12小时、2-12小时、6-12小时、2-8小时、或1-2小时的时间。对于施用作为全长抗体(具有完整的恒定区)存在的发明性抗体,剂量量可以是约1-10mg/kg体重、2-8mg/kg、或5-6mg/kg。此类全长抗体通常会通过延续一段30分钟至3小时的时间的输注来施用。施用频率会取决于状况的严重程度。频率范围可以为每周三次至每两周至六个月一次。

[0778] 另外,可以经由皮下注射来对患者施用组合物。例如,可以经由皮下注射每周、每两周或每月对患者施用10至100mg抗TFPI抗体的剂量。

[0779] 如本文中所使用的,“治疗有效量”指有效增加体内的凝固时间或者在其它情况中对有所需要的患者引起可测量的体内益处所需要的抗TFPI单克隆抗体或所述抗体与因子VIII或因子IX的组合的量。精确量会取决于许多因素,包括但不限于治疗性组合物的成分和物理特征、预期的患者群体、个体患者考虑等,而且本领域技术人员可以容易地确定。

[0780] 实施例

[0781] 实施例1:克隆、表达和抗体表达水平的量化

[0782] 将在重链C端携带c-myc标签和六组氨酸标签的野生型Fab 2A8和4B7的重和轻链亚克隆入pET28a细菌表达载体(Novagen/Merck Chemicals Ltd., Nottingham, UK)中,并转化入Top10F细胞(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)中。或者,可以使用其它细菌表达载体(例如,pQE载体系统, Qiagen GmbH, Hilden, Germany)和菌株(例如, DH5 α , Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany)。通过标准的基于寡聚物的定点诱变来生成变体,并通过DNA测序来确认。具体地,在重和/或轻链内修饰互补决定区内或周围的氨基酸残基。

[0783] 为了能够使用野生型或突变体抗体作为竞争物,使用标准的基于PCR的技术来除去或替换位于重链C端的表位标签。具体地,对于4B7,对分析的所有变体将c-myc标签更换成血细胞凝集素(HA)表位标签。比较而言,作为竞争物使用的4B7野生型或变体携带c-myc标签。在2A8的情况中,将c-myc表位标签用HA标签替换或删除,生成仅在其C端展现出6x组氨酸表位标签的变体。

[0784] 对于表达,将变体转化入BL21starDE3大肠杆菌菌株(Invitrogen, C6010-03)中,将其接种入含有卡那霉素(30 μ g/ml)的LB培养基中的过夜培养物中,并于37 $^{\circ}$ C温育18小时。通过将过夜培养物以1:20接种入具有卡那霉素(30 μ g/ml)的新鲜LB培养基中来生成表达培养物。在6小时后,添加1mM异丙基-b-D-1-硫代半乳糖吡喃糖苷(Roth, 2316.5)以诱导抗体表达,并将培养物于30 $^{\circ}$ C再温育18小时。或者,将过夜培养物以1:20接种入自身诱导培养基过夜表达(Overnight Express) TB培养基(Merck, 71491),并于30 $^{\circ}$ C温育24小时。

[0785] 对于量化表达水平,使用ELISA方法。简言之,将MTP板(Nunc maxisorp black, 460518)与在包被缓冲液(Candor Bioscience GmbH, 121500)中稀释的Fab特异性抗体(Sigma, I5260)于4 $^{\circ}$ C一起温育过夜,用PBST(磷酸盐缓冲液盐水:137mM NaCl, Merck 1.06404.5000; 2.7mM KCl, Merck 1.04936.1000; 10mM Na₂HPO₄, Merck 1.06586.2500, 1.8mM KH₂PO₄, Merck 1.04871.5000; 含有0.05% Tween 20 Acros Organics, 233360010)清洗,用PBST中的2%乳于室温封闭1小时,并再次清洗。将培养物在PBS中的0.25%脱脂乳(Fluka analytical, 70166)中稀释,并于室温结合MTP板达1小时。在用PBST清洗后,将捕获的抗体与经HRP偶联的抗Fab抗体(Sigma, A0293)一起温育,并通过将板与10 μ M Amplex红底物(Invitrogen, A12222)于室温在黑暗中一起温育10至30分钟来检测,接着进行荧光测量。在测定浓度后相对于野生型纯化的抗体(2A8或4B7)标准化表达水平。

[0786] 实施例2:测定生成的抗体变体的活性和物种间交叉反应性

[0787] 为了测定突变的抗体变体对人或小鼠TFPI(分别为American Diagnostica, 4900B和R&D Systems, 2975-P1)的活性,使用平衡或竞争性ELISA测定法形式。简言之,用分别在磷酸盐缓冲液(PBS)或包被缓冲液(Candor Bioscience GmbH, 121500)中稀释的0.04-2 μ g/ml人或小鼠TFPI包被MTP板(Mesoscale Discovery, L21XA-4或Nunc maxisorp黑色(black), 460518),并于4 $^{\circ}$ C温育过夜。在清洗后,将板用PBST中的3%牛血清清蛋白(Sigma, A4503)于室温封闭1小时,并重复清洗步骤。对于抗体的结合,10-25 μ l相对于其相应的抗体表达水平(若没有另外指示)标准化的培养上清液于RT添加至板达1小时,接着用PBST清洗。然后,通过表位标签特异性抗体检测结合的野生型和变体或者包括竞争步骤。对于竞争,添加50-300nM竞争物或游离的抗原,并于室温温育20分钟至24小时。在清洗后,用与辣根过氧

化物酶偶联的表位标签特异性抗体 (Biomol, 抗-c-myc A190-105P (对于2A8变体) 和抗-HA A190-108P (对于4B7变体) 或者通过先前依照制造商的关于电化学发光检测检测 (Mesoscale Discovery, R91AN-1) 的用法说明书用sulfo-NHS试剂标记的抗myc (Sigma, C3956) 或抗HA抗体 (Sigma, H6908) 检测剩余的变体。对于maxisorp板中的信号检测, 添加10 μ M Amplex红底物 (Invitrogen, A12222), 并于室温在黑暗中温育10至30分钟, 接着进行荧光测量。对于MSD板中的检测, 将MSD阅读缓冲液T在H₂O (Mesoscale Discovery, R92TC-1) 中稀释2x, 添加至板, 并使用Mesoscale Discovery Sector成像仪6000于620nm检测电化学发光信号。

[0788] 实施例3: 单个和多个氨基酸取代

[0789] 表1中提供了引入2A8重链或轻链中的单个氨基酸取代的几个例子。在量化ELISA中一式四份分析变体的表达水平。在相对于相应的表达水平标准化后, 对人和鼠TFPI在竞争性ELISA中一式四份分析性能, 并且测定变体与野生型 (wt) 比率。自标准差通过误差传播计算误差。

[0790] 表1: 对2A8内单个氨基酸取代的分析。

[0791]

