



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1863556 B

(45) 授权公告日 2012.05.16

(21) 申请号 200480023802.9

(22) 申请日 2004.06.04

(30) 优先权数据

60/480,254 2003.06.19 US

60/538,892 2004.01.22 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.02.20

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2004/017900 2004.06.04

(87) PCT申请的公布数据

W02005/004793 EN 2005.01.20

(73) 专利权人 吉宁特有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 J·焦 H·C·王 J·O·伊根

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
72001

代理人 周慧敏 王景朝

(51) Int. Cl.

A61K 39/40(2006.01)

A61K 39/42(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

C12P 21/08(2006.01)

C07K 16/00(2006.01)

(56) 对比文件

US 5986065 A, 1999.11.16,

审查员 温庭江

权利要求书 3 页 说明书 37 页

序列表 51 页 附图 16 页

(54) 发明名称

用于治疗凝血相关紊乱的组合物和方法

(57) 摘要

本发明公开了在哺乳动物中预防或治疗脓毒病、脓毒病相关状态或炎性疾病的方法。在一种实施方式中,所述方法包括:向所述哺乳动物施予治疗有效量的至少一种能与组织因子(TF)特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或其片段,其中,因子X或因子IX与所述复合体的结合受到抑制,所述施予足以在所述哺乳动物中预防或治疗所述脓毒病。本发明具有广泛的应用,其包括:治疗脓毒病、与脓毒病相关的紊乱以及炎性疾病,例如,关节炎。

1. 至少一种人化抗体或嵌合抗体在制备用于在哺乳动物中预防或治疗急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的药物中的用途, 其中所述抗体包含轻链和重链的互补决定区 (CDR), 其中所述轻链和重链具有下列氨基酸序列: 轻链 CDR1 :SEQ ID NO. 5 ;

轻链 CDR 2 :SEQ ID NO. 6 ;

轻链 CDR 3 :SEQ ID NO. 7 ;

重链 CDR 1 :SEQ ID NO. 8 ;

重链 CDR 2 :SEQ ID NO. 9 ;

重链 CDR 3 :SEQ ID NO. 10

其中所述至少一种人化抗体或嵌合抗体与组织因子 (TF) 特异性结合以形成复合体, 并且其中因子 X 或因子 IX 与所述复合体的结合受到抑制, 并且所述抗体不阻断 TF 和因子 VIIa 之间的相互作用。

2. 至少一种人化抗体或嵌合抗体在制备用于在哺乳动物中预防或治疗急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的药物中的用途, 其中所述抗体包含轻链和重链的互补决定区 (CDR), 其中所述轻链和重链具有下列氨基酸序列:

轻链 CDR 1 :SEQ ID NO. 126 ;

轻链 CDR 2 :SEQ ID NO. 127 ;

轻链 CDR 3 :SEQ ID NO. 128 ;

重链 CDR 1 :SEQ ID NO. 185 ;

重链 CDR 2 :SEQ ID NO. 186 ;

重链 CDR 3 :SEQ ID NO. 187

其中所述至少一种人化抗体或嵌合抗体与组织因子 (TF) 特异性结合以形成复合体, 并且其中因子 X 或因子 IX 与所述复合体的结合受到抑制, 并且所述抗体不阻断 TF 和因子 VIIa 之间的相互作用。

3. 至少一种人化抗体或嵌合抗体在制备用于在哺乳动物中预防或治疗急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的药物中的用途, 其中所述抗体包含轻链和重链的互补决定区 (CDR), 其中所述轻链和重链具有下列氨基酸序列:

轻链 CDR 1 :SEQ ID NO. 126 ;

轻链 CDR 2 :SEQ ID NO. 127 ;

轻链 CDR 3 :SEQ ID NO. 128 ;

重链 CDR 1 :SEQ ID NO. 188 ;

重链 CDR 2 :SEQ ID NO. 189 ;

重链 CDR 3 :SEQ ID NO. 190

其中所述至少一种人化抗体或嵌合抗体与组织因子 (TF) 特异性结合以形成复合体, 并且其中因子 X 或因子 IX 与所述复合体的结合受到抑制, 并且所述抗体不阻断 TF 和因子 VIIa 之间的相互作用。

4. 至少一种嵌合抗体在制备用于在哺乳动物中预防或治疗急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的药物中的用途, 其中所述抗体包含轻链可变结构域与重链可变结构域, 所述轻链可变结构域包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列, 所述重链可变结构域包含 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列, 其中所述至少一种嵌合抗体与组织因子 (TF) 特异性结合以形

成复合体,并且其中因子 X 或因子 IX 与所述复合体的结合受到抑制,并且所述抗体不阻断 TF 和因子 VIIa 之间的相互作用。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中,所述抗体展示出以下性质中的至少一种: 1) 关于 TF 的离解常数 ( $K_d$ ) 小于 0.5nM;和 2) 关于 TF 的亲合常数 ( $K_A$ ) 为至少  $3 \times 10^9 M^{-1}$ 。

6. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中,所述抗体具有与从细胞系 H36. D2. B7 获得的抗体相等或更高的对于 TF 的结合特异性,所述从细胞系 H36. D2. B7 获得的抗体以 ATCC 编号 HB-12255 被保藏。

7. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,

其中所述人化抗体的轻链还包含:

- (a) 包含 SEQ ID NO :82 或 94 的序列的第一个构架区域 (FR1);
- (b) 包含 SEQ ID NO :83、91 或 123 的序列的第二个构架区域 (FR2);
- (c) 包含 SEQ ID NO :84、104、108、116 或 120 的序列的第三个构架区域 (FR3);和
- (d) 包含 SEQ ID NO :85、89 或 97 的序列的第四个构架区域 (FR4),并且

其中所述人化抗体的重链还包含:

(a) 包含 SEQ ID NO :129、133、153、157、161、169、173、177 或 181 的序列的第一个构架区域 (FR1);

(b) 包含 SEQ ID NO :130 或 138 的序列的第二个构架区域 (FR2);

(c) 包含 SEQ ID NO :131、143、147 或 151 的序列的第三个构架区域 (FR3);和

(d) 包含 SEQ ID NO :132 或 136 的序列的第四个构架区域 (FR4)。

8. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :82 相比,所述抗体的轻链可变区的第一个构架区域 (FR1) 包含一个或多个下列氨基酸改变:Q11 到 L;L15 到 V;E17 到 D;和 S18 到 R。

9. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :83 相比,所述抗体的轻链可变区的第二个构架区域 (FR2) 包含一个或多个下列氨基酸改变:Q3 到 L 和 K8 到 Q。

10. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :84 相比,所述抗体的轻链可变区的第三个构架区域 (FR3) 包含一个或多个下列氨基酸改变:K14 到 D, K18 到 T, A24 到 P, V28 到 A, 和 N29 到 T。

11. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :85 相比,所述抗体的轻链可变区的第四个构架区域 (FR4) 包含一个或多个下列氨基酸改变:A3 到 Q;和 L9 到 I。

12. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :129 相比,所述抗体的重链可变区的第一个构架区域 (FR1) 包含一个或多个下列氨基酸改变:E1 到 Q;Q5 到 V;P9 到 G;L11 到 V;V12 到 K;Q19 到 R;和 T24 到 A。

13. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :130 相比,所述抗体的重链可变区的第二个构架区域 (FR2) 包含一个或多个下列氨基酸改变:H6 到 P;和 S9 到 G。

14. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :131 相比,所述抗体的重链可变区的第三个构架区域 (FR3) 包含一个或多个下列氨基酸改变:S10 到 T;T11 到 S;F14 到 Y;H16 到 E;N18 到 S;T21 到 R;D23 到 E;和 S25 到 T。

15. 如权利要求 7 所述的用途,其中与 SEQ ID NO :132 相比,所述抗体的重链可变区的第四个构架区域 (FR4) 包含以下氨基酸改变:L7 到 V。

16. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述抗体还包含轻链 FR1、FR2、FR3 和 FR4 以及重链 FR1、FR2、FR3 和 FR4,所述轻链 FR1、FR2、FR3 和 FR4 分别包含 SEQ ID NOs :110 至 113,并且所述重链 FR1、FR2、FR3 和 FR4 分别包含 SEQ IDNOs :161 到 164。

17. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQ ID NO :191 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :192 的重链恒定区。

18. 如权利要求 1-3 任一项所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQ ID NO :193 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :194 的重链恒定区。

19. 如权利要求 4 所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQ IDNO :191 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :192 的重链恒定区。

20. 如权利要求 4 所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQ IDNO :193 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :194 的重链恒定区。

21. 如权利要求 16 所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQID NO :191 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :192 的重链恒定区。

22. 如权利要求 16 所述的用途,其中所述抗体还包含 SEQID NO :193 的轻链恒定区以及 SEQ ID NO :194 的重链恒定区。

23. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中所述抗体还包含具有 IgG1 或 IgG4 同种型的恒定区。

24. 如权利要求 23 所述的用途,其中轻链恒定区包含 SEQID NO :191,并且重链恒定区包含 SEQ ID NO :192。

25. 如权利要求 23 所述的用途,其中轻链恒定区包含 SEQID NO :193,并且重链恒定区包含 SEQ ID NO :194。

26. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中所述抗体是 Fab、Fab' 或 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

27. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中所述抗体是单链免疫球蛋白。

28. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中所述抗体是单克隆抗体。

29. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中所述哺乳动物是灵长类。

30. 如权利要求 29 所述的用途,其中所述灵长类是人类。

31. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中在施予抗体至少 5 小时后,所述抗体削弱哺乳动物中 IL-6、IL-8、IL-1、TNF- $\alpha$  或 TNFR 水平。

32. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中药物中所包含的抗体的量足以将血小板沉着抑制至少 50%。

33. 如权利要求 1-4 任一项所述的用途,其中药物中所包含的抗体的量在 0.01 至 25mg/kg 哺乳动物体重之间。

## 用于治疗凝血相关紊乱的组合物和方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于预防或治疗与对凝血的不想要的激活相关的紊乱的组合物和方法。在一些情况下,凝血作用于某些炎性疾病和相关紊乱。在一个方面,本发明提供了用于治疗此类紊乱的方法,所述方法通过施予治疗有效量的嵌合或人化抗体来进行,所述抗体能与组织因子(TF)特异性结合。本发明具有广泛的重要应用,其包括用于预防或治疗炎症,包括脓毒病和关节炎。

[0002] 发明背景

[0003] 人们对凝血(coagulation)和炎症之间的关系有着日益增加的认识。例如,某些凝血因子被认为能激活前炎性(pro-inflammatory)细胞并引起炎症反应。另一方面,一些前炎性细胞因子已被报道为能诱导TF表达并产生凝血因子。在某些灵长类动物中进行的研究,通过显示出某些抗凝血剂能减少炎症,来支持了这种关系的存在。见

[0004] F. B. Taylor Jr. et al., J. Clin. Invest. 79 :918-925(1987) ;M. Levi et al., J. Clin. Invest. 93 :114-120(1994) ;and M. C. Minnema et al., Blood 95 :1117-23(2000)。

[0005] 关于血液凝固已有很多报道。例如,凝血酶是被相信能提供凝血和炎症之间联系的血液蛋白。大多数凝血酶是通过凝血级联的TF启动来产生的。其它关键的凝血因子包括因子VIIa和因子Xa。凝血酶被认为在前凝血、抗凝血、炎症和促有丝分裂应答中具有多种作用。通常,见

[0006] L. Styer, Biochemistry, 3rd Ed., W. H. Freeman Co., New York ;and A. G. Gilman et al., in The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8<sup>th</sup> Ed., McGraw-Hill Inc., New York。

[0007] 某些有传染性的试剂被认为能妨碍TF启动的凝血级联。幸运的是,凝血级联的局部激活通常能保持对这种妨碍的控制。但是,一些时候,异常的TF表达会导致严重的、可能威胁生命的血栓形成(thrombotic)紊乱。例如,已有人提出,对TF表达的细菌诱导能导致脓毒病(sepsis)、弥散性血管内凝血(DIC)、广泛的纤维蛋白沉着(widespread fibrin deposition)和其它并发症。TF表达的增加被认为是协助这些紊乱发展的重要因素。炎性紊乱发展的例子是急性肺损伤(ALI)到急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发展,接着是涉及其它器官系统,例如肾的进行性损伤,导致脓毒病的进行性更为严重的形式。见,例如, Welty-Wolf, K. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 :1988(2001)。

[0008] 人们已在企图理解凝血相关紊乱,例如脓毒病。

[0009] 例如,脓毒病是用于表征由对感染、损伤或这两者的宿主免疫应答所促进的一系列临床症状(condition)的术语。脓毒病已被描述为凝血、纤维蛋白溶解和炎症的不受控制的级联。在所述级联中的某些步骤,自发扩增过程导致凝血异常、不想要的炎症以及内皮损伤的加速产生。该扩增过程是炎性细胞因子对细胞(例如,内皮细胞和单核细胞)上TF的表达进行正向调节的结果,导致对凝血级联的激活增加,其再依序导致PAR受体的激活以及对炎性细胞因子的产生的正向调节。见

[0010] Osterud, B. et al., *Thrombosis Hemost.* 83 :861(2000) ;Mechtcheriakova,D. et al.,*FASEB J.* 15 :230(2001) ; Shen, B.-Q. et al., *J. Biol. Chem.* 276 :5281(2001)。

[0011] 更具体地,脓毒病已被认为具有下述特征:凝血和炎症的系统性激活。纤维蛋白溶解可被抑制。一些研究已经指向止血不平衡,其被认为能促进,例如,DIC和微血管的血栓形成。它们与相关的指征(indication)被相信能影响到正常的器官功能,其能导致死亡。

[0012] 脓毒病及相关紊乱继而联系到与医院和门诊部(out-patientclinics)接触的病人上。因此,对这些紊乱进行管理是很多健康管理者、临床医生和保险公司的主要关注问题。

[0013] 有报道称,对凝血的不想要的激活是某些炎性疾病的重要特征。例如,血管外纤维蛋白沉着已被发现于具有风湿性关节炎(RA)、肾小球性肾炎(glomerulonephritis)、多发性硬化症、牛皮癣、Sjogren's 综合征和炎性肠病的病人的自身免疫损伤中。见

[0014] Weinberg, et al., *Arthritis Rheum.* 34 : 996-1005(1991) ;Wakefield,et al.,*J Clin Pathol* 47 :129-133(1994) ;Schoph,et al., *ArchDermatol Res* 285 :305-309(1993) ;Zeher, et al., *Clin Immunol Immunopathol* 71 : 149-155(1994) ;More, et al., *J Clin Pathol* 46 :703-708(1993)。

[0015] 此外,提高的TF水平被认为与系统性红斑狼疮相关。见 Segal, et al., *J Rheumatol* 27 :2827-2832(2000). See also Nakano, et al., *Clin Exp Rheumatol* 17 :161-170(1999) ;Morris, et al., *Ann RheumDis* 53 :72-79(1994) ; Furmaniak-Kazmierczak, et al, *J Clin Invest* 94 :472-480(1994) ;Bokarewa, et al., *Inflamm Res* 51 :471-477(2002)。

[0016] 已有建议称,某些炎性征状可通过阻止血栓形成来治疗。见 R. Gordon et al., *The New England Journal of Medicine* 344 :699-709,759-762(2001)。某些抗TF抗体已被报道为对降低某些类型的炎症具有一些帮助。见前文的 Levi, M. et al.。

[0017] 人们已在努力发展能结合凝血因子的抗体。

[0018] 例如, Wong H. et al. 的 U. S. Pat. Nos 5, 986, 065 和 6, 555, 319 以及 PCT/US98/04644(W098/40408) 公开了多种此类抗体。具体而言,提供了对组织因子(TF)具有显著结合亲和性和特异性的鼠抗体、嵌合抗体衍生物以及其片段。嵌合抗原结合分子的使用被相信能降低人类患者中不想要的免疫应答的风险。也见 S. L. Morrison and V. Oi, *Adv. Immunol.* 44 :65(1989) (报道了制造人-小鼠嵌合抗体的方法)。

[0019] 多种方法已被用于制造对于人类来说在免疫学上更能被接受的抗体。一些方法使用了重组DNA技术。例如,一种策略将非人类抗体进行克隆和修饰,以使其更接近类似于人类抗体。总体而言,这些抗体已被称为“人化的”。见 Studnicka et al. 的 U. S Pat. Nos. 5, 766, 886 ;Queen et al. 的 5, 693, 762 ;Waldeman et al. 的 5, 985, 279 ;Winter 的 5, 225, 539 ;Pedersen, et al. 的 5, 639, 641 ;和其中关于制造及使用人化抗体所引用的参考文献。

[0020] 用于制造人化抗体的其它策略也已被报道。见

[0021] E. Padlan *Mol. Immunol.* 28 :489(1991) ;Jones et al., *Nature* 321 : 522-525(1986) ;Junghans et al., *supra* ;and Roguska, et al., *PNAS(USA)* 91 :969(1994)。

还见公开的美国专利申请 2003/0109860A1 和 2003/0082636。

[0022] 还不清楚,现有抗体是否足够强大到能阻止或降低对凝血的不想要的激活。更具体地,还不清楚此类抗体是否足够有效以预防或治疗脓毒病和炎性疾病,例如关节炎。

### 发明内容

[0023] 本发明涉及用于预防或治疗与不想要的对凝血的激活相关的紊乱的组合物和方法。在一个方面,本发明提供了预防或治疗此类紊乱的方法,所述方法通过向哺乳动物施予治疗有效量的嵌合或人化抗体来进行,所述抗体与组织因子(TF)结合。本发明具有一系列广泛的重要应用,包括用于治疗脓毒病以及炎性疾病,例如关节炎。

[0024] 我们已经发现,能与天然人类 TF 最显著的抗原决定部位特异性结合的抗体及其抗原结合片段适于预防或治疗与不想要的对凝血的激活相关的紊乱。优选的抗体和片段与天然人类 TF 特异性结合,基本上不与非天然的或变性的 TF 结合。更为特殊的适合在本发明中使用的抗体和片段与人类 TF 结合,使得因子 X(FX)和因子 IX(FIX)中的至少一种不能与 TF-因子 VIIa 复合体有效结合。额外优选的抗体和片段能降低或阻碍 TF 的功能,典型地,通过降低或阻碍 FX 与 TF 分子结合或接触的路径来实现。适用于本发明的进一步优选的抗体和片段不会显著抑制或阻碍 TF 和因子 VIIa 之间的相互作用或结合,或抑制或阻碍 TF-因子 VIIa 复合体的活性,相对非 FX 或 FIX 的物质而言。

[0025] 如上文讨论的,据信,对凝血的不想要的激活是脓毒病和一系列特定炎性疾病的基础。更具体地,不想要的 TF 介导的凝血被认为在很多情况下起始和/或延长此类紊乱。因此,本发明的目的是提供:与 TF 特异性结合以降低或失活很多(如果不是全部的话)TF 关联的功能的抗体和其片段。此类功能包括但不限于:阻止或抑制 FIX 和 FX 中的至少一种与 TF 复合体结合。不欲受理论束缚的情况下,我们相信,通过阻止或抑制上述因子中的至少一种与 TF 复合体结合,不想要的对凝血的激活可被减少,或者在某些情况下被消除。这即是,通过根据本发明来阻止或抑制此类不想要的过程,相信可能可以预防、治疗或减轻与脓毒病和特定炎性疾病相关联的症状。

[0026] 优选地,此类抗体和其片段是嵌合的或人化的,其通常适于在需要治疗的灵长类动物中使用,尤其在人类患者中。

[0027] 已认识到,脓毒病和相关征状是对感染、创伤或这两者的有效且可能威胁生命的免疫应答所导致的。典型地,脉管系统中的血液经历凝血,导致并发症,例如炎症、弥散性血管内凝血(DIC)、血块凝结(clotting)和器官窘迫(distress)。如果征状未被迅速治疗,在数小时或更短的时间内死亡就会随之发生。在本发明之前,还不清楚:是否有任何抗 TF 抗体或 TF 结合片段足够强大到能预防或治疗脓毒病和相关征状的地步。