2A8变体	hTFPI		mTFPI	
	变体/野生型	误差	变体/野生型	误差
HC_S31P	3.6	0.5	2.4	0.3
HC_S31V	9.7	1.1	7.4	4.1
HC_G33K	1.8	0.2	0.7	0.1
HC_G33P	5.1	0.6	2.9	0.4
HC_S35L	1.7	0.1	1.5	0.2
HC_S35D	4.3	0.6	2.6	0.6
HC_I51D	3.9	0.3	1.4	0.2
HC_I51E	7.3	0.6	0.7	0.1
HC_S54F	6.5	0.6	3.1	0.6
HC_S54D	1.7	0.2	1.2	0.2
HC_S55A	2.0	0.3	1.2	0.2
HC_S55R	4.4	1.1	2.1	0.3
HC_K99V	7.5	0.9	3.9	0.5
HC_K99L	13.5	1.4	10.8	2.8
HC_F104Y	2.0	0.3	1.5	0.2
LC_A32N	3.5	0.4	2.0	0.3
LC_Y48F	4.6	0.6	3.2	0.7
LC_N51V	4.4	0.4	2.0	0.4
LC_N52G	3.4	0.5	1.5	0.2
LC_P54L	5.3	0.8	2.7	0.5
LC_D91L	4.2	0.3	1.6	0.5
LC_D91R	3.1	0.5	2.0	0.3
LC_D91W	7.4	0.7	4.0	0.7
LC_D91K	3.5	0.4	1.4	0.2
LC_D92S	3.8	0.5	2.6	0.3
LC_D92T	2.6	0.4	1.2	0.2
LC_V96G	3.2	0.4	1.2	0.2
LC_V96M	3.5	0.5	1.5	0.2
LC_V96W	4.0	0.4	4.3	0.6
2A8变体	hTFPI		mTFPI	
	变体/野生型	误差	变体/野生型	误差
HC_S31P	3.6	0.5	2.4	0.3

	HC_S31V	9.7	1.1	7.4	4.1
	HC_G33K	1.8	0.2	0.7	0.1
	HC_G33P	5.1	0.6	2.9	0.4
	HC_S35L	1.7	0.1	1.5	0.2
	HC_S35D	4.3	0.6	2.6	0.6
	HC_I51D	3.9	0.3	1.4	0.2
	HC_I51E	7.3	0.6	0.7	0.1
	HC_S54F	6.5	0.6	3.1	0.6
	HC_S54D	1.7	0.2	1.2	0.2
	HC_S55A	2.0	0.3	1.2	0.2
	HC_S55R	4.4	1.1	2.1	0.3
	HC_K99V	7.5	0.9	3.9	0.5
	HC_K99L	13.5	1.4	10.8	2.8
[0792]	HC_F104Y	2.0	0.3	1.5	0.2
	LC_A32N	3.5	0.4	2.0	0.3
	LC_Y48F	4.6	0.6	3.2	0.7
	LC_N51V	4.4	0.4	2.0	0.4
	LC_N52G	3.4	0.5	1.5	0.2
	LC_P54L	5.3	0.8	2.7	0.5
	LC_D91L	4.2	0.3	1.6	0.5
	LC_D91R	3.1	0.5	2.0	0.3
	LC_D91W	7.4	0.7	4.0	0.7
	LC_D91K	3.5	0.4	1.4	0.2
	LC_D92S	3.8	0.5	2.6	0.3
	LC_D92T	2.6	0.4	1.2	0.2
	LC_V96G	3.2	0.4	1.2	0.2
	LC_V96M	3.5	0.5	1.5	0.2
	LC_V96W	4.0	0.4	4.3	0.6

[0793] 表2中提供了2A8TFPI抗体内组合的氨基酸取代的一些例子。虽然表2中没有提供了每种组合,但是涵盖的是TFPI抗体可以包含提供的修饰的任何组合。在量化ELISA中一式四份分析变体的表达水平。若没有另外指示,则变体相对于相应的表达水平标准化,并且在竞争性ELISA中对人和鼠TFPI一式四份分析性能,接着计算变体与参照物(HC_K99L)比率。在没有先前标准化的情况中分析变体性能的情况中用“#”标记数值,并且通过用测定信号除以表达水平相对于标准水平标准化变体与参照物比率。在竞争性ELISA中使用不同参照物并在没有先前标准化下分析变体的情况中,用“*”标记数值。对于这些变体,通过用比率变体/备选参照物乘以备选参照物/HC_K99L计算表中所列的数值。自标准差通过误差传播计算误差。

[0794]

表2: 2A8内多个氨基酸取代的例子。

Q1	2A8 HC														2A8 LC														hTFPI		mTFPI					
	R30	S31	G33	M34	S35	S50	S51	R52	S54	S55	S56	K99	D1	A13	S21	N26	R28	N29	H33	Y48	Y49	N51	N52	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	P95	V96	突变#	误差		
V												V								F	V												8.1#	0.4	2.2#	0.4
	P				D			F	F		L								F	G												6.2#	1.4	2.3#	0.8	
					D					R	V	V							F	V												8.0#	0.5	2.7#	0.4	
					L			F			V								F													5.0#	0.6	3.1#	0.5	
V	P				D						L								F												22.5#	1.6	5.9#	1.3		
					D						L								F												0.8#	0.1	0.2#	0.0		
V										R	L	L							F	G											0.4#	0.1	0.1#	0.0		
V					D						V								F												0.6#	0.0	0.1#	0.0		
	P							F											F	V											0.6	0.2	0.4	0.1		
									F		L	L																				6.2	1.6	5.3	1.2	
V					D			F											F												5.4	1.6	4.2	1.0		
											L	L																			7.1	1.9	5.4	1.3		
V	P				D			F			V								F	V											6.6	0.7	5.9	0.9		
										R	L	L							F	V											10.4	1.3	8.0	1.6		
V											V	V																			6.7	0.9	5.6	1.0		
V									R	V	V								F												9.2	1.0	7.0	1.9		
											L	L							F	V											18.8	2.1	18.7	2.6		
V								F			L	L																			16.3	1.8	15.7	2.6		
V	P				D														F	V											12.2	1.1	11.7	2.2		
									R	L	L								F	V											17.8	2.1	13.4	5.4		
V					D				R										F	V											8.7	0.9	8.2	3.9		
V					D														F	V											7.5	0.9	7.2	1.9		

[0799]

4B7变体	hTFPI		mTFPI	
	变体/野生型	误差	变体/野生型	误差
HC_N32D	3.8	0.7	6.0	2.9
HC_N32E	3.2	1.0	2.1	0.3
HC_S33G	1.5	0.3	6.5	1.2
HC_S57K	1.7	0.4	6.5	1.1
HC_S57R	2.0	0.4	6.6	1.4
HC_D62I	9.8	1.6	44.4	11.6
HC_D62R	32.3	4.5	230.2	34.1
HC_D62L	6.8	1.2	22.9	6.1
HC_D62Q	20.6	2.8	142.5	28.0
HC_D62S	29.3	4.3	146.5	40.4
HC_H103D	2.4	0.4	12.9	2.0
HC_H103G	1.4	0.3	10.7	2.0
HC_Y112D	2.9	0.6	5.7	1.3
LC_S32R	4.2	0.7	7.8	1.5
LC_S32Y	2.0	0.4	6.7	1.2
LC_D33F	5.3	1.3	7.0	2.6
LC_D33R	3.6	0.7	7.2	1.9
LC_N35I	3.6	0.7	7.1	1.5
LC_N35L	2.1	1.0	6.0	1.3
LC_N35T	5.4	1.0	3.4	1.1
LC_Y37F	3.6	0.7	1.9	0.6
LC_S57Y	1.6	0.4	2.2	0.4
LC_S61C	3.1	0.5	15.3	4.2
LC_D97M	2.4	0.5	1.3	0.4
LC_D97T	1.8	0.3	5.5	1.6
HC_N61G	2.2	0.5	1.4	0.3
HC_D62V	31.9	5.6	95.0	20.4
HC_D62N	52.3	9.5	146.4	28.9
HC_H107M	8.1	1.6	5.6	1.7
LC_F31I	9.1	2.1	23.6	4.3
LC_F31M	1.7	0.4	1.3	0.4
LC_N35V LC_G56D	1.9	0.4	8.2	1.7

[0800]	LC_N35L LC_G56A	3.1	0.7	6.9	1.6
	LC_D33F LC_Y54F	4.3	0.9	7.9	1.9
	HC_S30R HC_S57K	1.6	0.3	6.6	1.1
	HC_N61G HC_D62V	8.0	1.1	31.1	9.1
	HC_H107M LC_F31I	3.7	0.7	9.2	2.7
	HC_G109A LC_D33R	3.8	0.6	8.0	1.3
	HC_N61T LC_G167C	2.8	0.4	6.4	1.6
	HC_K58M HC_D62N	6.6	1.2	15.2	4.5

[0801] 表4中提供了4B7TFPI抗体内的氨基酸取代的组合的一些例子。虽然表4中没有提供每种组合,但是涵盖的是TFPI抗体可以包含提供的修饰的任何组合。在量化ELISA中一式四份分析变体的表达水平。若没有另外指示,则变体相对于相应的表达水平标准化,并且在竞争性ELISA中对人和鼠TFPI一式四份分析性能,接着计算变体与参照物(HC_D62R)比率。在使用不同参照物并在没有先前标准化下分析变体的情况中,用“*”标记数值。对于这些变体,通过用比率变体/备选参照物乘以备选参照物/HC_D62R计算表中所列的数值。自标准差通过误差传播计算误差.nb:在使用的测定条件下检测不到结合。

[0802] 表4:4B7内多个氨基酸取代的例子。

Q1	HC_4B7												LC_4B7												hTFPI		mTFPI				
	N32	S37	G44	I53	K55	D62	H103	H107	Y112	M4	V30	F31	S32	D33	N35	T36	Y37	N39	L42	K44	Q50	L51	K55	G56	A60	D97	S98	变体/HC_D62R	误差	变体/HC_D62R	误差
	D					R			D				R		I													26.1	2.2	30.1	4.3
	D					R		M	D			I	R		I											T	18.2	3.6	8.7	1.4	
	D					R			D					R	I												22.9	2.5	19.5	3.2	
	D					S		M	D				R	R	T												19.6	1.9	20.3	3.2	
	D					R	D					I		R													13.6	1.4	14.6	2.4	
						R		M	D					F	I												20.0	3.4	36.6	9.8	
	D					R			D					F	I											T	25.5	1.7	15.9	2.6	
	D					R			D			I		F	I											T	23.3	3.1	11.9	2.2	
						R		M	D			M		F													24.2	1.8	31.3	5.0	
						R		M	D			I		R	I												22.0	2.2	35.4	5.0	
	D					R	D	M	D				R		T												14.0	1.7	18.4	2.7	
	D					Q			D			M	R	F	I												20.8	1.6	15.8	2.1	
	D					R			D				R	F	I												29.7	2.2	42.0	5.9	
	D					R		M	D				R	F	T												29.2	1.9	44.1	7.2	
	D					Q		M	D					R	T												23.7	1.4	18.8	3.2	
	D					Q		M	D				R		T												25.0	2.0	27.1	5.0	

	D				R		D	L	R	F	I								T	26.1*	7.6	42.2*	10.1		
	D				R		D		H	R	F	I								T	22.1*	6.8	15.2*	3.2	
	D				R		D		Y	R	F	I								T	27.9*	9.8	39.7*	10.4	
	D				R		D			R	F	I	N							T	25.2*	7.6	35.4*	8.8	
	D				R		D			R	F	I		D						T	1.3*	0.5	nb	0.0	
	D				R		D			R	F	I			Q					T	26.9*	7.6	43*	10.5	
	D				R		D			R	F	I				R				T	26*	8.1	40.1*	9.1	
	D				R		D			R	F	I					R			T	25.9*	7.4	39.4*	10.4	
	D				R		D			R	F	I						R		T	11.2*	3.6	5.2*	1.5	
	D				R		D			R	F	I						L		T	7.8*	2.0	nb	0.0	
	D				R		D			R	F	I							V	T	12.1*	3.4	nb	0.0	
	D				R		D			R	F	I							D	T	19.1*	6.2	14.3*	3.6	
	D				R		D			R	F	I								T	H	17.9*	5.3	7.1*	1.7
	E	D			R		D			R	F	I								T		26.7*	9.0	39.8*	8.9
	D	N			R		D			R	F	I								T		1.9*	0.7	nb	0.0
	D	S			R		D			R	F	I								T		26.5*	8.1	41.5*	10.2
[0805]	D		T		R		D			R	F	I								T		19.6*	6.0	8.3*	2.3
	D			Y	R		D			R	F	I								T		25.6*	8.5	42.8*	10.4
	D				K		D			R	F	I								T		22.7*	7.1	38.8*	8.8
	D				Q		D			R	F	I								T		23.2*	7.0	40*	8.8
	E	D	S	Y	R		D	L	R	F	I	N								T		20.4*	5.3	29.4*	6.3
	D				R		D	L	R	F	I	N								T		23.9*	4.9	28.4*	8.2
	E	D	S	Y	R		D			R	F	I								T		26.3*	4.8	45.1*	9.6
	D				Q		D	L	I	F	I											22.9*	8.0	24.6*	12.8
	D				Q		D		I	F	I	N										27.3*	8.9	46.3*	23.5
	D				Q		D		I	F	I				Q							21.4*	6.9	16.7*	8.9
	D				Q		D		I	F	I					R						22.8*	7.9	18.5*	9.6
	D				Q		D		I	F	I									T		14.4*	4.2	4.6*	2.5
	D				Q		D		I	F	I									H		13.5*	4.8	nb	0.0
	D			T	Q		D		I	F	I											5.7*	1.5	nb	0.0
	D				Y	Q		D		I	F	I										25.6*	9.0	26.2*	13.3
	E	D	S	Y	R		D	L	R	I	N											23*	5.0	9.9*	3.3
	D				R		D	L	R	I	N											25*	4.3	7*	4.2
	E	D	S	Y	R		D			R	I											22.6*	3.9	25.5*	5.8