[0028] 但是,已经发现,本文所述的抗 TF 结合抗体足够强大(即,足够特异地并恰当亲和地与人 TF 结合),足以抑制或阻止对凝血级联的不想要的激活。还已经发现,此类活性是有好处的,其可被用于预防或治疗脓毒病和相关征状。如下文所讨论的,我们已经发现,此类抗体和片段显示出:在人类脓毒病的体内动物模型中,对炎症、弥散性血管内凝血(DIC)、血块凝结、器官窘迫和相关征状具有良好的削弱作用。

[0029] 还已发现,此类对凝血级联的有效阻止或抑制很有用于预防或治疗某些炎性疾病。不欲被理论束缚的情况下,我们相信,通过用本发明来阻止或降低对凝血的不想要的激

活,可能可以预防、治疗或减轻与炎性疾病中的一种或组合相关联的症状。重要地,本文所述的抗 TF 结合抗体已被发现是足够强大的,足以抑制或阻止对凝血级联的不想要的激活,因此能协助预防、治疗或减轻与关节炎和其它炎性疾病相关联的症状。

[0030] 因此,在一个方面,本发明提供了在哺乳动物中预防或治疗脓毒病和炎性疾病中的至少一种的方法。在一种实施方式中,本发明的方法包括:向哺乳动物施予治疗有效量的至少一种能与人类 TF 特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或它们的片段。更为优选的抗体降低或阻止 FX 和 FIX 中的至少一种与复合体的结合。本发明的方法的实施很有用于预防、治疗或降低与脓毒病和炎性疾病(包括但不限于风湿性关节炎(RA))相关联的症状的严重性。

[0031] 本发明提供了其它重要的用途和优点。

[0032] 例如,我们已经发现,优选的人化抗体、嵌合抗体及其片段能令人满意地阻止 FX 和 FIX 中的至少一种与 TF-FVIIa 复合体的结合。优选地,此类抗体和片段还抑制或阻止复合体对 FX 或 FIX 的激活。令人吃惊地,当在本文提供的人类脓毒病的体内动物模型中进行测试时,此类抗体足够强大,足以预防、治疗或减轻脓毒病和相关并发症的症状。还令人吃惊地,此类优选的抗体和片段足够强大,足以预防、治疗或减轻与特定炎性疾病相关联的症状。重要地,本发明的优选用途已经确定并利用人类 TF 分子上的特定免疫目标(表位),其能被用于预防、治疗或减轻与这些症候(indication)相关联的症状。

[0033] 本发明是灵活的,其可被用于很多种情况下,其中脓毒病和炎性疾病可以是疑似的或占据主要地位的。

[0034] 例如,在一种实施方式中,本发明可被用于医院、诊所和其它医学环境下,其中脓毒病已成为主要的健康问题。尤其成问题的是抗生素抗性微生物(例如,细菌)的出现,其如果存在于血液中,就可以迅速产生脓毒性休克以及相关的并发症。本发明的实施可用于在治疗给予者确定合适的治疗方案时将脓毒病或相关征状维持在被治疗的状态(at bay),或可能地,逆转脓毒病的效果。因此,可以预见到,本发明的一个目的是提供预防或治疗脓毒病的方法,其中,可将本文公开的抗体和片段的施予与一种或多种抗生素的施予组合起来。

[0035] 本发明还发现了在紧急医药环境(例如,救护车、战争)中的用途,其中本文公开的预防和治疗方法可在护理地点施予。因此,在本发明的一种实施方式中,当患者被转移到医院或诊所进行评估和治疗时,可对脓毒病和脓毒病相关征状维持一定的控制。

[0036] 在其它发明实施方式中,本发明可被用于预防、治疗或减少与关节炎尤其是风湿性关节炎相关联的症状。例如,通过阻止或降低对凝血的不想要的激活,现在可能可以减少疼痛炎症、典型地与关节炎相关联的病理性组织毁坏和重构以及相关炎性疾病。

[0037] 在另一个方面,本发明提供了用于进行本发明的方法的试剂盒。在一种实施方式中,该试剂盒包括本文所提供的至少一种人化抗体、嵌合抗体或其片段。

[0038] 本发明还提供了用于在哺乳动物中减少细胞因子产生的方法。在一种实施方式中,所述方法包括:向哺乳动物施予治疗有效量的至少一种与组织因子(TF)特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或它们的片段。优选地,因子 X 或因子 IX 与复合体的结合被抑制,所述施予足以减少哺乳动物中细胞因子的产生。合适的人化抗体、嵌合抗体和其片段是上文和下述讨论及实施例中公开的

[0039] 本发明还提供了预防或治疗哺乳动物中脓毒病相关征状的方法。在一种实施方式中,所述方法包括:向哺乳动物施予治疗有效量的至少一种与组织因子(TF)特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或它们的片段。优选的抗体和片段在本文中有所描述,其包括其中因子X或因子IX与复合体的结合会受到抑制的那些。优选地,所述施予足以在哺乳动物中预防或治疗所述征状。

[0040] 本发明还提供了预防或治疗哺乳动物中脓毒病诱导的贫血症的方法。在一种实施方式中,所述方法包括:向哺乳动物施予治疗有效量的至少一种与组织因子(TF)特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或它们的片段。优选的抗体和片段在本文中有所描述,其包括其中因子X或因子IX与复合体的结合会受到抑制的那些。优选地,所述施予足以在哺乳动物中预防或治疗所述征状。

[0041] 本发明的其它方面见下文讨论。

[0042] 附图说明

[0043] 图1A和1B显示了H36.D2.B7的轻链和重链可变结构域的核酸(SEQ ID NOS:1和3)以及氨基酸(SEQ ID NOS:2和4)的序列,H36.D2.B7是鼠的抗组织因子抗体,其具有以下划线表示的(单下划线用于核酸序列,双下划线用于氨基酸序列)高变区(hypervariableregions)(CDRs或互补决定区域)。

[0044] 图2是显示了人化抗TF IgG1抗体表达载体(pSUN-34)的质图谱的图。

[0045] 图3A-D是抗TF抗体的部分及完全人化的轻链(LC)可变结构域的序列(SEQ ID NO.:82-128)。图3A显示了名为“LC-09”的序列,其代表完全人化的LC框架(SEQ ID NO.:110-113)。cH36和LC-09的轻链CDR序列显示于图3B-D中(分别地,SEQ ID NOS.:126-128)。

[0046] 图4A-D是显示了抗TF抗体的部分及完全人化的重链(HC)可变结构域的序列(SEQ ID NO.:129-190)的图。图4A显示了名为“HC-08”的序列,其代表完全人化的HC框架(SEQ ID NO.:161-164)。cH36和HC-08的重链CDR序列显示于图4B-D中(分别地,SEQ ID NOS.:185-190)。

[0047] 图5A-B是显示IgG1抗组织因子抗体(hOAT)中人类恒定(constant)结构域的序列,其中图5A显示了人类kappa轻链恒定结构域(SEQ ID NO.:191,图5B显示了人类IgG1重链恒定结构域(SEQ ID NO.:192)。所述的图显示了hOAT(IgG1)恒定结构域的氨基酸序列。

[0048] 图6A-B是显示IgG4抗组织因子抗体(hFAT)中人类恒定结构域的序列,其中图6A显示了人类kappa轻链恒定结构域(SEQ ID

[0049] NO.:193),图6B显示了人类IgG4重链恒定结构域(SEQ ID NO.:194)。

[0050] 图7A-D是显示将活的E.coli注入致死性脓毒病模型之后,恒河猴中,血浆IL-6和IL-8(图7A-B)浓度的变化(图7A-B);或IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 浓度的变化(图7C-D)。

[0051] 图8A-C是显示cH36能削弱脓毒病诱导的急性肺损伤(ALI)的图。在这些图中,AaDO<sub>2</sub>以mmHg表示,时间以小时表示,肺系统顺应性(pulmonary system compliance,Cst)以ml/cm水表示,肺动脉压力(PAM)以mmHg表示。

[0052] 图9A-B是显示了狒狒中肾髓过氧化物酶(A)和小肠湿/干重比例(B)的图。

[0053] 图10A-D是显示了cH36能削弱狒狒中脓毒病和相关征状的图。cH36削弱了脓毒

病诱导的凝血病 (coagulopathy) 的图 (纤维蛋白原以 mg/DL 表示, 时间以小时表示, 部分凝血酶原时间 (PTT) 以秒表示; TAT 以微克 /L 表示)。

[0054] 图 11A-B 是显示了通过 cH36 的治疗使得血清 IL-8(A) 和 IL-6

[0055] (B) 的升高被削弱的图。

[0056] 图 12 是显示了通过 cH36 治疗使得支气管肺泡灌洗 (levage) IL-8、IL-6 和 TNFR1 水平的升高被削弱的图。

[0057] 发明详述

[0058] 如上文所讨论的, 本发明提供了预防、治疗或减轻与脓毒病或炎性疾病 (例如关节炎) 相关联的症状的方法。本发明的实施包括: 向需要此类治疗的哺乳动物施予治疗有效量的至少一种人化抗体、嵌合抗体或人类 TF- 结合片段, 以预防或治疗这些疾病和相关征状。

[0059] 已在努力理解脓毒病和脓毒病相关征状的病因。例如, 有一种认为是, 脓毒病级联中的早期事件是被宿主免疫应答诱导的, 因而促进了血管内皮的损伤过程。内皮下结构暴露, 胶原酶被释放出来。表达组织因子 (TF) 的内皮细胞被暴露, 诱发了用于激活凝血级联的外在途径, 并加速了凝血酶的产生。同时, 内皮损伤导致炎症进一步恶化, 导致嗜中性粒细胞激活, 嗜中性粒细胞 - 内皮细胞的黏着以及炎性细胞因子进一步地出现 (elaboration)。这些炎症过程进一步促进了血管内皮障碍。内稳态的内源调节者, 例如蛋白 C 和抗凝血酶 III (ATIII) 被消耗, 其水平变得缺乏, 因为身体在企图回到正常的功能状态。在正常条件下, 内皮表面蛋白质凝血酶调节蛋白 (thrombomodulin) 和内皮蛋白 C 受体 (EPCR), 会激活蛋白 C 及其调节作用。在脓毒病的情况下, 内皮损伤使得凝血酶调节蛋白和 EPCR 的该功能受损, 因此导致失控。如果没有受到反抗的话, 内皮损伤会积累。这种不受控制的炎症和凝血的级联加剧了脓毒病的发展, 对大量患者来说, 导致缺氧、弥散性缺血、器官机能障碍以及最终的死亡。

[0060] 词组“脓毒病相关征状”表示, 那些已知在脓毒病之前、伴随脓毒病或在之后发生的征状, 其包括但不限于, 弥散性血管内凝血 (DIC)、纤维蛋白沉着、血栓形成和肺损伤, 包括急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (ARDS)。能用本发明来预防或治疗的一种特殊的肺损伤的种类是脓毒病诱导的急性肺损伤。见, 例如, Welty-Wolf, et al., Am J. Respir. Crit. Care Med. 164:1988(2001)。还包括在内的有某些伴随脓毒病的肾脏紊乱, 例如急性肾小管坏死 (acutetubular necrosis) (ACN) 和相关征状。

[0061] 急性肺损伤 (ALI) 或急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是持续受到明显关注的严重紊乱。具体而言, ALI 和 ARDS 的重要特征是外源性凝血 (extrinsic coagulation) 的局部激活和对纤维蛋白溶解的抑制。随着损伤的发展, 这些干扰被报道为能导致纤维蛋白在肺的微血管、组织间隙 (interstitial) 和肺泡空间沉着, 导致毛细管闭塞 (capillary obliteration) 和透明膜形成。外源性凝血途径的组分 (例如, 组织因子 (TF)、凝血酶和纤维蛋白) 为炎症细胞交通 (traffic) 的改变和血管渗透性的增加提供信号。前凝血剂 (procoagulant) 和纤维蛋白还被认为能促进损伤中的其它关键事件, 包括补体激活、前炎性细胞因子的产生、对纤维蛋白溶解的抑制和受损的肺的重构。不欲被理论限制的情况下, 据信, 在 ALI/ARDS 期间, 通过降低或阻止肺中这些初始事件 (外源性凝血) 和下游作用 (前炎性事件), 紊乱的纤维蛋白转换 (turnover) 可

被降低或阻止,严重的结构和功能损伤的进展可被降低或防止。凝血阻滞可以在多个位置靶向 TF 因子 VIIa(TF-FVIIa) 复合物,但是这些不同策略对肺损伤发展和炎症的影响仍有待验证。实施例显示了:针对人类 TF 的嵌合单克隆抗体 (cH36) 及其 Fab 片段 (cH36-Fab) 对革兰氏阴性脓毒症凝血初始化的进行阻止以及预防急性肺损伤的用途。

[0062] 本发明在一个实施方式中欲用于:通过降低或阻断凝血级联的关键组分(即,RF)的活性,来预防或治疗脓毒症和脓毒症相关征状(例如,DIC、ALI 和 ARDS)。典型地,优选的人化抗体、嵌合抗体及其片段能与人类 TF 特异性结合,以阻止 FX 或因子 IX 中的至少一种与 TF 复合物结合。典型地,此类优选的抗体和片段还抑制或阻止该复合物的 FX 或 FIX 激活。因此,本发明的组合物和方法通过减少或预防关键分子组分的活性,降低或阻止对凝血级联的不想要的激活。