[0806] 实施例4:抗体的纯化

[0807] 通过于4℃以9000rpm离心30分钟收获细胞,并于-20℃贮存。将上清液与缓冲液A (50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,10mM咪唑pH8.0) 进行缓冲液更换,浓缩,并使用两步纯化规程纯化。简言之,将100ml浓缩的上清液加载到首先用5x柱体积缓冲液A,接着用5x柱体积4.3%缓冲液B (50mM NaH₂PO₄,300mM NaCl,250mM咪唑pH8.0) 清洗的5ml Ni-NTA Superflow 柱(Qiagen,1018142) 上,并用7个体积的缓冲液B洗脱。将级分组合,并在PBS中透析。在第二纯化步骤中,将Ni-NTA纯化的抗体与轻链特异性亲和基质一起温育,即,对于2A8和4B7分别捕捉选择的lambda或kappa (分别为BAC 0849.010和BAC 0833.10)。在于4℃温育过夜后,将基质加载到柱中,用5个体积的PBS、5个体积的500mM精氨酸、100mM NaH₂PO₄、100mM NaCl pH6.0及再用5个体积的PBS清洗。用6个体积的100mM甘氨酸pH3.0,接着用3个体积的100mM甘氨酸pH2.0将抗体洗脱入占总体积1/10的1M HEPES pH 7.5以中和洗脱液。最后,将洗脱液在PBS中于4℃透析过夜。通过SDS-PAGE和质谱术分析纯化的抗体。

[0808] 实施例5:使用表面等离子共振(Biacore) 测量抗体结合TFPI的亲合力

[0809] 将人或小鼠TFPI在表面上固定化以进行分析。依照来自制造商的用法说明书使用

CM5-芯片和胺偶联试剂盒 (GE HealthCare) 固定化配体。固定化的TFPI的量是约70个RU以适应于可以产生100个RU的RMax的抗体质量。亲本和亲和力成熟的抗TFPI抗体在流动相中。用至少5种不同浓度 (0.1, 0.4, 1.6, 6.4和25nM) 的纯化的抗体实施亲和力测定。

[0810] 通过分析在CDR区中含有单突变的抗体变体,我们鉴定出在Elisa结合测定法中具有较高信号的许多克隆。纯化选定的克隆,并使用Biacore分析其对人或小鼠TFPI的亲和力。如表5和表6中显示的,这些克隆比亲本抗体2A8或4B7具有更高的对TFPI的亲和力。虽然一些2A8突变体比亲本抗体2A8具有更慢的结合速率 (k_a),但是所有这些突变体比2A8具有慢得多的解离速率 (k_d)。总体上,这些单突变对人TFPI以1.47倍至7.22倍,而对小鼠TFPI以1.71倍至7.20的范围提高2A8的亲和力。在我们分析4B7变体时,重链CDR2域中的D62R突变显著提高信号。选择此克隆进行亲和力测量。如表5和表6中显示的,此单突变将4B7对人TFPI的亲和力从11.1nM增加至58.2pM,即改善191倍。4B7HcD62R的较慢的解离速率 (k_d) 主要促成其亲和力改善,从4B7的 $8.40 \times 10^{-3}/s$ 至4B7HcD62R的 1.65×10^{-4} ,改善约50倍。类似地,此突变将4B7对小鼠TFPI的亲和力从58.6nM增加至427pM,改善137倍。

[0811] 表5: 选定的2A8或4B7变体 (单突变) 对人TFPI的亲和力

样品	克隆	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	改善
[0812] 2A8-1	HC_G33P	2.71E+06	2.24E-03	8.27E-10	2.70
2A8-2	HC_S31P	2.91E+06	3.33E-03	1.15E-09	1.95
2A8-3	HC_S31V	3.84E+06	1.43E-03	3.73E-10	6.00
2A8-4	HC_S35D	4.01E+06	3.80E-03	9.50E-10	2.35
2A8-6	HC_I51E	1.29E+06	1.62E-03	1.26E-09	1.78
2A8-7	HC_S54F	2.81E+06	2.04E-03	7.27E-10	3.08
2A8-8	HC_S55R	4.30E+06	3.94E-03	9.17E-10	2.44
2A8-9	HC_K99L	2.60E+06	8.03E-04	3.09E-10	7.22
2A8-10	HC_K99V	2.55E+06	2.54E-03	9.95E-10	2.25
2A8-11	LC_A32N	2.70E+06	4.10E-03	1.52E-09	1.47
2A8-12	HC_I51D	3.61E+06	4.95E-03	1.37E-09	1.63
[0813] 2A8-13	LC_N51V	4.26E+06	2.20E-03	5.18E-10	4.32
2A8-14	LC_Y48F	2.64E+06	3.00E-03	1.14E-09	1.97
2A8-15	LC_D91K	4.33E+06	2.09E-03	4.82E-10	4.64
2A8-16	LC_D91L	4.41E+06	4.40E-03	9.99E-10	2.24
2A8-17	LC_D91W	3.86E+06	4.32E-03	1.12E-09	2.00
2A8-20	2A8wt	3.13E+06	7.00E-03	2.24E-09	1.00
4B7HcD62R	HC_D62R	2.83E+06	1.65E-04	5.82E-11	190.83
4B7	4B7wt	7.56E+05	8.40E-03	1.11E-08	1.00

[0814] 表6: 选定的2A8和4B7变体 (单突变) 对小鼠TFPI的亲和力

[0815]

样品	克隆	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	改善
2A8-1	HC_G33P	9.12E+05	1.45E-03	1.59E-09	2.21
2A8-2	HC_S31P	1.53E+06	3.16E-03	2.06E-09	1.71
2A8-3	HC_S31V	3.39E+06	2.02E-03	5.95E-10	5.91
2A8-4	HC_S35D	1.25E+06	2.46E-03	1.98E-09	1.78
2A8-7	HC_S54F	8.84E+05	1.83E-03	2.07E-09	1.69
2A8-9	HC_K99L	1.56E+06	7.59E-04	4.88E-10	7.20
2A8-17	LC_D91W	2.86E+06	2.32E-03	8.14E-10	4.32
2A8wt	2A8wt	1.47E+06	5.17E-03	3.51E-09	1.00
4B7HcD62R	HC_D62R	8.58E+06	3.67E-03	4.27E-10	137.00
4B7wt	4B7wt	2.18E+06	1.28E-01	5.86E-08	1.00

[0816] 接着,调查2A8和4B7内多个突变的结合亲和力。如表7 (a) 和表8 (a) 中显示的,在CDR域中含有多个突变的2A8突变体比单突变的2A8在人TFPI和小鼠TFPI结合上具有更高的亲和力。例如,2A8-200比2A8在人TFPI结合上具有高53.7倍的亲和力,而在小鼠TFPI结合上具有高55.4倍的亲和力。如表7 (b) 和表8 (b) 中显示的,在CDR域中含有多个突变的4B7突变体在人TFPI和小鼠TFPI结合两者上比单突变的4B7具有更高的亲和力。序列表中也已经提供了表7和8中提供的来自亲本2A8和4B7序列的那些变体。SEQ ID NO:5-11对应于表7和8中所列的2A8的重链变体。SEQ ID NO:12-18对应于表7和8中所列的2A8的轻链变体。SEQ ID NO:19-26对应于表7和8中所列的4B7的重链变体。SEQ ID NO:27-34对应于表7和8中所列的4B7的轻链变体。

[0817] 表7 (a) :选定的2A8变体 (多个突变) 对人TFPI的亲和力

[0818]

样品	2A8 HC										2A8 LC										ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD 倍数改善				
	Q1	R30	S31	S35	I51	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91					D92	G93	V94	V96
2A8-127				D			L								F	V	D							W	1.68E+06	1.41E-04	8.41E-11	22
2A8-143				D	R		L								F	V				L				W	2.88E+06	1.05E-04	3.64E-11	50.9
2A8-200				D	R		L								F	V				W					2.87E+06	9.88E-05	3.44E-11	53.7
2A8-216			V	D	R		V								F					L				W	3.29E+06	1.54E-04	4.67E-11	39.6
2A8-227				D			L								F					L				W	3.28E+06	1.23E-04	3.75E-11	49.4
2A8-g200	E	S		D	R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T			6.17E+05	3.61E-05	5.84E-11	31.7
2A8-g216			V	D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W		1.45E+06	5.29E-05	3.65E-11	50.7
2A8 wt																									2.05E+06	3.80E-03	1.85E-09	1

[0819] 表7 (b) :选定的4B7变体 (多个突变) 对人TFPI的亲和力

[0820]

样品	4B7 HC						4B7 LC						ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD 倍数改善
	Q1	N32	G44	K55	D62	Y112	F31	S32	D33	N35	D97					
B18.5		D			Q	D	I		F	I		1.23E+06	3.18E-05	2.60E-11	428.2	
B2.0		D			R	D		R	F	I	T	7.46E+06	3.81E-05	5.10E-12	2177.8	
B27.1		D			R	D				T	T	2.78E+06	3.53E-05	1.27E-11	874.9	
B32.5					R	D			F	I		2.15E+06	3.19E-05	1.48E-11	748.7	
B41.2		D			R	D		R	F	I		3.46E+06	2.47E-05	7.16E-12	1552.7	
B9.7		D			R	D		R		I		2.97E+06	2.61E-05	8.78E-12	1266.2	
gB9.7	E	D	S	Y	R	D		R		I		9.38E+05	9.55E-06	1.02E-11	1091.5	
gB9.7-IgG		D	S	Y	R	D		R		I		2.03E+06	1.56E-05	7.65E-12	1450.9	
4B7												7.56E+05	8.40E-03	1.11E-08	1	

[0821]

表8(a) :选定的2A8变体(多个突变)对小鼠TFPI的亲合力

样品	2A8 HC												2A8 LC												ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD 倍数改善	
	Q1	R30	S31	S35	I51	S55	S56	K99	D1	I2	A13	S21	R28	N29	Y48	N51	G56	E80	S89	D91	D92	G93	V94	V96					
2A8-127				D				L							F	V	D								W	8.24E+05	1.47E-03	1.78E-10	18.5
2A8-143				D		R		L							F	V				L					W	1.40E+06	1.25E-03	6.78E-11	48.5
2A8-200				D		R		L							F	V				W						1.04E+06	6.19E-04	5.94E-11	55.4
2A8-216			V		D	R		V							F					L					W	4.19E+06	2.16E-04	5.15E-11	63.9
2A8-227				D				L							F					L					W	6.91E+06	1.06E-03	1.53E-10	21.4
2A8-g200	E	S		D		R	G	L	S	Y	S	T	P	K	F	V		M	A	W	S	S	T			1.15E+06	1.39E-04	1.21E-10	27.3
2A8-g216			V		D	R		V	S	Y	S	T	P	K	F	S		M		L	S		T	W		9.84E+05	7.78E-05	7.91E-11	41.6
2A8 wt																										9.40E+05	3.10E-03	3.29E-09	1

[0823]

表8(b) :选定的4B7变体(多个突变)对小鼠TFPI的亲合力

样品	4B7 HC						4B7 LC						ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	KD 倍数改善
	Q1	N32	G44	K55	D62	Y112	F31	S32	D33	N35	D97					
B18.5		D			Q	D	I		F	I		1.09E+06	4.30E-04	3.95E-10	138.7	
B2.0		D			R	D		R	F	I	T	6.99E+06	3.15E-04	4.51E-11	1213.5	
B27.1		D			R	D				T	T	4.06E+06	7.42E-04	1.83E-10	299.3	
B32.5					R	D			F	I		4.52E+06	4.68E-04	1.04E-10	528.4	
B41.2		D			R	D		R	F	I		4.73E+06	2.45E-04	5.19E-11	1055.7	
B9.7		D			R	D		R		I		3.59E+06	3.34E-04	9.31E-11	588.2	
gB9.7	E	D	S	Y	R	D		R		I		9.29E+05	1.85E-04	1.99E-10	275.4	
gB9.7-IgG		D	S	Y	R	D		R		I		2.70E+06	2.36E-05	8.75E-12	6251.4	
4B7												3.15E+06	1.72E-01	5.47E-08	1	

[0825]

实施例6:亲和力改善的抗体在恢复FXa活性方面显示更多的效力

[0826]

为了通过阻断TFPI蛋白的抑制效果测定亲和力改善的抗TFPI抗体是否也改善其在恢复FXa活性中的效力,我们实施FXa恢复测定法。在此测定法中,将各种指定量的个别的亲和力改善的抗体(30μL)在50μL总反应混合物中与固定量的人、小鼠或大鼠重组TFPI(20μL,6.6nM)于室温一起温育30分钟。温育后,将50μL FXa(3.39nM)添加至反应混合物,并于37℃温育30分钟。然后,将20μL Spectrozyme FXa底物添加至反应混合物。温育12分钟后,使

用读板仪 (Molecular Device) 于405nm读出每孔的吸光度。对于每次实验,获得通过已知量的TFPI抑制的相同量的FXa (3.39nM) 的线性标准曲线。100%恢复的FXa活性定义为在没有添加任何量的TFPI的情况中的FXa活性,而0%活性定义为在存在TFPI蛋白 (6.6nM) 的情况中的FXa活性。如此,对每种单独的抗TFPI抗体计算半最大抑制浓度 (IC50),其中一些在表9中提供。还对选定的2A8第二轮变体计算半最大有效浓度 (EC50),并在表10中提供。

[0827] 表9:使用FXa恢复测定法分别与其亲本抗体2A8和4B7相比具有单一氨基酸取代的选定抗TFPI抗体的IC50和效力改善。

样品	克隆	IC 50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	改善
2A8-2	HC_S31P	0.33	1.7
2A8-3	HC_S31V	0.201	3.5
2A8-4	HC_S35D	0.55	1.1
2A8-6	HC_I51E	0.76	0.9
2A8-7	HC_S54F	0.35	2.0
2A8-9	HC_K99L	0.181	3.9
2A8-10	HC_K99V	0.39	1.6
2A8-14	LC_Y48F	0.34	1.9
2A8-15	LC_D91K	0.34	1.9
2A8-16	LC_D91L	0.37	1.7
2A8-17	LC_D91W	0.23	3.0
2A8-20	2A8wt	0.70	1.0
4B7HcD62R	HC_D62R	0.058	25
4B7	4B7wt	1.46	1.0