[0063] 此类优选的抗体与现有的抗体(例如 O'Brien et al. 的 U.S. Pat No. 6, 274, 142 (“142”) 中所提供的那些)不同。例如,142' 专利报道了下述 TF 中和抗体,其不能与因子 VII/VIIa 结合或实现因子 IX 或 X 的蛋白质水解。相反,本发明的优选抗体能显著降低或阻止 FX 或 FIX 中的至少一种与 TF 复合物结合。还见 PCT/US01/07501(W001/70984)。

[0064] 如前所述,不想要的凝血激活是某些炎症疾病的突出特征,特别是那些与自身免疫相关联的。见

[0065] Weinberg, et al., Arthritis Rheum. 34 :996-1005(1991); Kincaid-Smith, Kidney Int 7:242-253(1975); Wakefield, et al., J Clin Pathol 47:129-133(1994); Schoph, et al., Arch Dermatol Res 285:305-309(1993); Zeher, et al., Clin Immunol Immunopathol 71:149-155(1994); More, et al., J Clin Pathol 46:703-708(1993)。提高的 TF 水平已被报道与系统性红斑狼疮中的疾病活性相关联。见 Segal, et al., J Rheumatol 27:2827-2832(2000)。因此本发明的一个目的是帮助控制组织因子介导的凝血,由此降低或在某些情况下阻止炎症、病理性组织毁坏以及不想要的重构,后者是多种炎症性疾病的特点。

[0066] 词组“炎症性疾病”(包括其复数形式)表示与不想要的 TF 介导的凝血激活相关联的病理性征状。优选的炎症性疾病通常与已知的或疑似的自身免疫征状相关联。典型地,如标准方法所测定的,此类疾病还与增加的前炎症细胞因子和/或趋化因子的产生相关联。此类细胞因子的例子包括 IL-1、TNF $\alpha$ 、GM-CSF、M-CSF、IL-6、LIF、IL-15、IFN $\alpha$  和 IL12。此类趋化因子的例子包括 IL-8、MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1 $\beta$ 、MCP-1、ENA-78 和 PANTES。典型地,但非排除性地,新血管形成和血管外纤维蛋白沉着中的一种或多种与炎症性疾病相关联。根据本发明的炎症疾病的更具体的例子包括关节炎,优选地,风湿性关节炎(RA);肾小球性肾炎、多发性硬化症、牛皮癣、Sjogren's 综合征和炎症肠病。关节炎可通过下述特征中的一种或其组合很容易地检测到,所述特征包括:滑膜炎的存在、血管翳形成和软骨破坏。

[0067] 本发明的优选的用途将帮助降低、预防或减轻炎症疾病的症状,典型地,通过减少 TF 介导的凝血激活。此类通过 TF 的激活被相信能带来多种坏处,其包括但不限于:支持炎症分子产生、提高前炎症细胞活性、增加组织的破坏、增加不想要的重构和促进血管形成。本发明因此提供了一种新的基础方法,用于通过提供与 TF 特异性结合并抑制其功能的组合物和方法,来应对炎症性疾病。

[0068] 本发明的实施将特别有助于预防和治疗炎性自身免疫疾病。近来的工作符合该创造性构思。见

[0069] Marty, et al., J Clin Invest 107 :631-640 (2001) ;Varisco, et al., Ann Rheum Dis 59 :781-787 (2000) ;Busso, et al., Arthritis Rheum 48 :651-659 (2003)。

[0070] 如上文讨论的, Wong, H. et al. 的 U. S. Pat. Nos. 5, 986, 065 和 6, 555, 319 和 PCT/US98/04644 (W098/40408) 公开了一系列具有良好的与人类 TF 结合的特性的鼠抗 TF 抗体和抗原结合片段。此类抗体和片段可根据本发明使用。此外, 此类抗体和片段可被用于治疗实验性诱导的脓毒病, 例如, 在相关啮齿类模型中。但是, 以及将被认识到的, 此类鼠抗体和片段通常不适合用于其它哺乳动物中, 例如灵长类, 以及特别是人类受试者。其它合适的抗体和片段由 U. S. Patent Application Publication No. 20030082636、W003/037911 和 W098/40408 公开。

[0071] 词组“抗原结合片段”指抗体的、与抗原特异性结合的至少一部分。此类片段的例子包括抗体 V 结构域。合适的 V 结构域结合配偶体的例子包括 C 结构域及其可接受的片段。其它合适的片段包括 V 结构域的如下部分: 其对 V 结构域而言的组合分子质量 (combined molecular mass) 为大约 15 千道尔顿至大约 40 千道尔顿之间, 优选为大约 20 千道尔顿至大约 30 千道尔顿之间, 更优选地, 大约 15 千道尔顿, 这是通过多种标准方法测出的, 所述方法包括 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳或尺寸排除色谱 (其中使用适当大小的标记片段)、质谱分析或氨基酸序列分析。其它特异性抗原结合片段包括: Fab、F(v)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 和某些单链构建体, 包括抗体 V 结构域。

[0072] 此外, 合适的抗原结合片段包括: 抗原结合 V 结构域的至少一部分单独或其与同源的 (cognate) 恒定 (C) 结构域或其片段的组合 (“同源的 (cognate) 被用于表示相同的免疫球蛋白重 (H) 或轻 (L) 链的两组分之间的关系”)。典型的 C 结构域片段具有大约 5 千道尔顿至大约 50 千道尔顿之间的分子质量, 更优选地, 大约 10 千道尔顿至大约 40 千道尔顿之间, 这是通过多种标准方法测出的, 所述方法包括 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳或尺寸排除色谱 (其中使用适当大小的标记片段)、质谱分析或氨基酸序列分析。此外, 合适的抗原结合片段还在下文以及 Wong H. et al. 的 U. S. Pat. Nos 5, 986, 065 和 6, 555, 319 以及 PCT/US98/04644 (W098/40408) 中公开。还见 U. S. Patent Application Publication No. 20030082636 和下述国际申请: W003/037911 和 W098/40408。

[0073] 如还提到的, 一种用于最小化灵长类动物宿主 (例如人类患者) 的任何潜在的免疫排斥的方法是制造嵌合抗体。词组“嵌合抗体”或相关的词组 (包括复数形式) 指: 本文所公开的抗体, 已用来自属于不同物种 (通常地, 灵长类, 优选地, 人) 的免疫球蛋白基因片断对其轻链和重链基因进行了构建, 典型地, 通过遗传工程来进行。例如, 来自小鼠抗体 (例如 H36) 的基因的可变 (V) 结构域可与人类恒定 (C) 结构域连接, 例如  $\gamma_1$ 、 $\gamma_2$ 、 $\gamma_3$  或  $\gamma_4$ 。典型的治疗用嵌合抗体因此是杂交蛋白, 其由来自小鼠抗体的 V 或抗原结合结构域与来自人类抗体的 C 或效应物 (effector) 结构域构成, 虽然其它哺乳动物物种也可以使用。用于本发明的特别优选的嵌合抗体是下面实施例中公开的抗组织因子抗体 cH36。