[0829] 表10:与亲本抗体2A8相比具有多个氨基酸取代的选定抗TFPI抗体的IC50和倍数改善。

样品	2A8 HC						2A8 LC				EC50 (nM)	改善
	S31	S35	I51	S55	K99	Y48	N51	G56	D91	V96		
2A8-127		D			L	F	V	D		W	0.44	18.2
2A8-143		D		R	L	F	V		L	W	0.50	15.8
2A8-200		D		R	L	F	V		W		0.81	9.7
2A8-216	V		D	R	V	F			L	W	1.08	7.3
2A8-9					L						1.00	7.9
2A8 wt											7.91	1.00

[0831] 实施例7:亲和力改善的抗体在dPT测定法中在缩短凝固时间上显示更多的效力

[0832] 为了确认这些亲和力改善的抗体在缩短凝固时间上是否也改善效力,使用人血友病A血浆实施dPT,其测定选定的亲和力成熟的抗体对凝固时间的影响。完成dPT测定法,基

本上如记载于Welsch等(Thrombosis Res.,1991,64(2):213-222)的。简言之,通过混合血浆与0.1个体积的对照缓冲液(作为阴性对照)或指定的抗TFPI抗体制备人血友病A血浆(George King Biomedical)。在于25℃温育30分钟后,将每种制备的血浆样品(100μL)与作为促凝血酶原激酶来源的100μL适当稀释的(以1:500稀释)Simplastin(Biometieux)和100μL 25mM氯化钙组合。正好在添加氯化钙后使用纤维测定仪(fibrometer) STA4(Stago)测定凝固时间。

[0833] 实施例8:使用抗因子VIII抗体诱导的人血友病A血液,亲和力改善的抗体在缩短全血凝固时间方面显示更多的效力。

[0834] 为了确认亲和力改善的抗体在缩短凝固时间方面是否显示更多的效力,我们使用ROTEM系统测试这些抗体在人FVIII中和性抗体诱导的血友病A血液(其模拟具有抑制剂的来自血友病A患者的血液)中对凝固时间的影响。ROTEM系统(Pentapharm GmbH)包括四通道仪器、计算机、血浆标准品、激活剂和一次性杯和针。ROTEM止血系统的血栓弹力图(thrombelastographic)参数包括:凝固时间(CT),其反映到启动血液凝固的反应时间(启动数据收集后获得2mm振幅所需要的时间);用于反映凝固扩展(clotting propagation)的凝固形成时间(CFT)和alpha角、和用于反映凝块坚固性的最大限度振幅和最大限度弹性模数(elastic modulus)。在ROTEM测定法中,使用300μl新鲜抽出的柠檬酸化的全血(其中通过添加针对FVIII的多克隆抗体中和FVIII活性)测试亲和力改善的抗TFPI抗体与亲本抗TFPI抗体相比的效果。依照制造商的用法说明书重建并混合所有组分,数据收集持续每个系统需要的时段。简言之,通过用自动化移液器将300μl血液或血浆取出/分配入ROTEM杯中混合样品,其中添加20μl CaCl₂(200mmol),接着立即混合样品并启动样品收集。使用计算机控制的(软件第2.96版)ROTEM系统来收集数据达2小时。

[0835] 图2和3中显示了ROTEM测定法在检测亲和力改善的抗TFPI抗体在缩短血液凝固时间方面的效果中的例示性结果。图2显示了选定的第一轮亲和力成熟的抗TFPI抗体对人抗体诱导的血友病血液的凝固时间的影响。与亲本2A8抗体相比,亲和力改善很多的抗体2A8-9和2A8-17在人抗体诱导的血友病A血液在缩短凝固时间上显示多得多的效力,而2A8-10(其对TFPI的结合亲和力没有改善)保持相似的凝固效力。

[0836] 实施例9:亲和力改善的抗体在血友病A小鼠的尾静脉横断模型中显示更好的存活率

[0837] 为了测定亲和力改善的抗体在对出血小鼠的保护性效果中是否更有效力,使用血友病A小鼠的尾静脉横断模型。在损伤前24小时,经由尾静脉输注给小鼠服用多个指定量的亲本抗TFPI抗体2A8或多个指定量的A200。在给药后24小时,将离尖端2.7mm(以直径计)处的尾的左静脉横断。在横断后24小时里观察存活。在与重组FVIII(10IU/kg至30IU/kg)一起给予时,表明存活力是剂量依赖性的。

[0838] 图4显示了与对照小鼠IgG1(CTX IgG1)相比,选定的亲和力改善的抗体A200以剂量依赖性方式显著延长血友病A小鼠的存活,而且在每个等同剂量比亲本抗体2A8展现更好的存活率。

[0839] 实施例10:使用人血友病C(FXI缺乏的)血浆,亲和力改善的抗体显示增强的凝固

[0840] 此外,利用ROTEM测定法测试抗体在人因子XI缺乏(FXI缺乏)血浆(其模拟血友病C患者)中对凝固时间的影响。图5中显示此ROTEM测定法在检测亲和力改善的抗TFPI抗体在

缩短血浆凝固时间方面的效果中的结果。图5显示2A8变体2A8-200以剂量依赖性方式增强人血友病C血浆中的凝固,并且其效果与重组FVIIa的效果相当。

[0841] 虽然本发明已经参照具体的实施方案和实施例进行了描述,但是应当理解可以进行各种修饰和变化,而且可以在不背离本发明的真实精神和范围的前提下替换等同方案。因而,说明书和实施例应以例示性而非限制性意义看待。此外,通过提及而将本文中所提及的所有文章、书籍、专利申请和专利完整收入本文。

序列表

<110> 拜耳医药保健有限公司(Bayer HealthCare LLC)

<120> 针对组织因子途径抑制剂(TFPI)的优化的单克隆抗体

<130> BHC 10 5 001 PCT

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Gln 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 Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Arg Gly Ser Ser Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Lys Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 108

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 123

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

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

<210> 4

<211> 114

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

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

35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala 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
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr		
85	90	95
Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110

Arg Thr

<210> 5

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 5

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

Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 6

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 6

Gln 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 Arg Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Arg Gly Ser Arg Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 7

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Val Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Asp Arg Gly Ser Arg Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 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 Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Val Tyr Arg Tyr Trp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 12

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 13

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

<210> 14

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 14

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

<210> 15

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 16

```

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

```

	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	
<210> 17			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 变体 (Variant)			
<400> 17			
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala			
	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe			
	35	40	45
Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met			
65	70	75	80
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Trp Ser Ser Thr Pro Val			
	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln			
	100	105	
<210> 18			
<211> 108			
<212> PRT			
<213> 人工的			
<220>			
<223> 变体 (Variant)			
<400> 18			
Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln			
1	5	10	15
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala			
	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe			
	35	40	45
Tyr Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60

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

<210> 21

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 21

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

<210> 22

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 22

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

<210> 23

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 23

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Ser Asp Lys His Trp Gly Phe Asp Asp
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 24

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 24

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp
 20 25 30

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

Trp Leu Gly Ile Ile Tyr Lys Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Arg Tyr Ala
 50 55 60

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

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
 85 90 95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp His Ser Asp Lys His Trp Gly Phe Asp Asp
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 25

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asp
 20 25 30

Ser Ala Ala Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu

<223> 变体 (Variant)

<400> 27

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

Arg Thr

<210> 28

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 28

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

Arg Thr

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 29

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

Arg Thr

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 30

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

35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Gly Ser Asn Arg Ala 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
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr		
85	90	95
Asp Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
100	105	110

Arg Thr

<210> 33

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 变体 (Variant)

<400> 33

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

Arg Thr

<210> 34

<211> 114

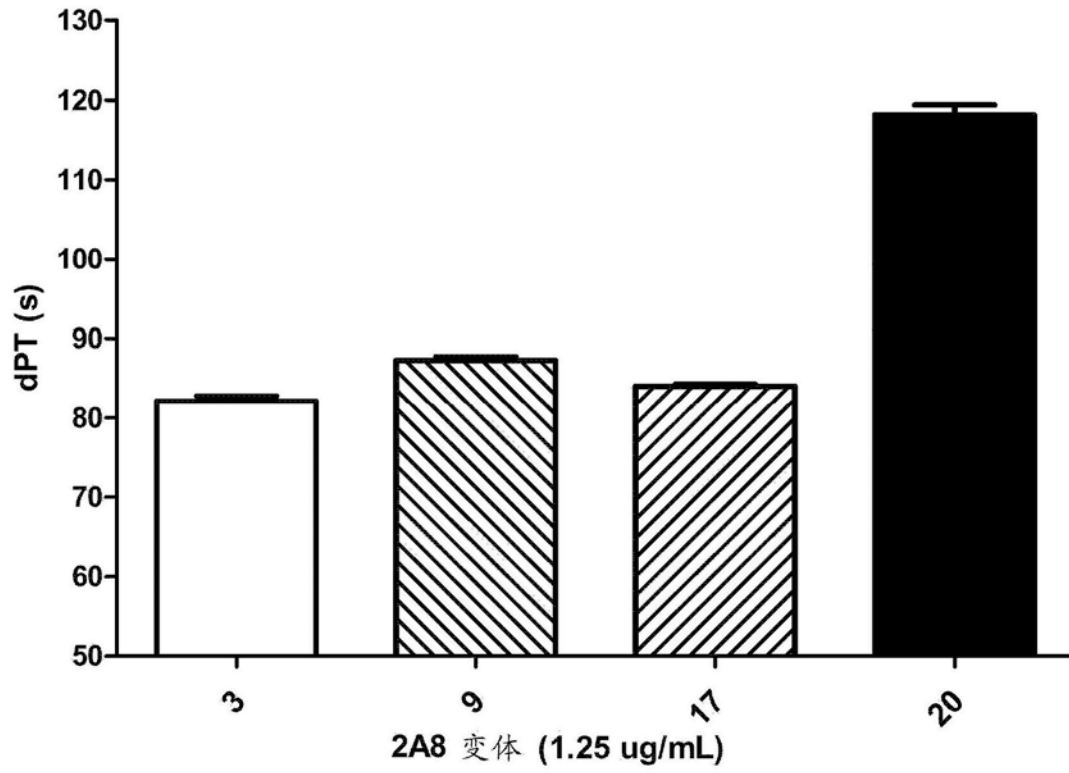
<212> PRT

<213> 人工的

<220>

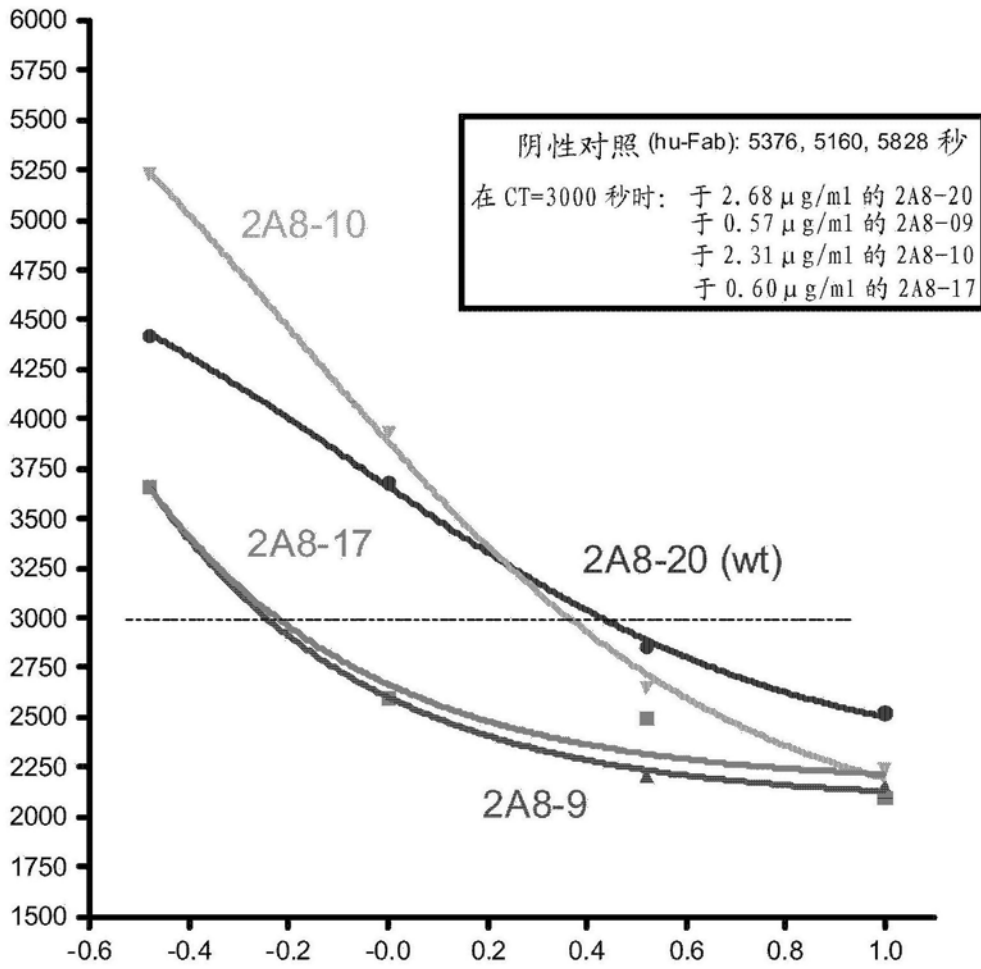
<223> 变体 (Variant)