[0074] 用于本发明的合适的嵌合抗体可通过已知策略中的一种或组合来制造。如 U. S. Pat. Nos 5, 986, 065 和 6, 555, 319 以及 PCT/US98/04644 (W098/40408) 中所公开的, 可从多种来源容易地获得高度有用的鼠抗 TF 抗体, 包括 American Type Culture

Collection(ATCC,10801University Boulevard, Manassas, VA 20110)。所述抗体已被保藏, ATCC 编号为 HB-12255。或者,可以根据例如 U. S. Pat. Nos 5, 986, 065 和 6, 555, 319 中所公开的程序,从头制备合适的抗体(根据需要,多克隆的或单克隆的)。

[0075] 还见 U. S. Patent Application Publication No. 20030082636 和下述国际申请: W003/037911 和 W098/40408。

[0076] 以 ATCC H36 保藏的抗体在下文中被称为 H36。其还被称为 H36. D2 和 H36. D2. B7。被命名为 H36 的抗体是由母克隆产生的抗体, H36. D2 是从一级克隆获得的, 而 H36. D2. B7 是从二级克隆获得的。在抗体抑制 TF 的能力或其它物理性质的方面, 这三种克隆产生的抗体之间, 没有观察到不同。在普通用途中, H36 通常被用于表示由这些克隆中的任何种类或能生产抗体的相关细胞系产生的抗 TF 抗体。H36 的小鼠-人嵌合版本被称为 cH36(也作 Suno1-cH36)。关于 H36 抗体的更为具体的信息, 还见 U. S. Pat. No. 5, 986, 065 和 PCT/US98/04644(W098/40408)。

[0077] 优选的嵌合抗体组合了来自合适的抗体(例如 H36)的鼠可变结构域和人类恒定结构域。这种操作通常通过使用标准的核酸重组技术来获得。多种不同种类的此类嵌合抗体可以通过如下方法来制备:包括,例如,通过制造人类可变结构域嵌合体,其中,可变结构域中的部分,尤其是抗原结合结构域的保守区域是人类来源的,仅有高变区是非人类来源的。见

[0078] S. L. Morrison, Science, 229:1202-1207(1985); Oi et al., BioTechniques 4: 214(1986); Teng et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 80:7308-7312(1983); Kozobor et al., Immunology Today 4:72-79(1983); Olsson et al., Meth. Enzymol. 92:3-16(1983); U. S. Pat. No. 5, 986, 065; 和 PCT/US98/04644(W098/40408)。

[0079] 编码 H36 可变与恒定区域的核酸已被公开于,例如 U. S. Pat No. 5, 986, 065 和 PCT/US98/04644(W098/40408)。还见 U. S. Patent Application Publication No. 20030082636、W003/037911 和 W098/40408。

[0080] 在一种实施方式中,抗 TF 嵌合抗体将包括人类轻链恒定(C)结构域,即,  $C_{\kappa}$ 、 $C_{\lambda}$  或其片段。通常,人化轻链片段将具有大约 80 至大约 250 个氨基酸之间的氨基酸长度,优选地,大约 95 至大约 235 个氨基酸之间,更优选地,大约 104 至大约 225 个氨基酸之间。人化轻链片段的大小可用多种标准方法来测定,包括 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳或尺寸排除色谱(其中使用适当大小的标记片段)、质谱分析或氨基酸序列分析。

[0081] 典型地,用于本发明的方法中的嵌合抗体还包括:具有大约 80 至大约 650 个氨基酸之间的氨基酸长度的人类重链可变(V)结构域,优选地,大约 95 至大约 540 个氨基酸,更优选地,大约 102 至大约 527 个氨基酸,这是通过,例如,标准 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳或尺寸排除色谱(其中使用适当大小的标记片段)、质谱分析或氨基酸序列分析等测定的。

[0082] 编码合适的人类轻链 C 和 V 结构域的核酸序列已被报道。见,例如,

[0083] Kabat et al. in Sequences of Proteins of Immunological Interest Fifth Edition, U. S. Dept. of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office(1991)NIH Publication No. 91-3242; 和 GenBank. 见, the National Center for Biotechnology Information(NCBI)-Genetic Sequence Data Bank(Genbank) at the National Library of Medicine, 38A, 8N05, Rockville Pike, Bethesda, MD 20894. 见,

Benson, D. A. et al., Nucl. Acids. Res. 25 :1 (1997) for amore specific description of Genbank。

[0084] 本文中报道的、用于制造嵌合抗体和其它抗体及片段的合适的重组技术已被公开。通常见

[0085] Sambrook et al. in Molecular Cloning :A Laboratory Manual (2d ed. 1989) ; 和 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, (1989)。

[0086] 对于其中需要针对抗 TF 抗体的最小化免疫应答的一些发明应用而言,制备人化抗体将是有益的。词语“人化”表示下述免疫球蛋白,其包括至少一个人类FR亚群(subset)(优选地,至少两个或三个同样的,更优选地,四个人类FR亚群),以及来自非人类来源的一个或多个CDR,所述来源通常是啮齿类动物,例如大鼠或小鼠的免疫球蛋白。典型地,本发明中优选的人化免疫球蛋白将包括两个或多个CDR,优选为三个。恒定结构域无须存在,但通常其有益于辅助预期用于体内的人化抗体功能。如果存在的话,优选的恒定结构域,与人类免疫球蛋白的恒定结构域高度相同,即,在氨基酸序列上至少大约90%相同,优选地,至少大约95%或更高层次的相同。因此,人化免疫球蛋白的几乎所有部分,可能除了CDR,优选都与天然存在的人类免疫球蛋白序列的相应部分高度相同。

[0087] 用于测定氨基酸序列相同性的方法是本领域内标准的,其包括,视觉观察以及计算机辅助方法,其中使用BLAST和FASTA(可从National Library of Medicine(USA)网页获得)。用于大多数实施方式中的优选的匹配程序可从关于国际ImMunoGeneTics(IMG)数据库的网页获得,用于该实施方式的更为优选的匹配程序是被称为Match的程序,其可从Kabat数据库获得。见G, Wu T. “Kabatdatabase and its application :Future directions”. Nucleic Acids Res. 29 :205-206(2001)。

[0088] 词组“人化抗体”指,包括人化轻链和人化重链免疫球蛋白的抗体。见。前述S. L. Morrison、前述Oi et al.、前述Teng et al.、前述Kozbor et al.、前述Olsson et al. 和前面提到的其它参考文献。因此,“人化抗体片段”表示抗体的一部分,优选地,与抗原特异性结合的部分。

[0089] 可通过下述方法中的一种或组合来人化H36或cH36抗体,所述方法例如见,U. S. Pat. Nos. 5, 766, 886、5, 693, 762、5, 985, 279、5, 225, 539、EP-A-0239400、5, 985, 279和5, 639, 641,或者公开于公开的U. S. 申请号20030190705中的。关于对抗体进行人化的其它信息,还见E. PadlanMol. Immunol. 28 :489(1991) ;Jones et al., Nature 321 :522-525(1986) ;前述Junghans et al. 和Roguska, et al. PNAS(USA)91 :969(1994)。