<400> 34



号	克隆	样品
3	HC_S31V	2A8-3
9	HC_K99L	2A8-9
17	LC_D91W	2A8-17
20	野生型	2A8

图1

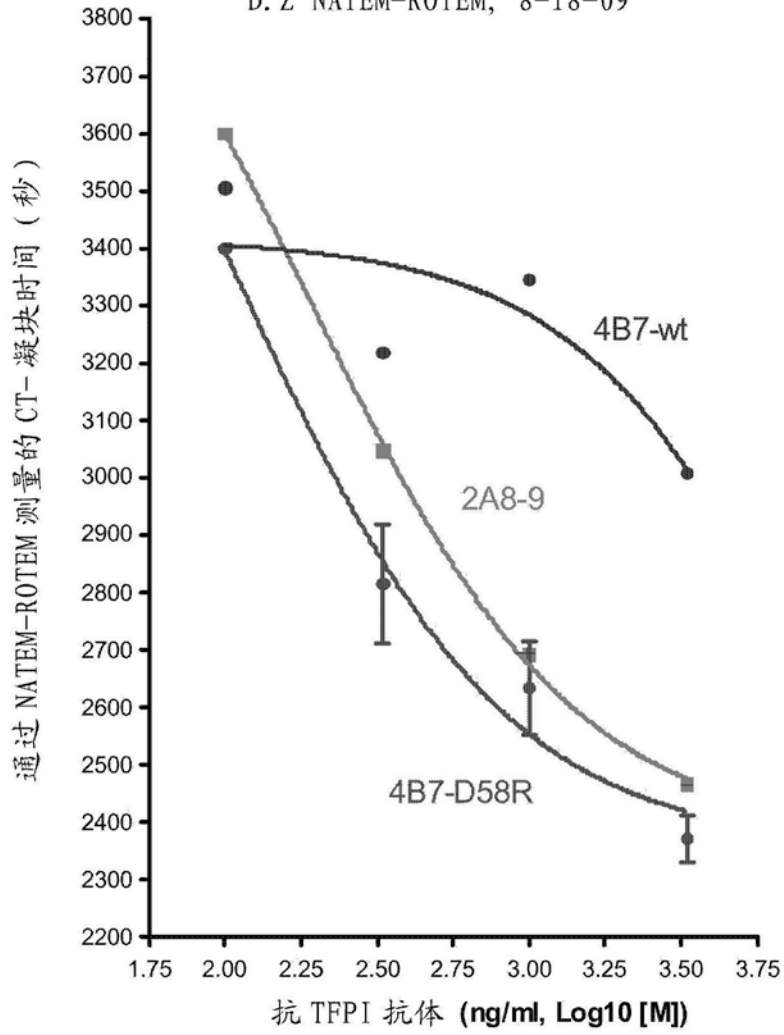


号	克隆	样品
9	HC_K99L	2A8-9
10	HC_K99V	
17	LC_D91W	2A8-17
20	野生型	2A8

图2

抗 TFPI 抗体在 Hem-A 小鼠全血中的凝固活性

自腔静脉出血的 Hem-A 小鼠全血的合并,
D. Z NATEM-ROTEM, 8-18-09



样品	克隆
2A8-9	HC_K99L
4B7-D58R	HC_D62R
4B7	野生型 4B7

图3

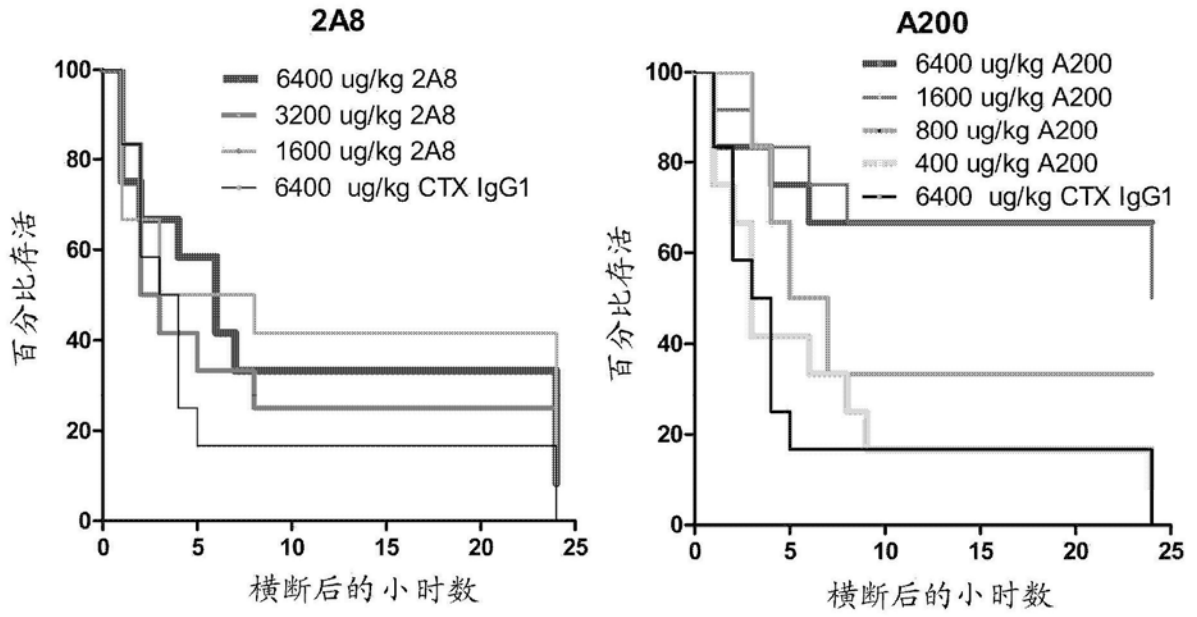


图4

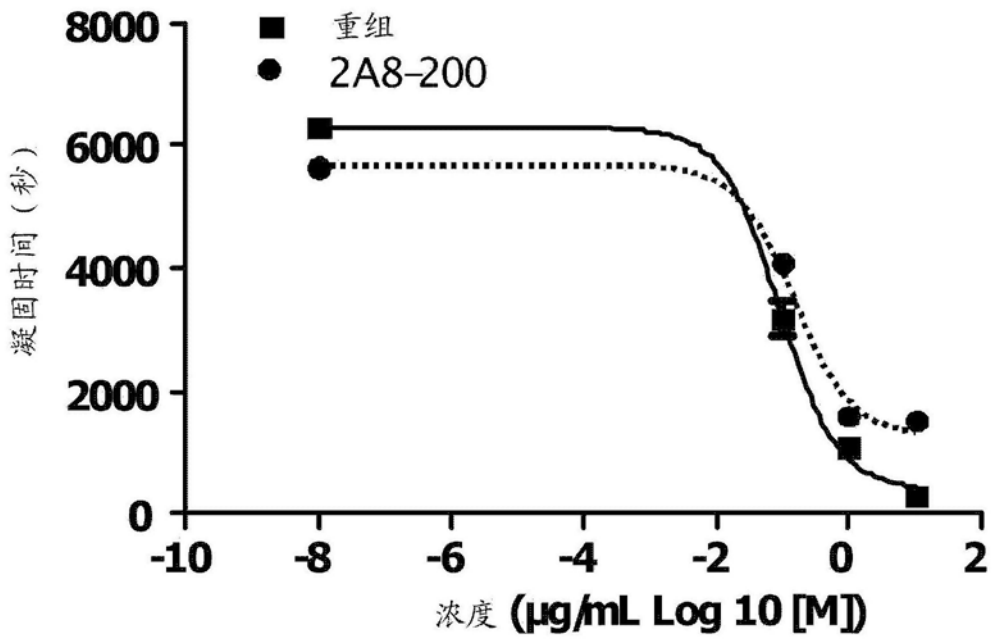


图5