[0090] 用于本发明的特定的人化抗体及其片段公开于下文中实施例部分。

[0091] 优选的嵌合抗体、人化抗体及其片段能与人类TF特异性结合。术语“特异性结合”或类似的术语表示,本文中公开的、能与另一种分子结合,由此形成特异性结合对的分子。但是,通过,例如,Western印记ELISA、RIA、迁移率变动试验(mobility shift assay)、酶-免疫试验、竞争性试验、饱和试验或本领域内已知的其它蛋白质结合试验所确定的,该分子无法识别或结合其它分子。关于用于探测分子间特异性结合的方法的例子,通常见,

[0092] Sambrook et al. in Molecular Cloning :A Laboratory Manual (2<sup>nd</sup> ed. 1989) ; 和 Ausubel et al., supra ;and Harlow and Lanein Antibodies :A Laboratory

Manual(1988)Cold Spring Harbor, New York

[0093] 用于本发明的特别合适的嵌合抗体、人化抗体和片段具有下述特征中的至少一个:1) 关于 TF 的离解常数 (dissociation constant,  $K_d$ ) 小于大约 0.5nM; 和 2) 关于 TF 的亲合常数 ( $K_a$ ) 小于大约  $10 \times 10^{10} M^{-1}$ 。进行此类试验的方法是本领域内已知的, 其包括酶联免疫吸附试验 (ELISA)、酶免疫试验 (EIA)、放射性免疫试验 (RIA) 和 BIAcore 分析。

[0094] 此外合适的抗体将能在有时本文中称为“标准体内脓毒性休克试验 (standard in vivo septic shock assay)”中增加存活时间。通常, 此类试验包括将革兰氏阴性细菌施予猴子, 以诱导脓毒病。见 Taylor et al. J. Clin. Invest. 79:918(1987)。更具体地, E. coli 的剂量 (大约  $10^{10} CFU/kg$ ) 是新鲜制备的, 以 1-2 小时的间隔, 通过静脉内将其施予灵长类动物, 例如狒狒或恒河猴。对对照组进行盐水或 PBS 注射。对治疗组而言, 在注入细菌前, 例如, 少于约 1 小时以前, 快速推注至少 1mg/kg 抗体, 优选地, 大约 10mg/kg。然后对对照和治疗组的猴子进行大约一周的监测, 检查其存活状况。关于标准体内脓毒性休克试验的更为详细的信息, 见下述实施例。

[0095] 本发明的一种优选方法中使用: 能将猴子的存活时间 (小时或天) 提高至少大约 2 倍的人化抗体、嵌合抗体或片段, 优选地, 至少大约 3 倍, 更优选地, 至少大约 5 倍至 10 倍或更高, 这是通过标准体内脓毒性休克试验来测得的。

[0096] 用于本发明的其他合适的抗体能在施予抗体至少大约 5 小时后, 削弱 (降低) 受试哺乳动物血浆中白细胞介素-6 (IL-6) 和白细胞介素 (IL-8) 中至少一种的存在。用于从血浆中探测 IL-6 和 IL-8 以及对其进行定量的方法是已知的, 其包括免疫方法, 例如 RIA、EIA、ELISA 等。

[0097] 在一种方法中, 以上文提到的方式在合适的灵长类动物中诱导脓毒病, 例如猴子, 以及, 优选地, 狒狒。在 (用大约  $10^{10} CFU/kg$  E. coli 或盐水) 对对照狒狒进行接种之前, 对治疗组快速推注至少 1mg/kg 抗体, 优选地, 大约 10mg/kg, 这在注入细菌前, 例如, 在注射接种体前少于 1 小时内进行。通过标准方法来监测狒狒的存活情况以及血浆中 IL-6 和 IL-8 的水平。

[0098] 在另一种方法中, 用被描述为“致敏脓毒病模型 (primed sepsismodel)”的模型, 在合适的灵长类动物, 例如狒狒中诱导类似脓毒病的征状 (见 Welty-Wolf, K. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1988(2001), 进一步的细节还描述于实施例 4 中)。

[0099] 在用标准凝血酶原 (PT) 时间试验进行测定时, 尤其是将抗体或片段施予哺乳动物大约 5 分钟之后, 其他优选的人化抗体、嵌合抗体及其片段展示出大约 50 至大约 350 秒之间的血液凝固时间。特别有用的 PT 试验已被公开于例如 U. S. Pat. Nos 5,986,065 和 6,555,319 以及 PCT/US98/04644 (WO 98/40408) 中。

[0100] 通过标准血小板沉着试验进行测定时, 根据本发明使用的还优选的抗体抑制了血小板沉着的至少大约 50%。用于进行所述试验的方法已被公开于, 例如, 未决的 U. S. Pat. 申请 10/310,113 中。

[0101] 此外还优选的抗体能在实验小鼠模型中抑制胶原诱导的关节炎。见实施例 5。

[0102] “抗体”、“用于本发明的抗体”等词组指: 能与目标抗原结合的完整免疫球蛋白以及具有免疫活性的片段。免疫球蛋白及其具有免疫活性的 (抗原结合) 片段包括表位结合位点 (即, 能与识别抗原的抗体特异性结合的位点或表位)。示例性的抗体片段包括, 例如,

Fab、F(v)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 片段,通过减少免疫球蛋白的二硫键获得的“半分子”,单链免疫球蛋白或其它合适的抗原结合片段(见,例如 Bird et al., Science, 242:423-426(1988); Huston et al., PNAS, (USA), 85:5879(1988); Webber et al., Mol. Immunol., 32:249(1995))。

[0103] 本发明的特定嵌合或人化抗体根据需要可以是多克隆的或单克隆的,其可以具有(不对其进行限制)IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 同种型(isotype) 或 IgA、IgD、IgE、IgM。用于本发明的尤其优选的抗体具有或可被加工为具有 IgG1(被称为“hOAT”)或 IgG4(被称为“hFAT”)同种型。此类抗体根据需要可以是多克隆的或单克隆的,以达到特定发明实施方式的目的。在一些情况下,单链抗体,例如人化单链将是优选的。

[0104] 本发明的实施可用于广泛范围的哺乳动物。优选地,所述哺乳动物是灵长类动物,例如,猴子、黑猩猩或狒狒。更优选地,灵长类动物是需要本文公开的方法的人类患者,即具有或疑似具有脓毒病或脓毒病相关征状或炎性紊乱(disorder) 或疾病的个体。

[0105] 如上面所讨论的,本发明的抗体及其合适的片段可被施予哺乳动物,优选地,灵长类动物,例如人类,以预防或减少脓毒病和相关并发症。根据一种实施方式,此类抗体与一种或多种药学上可接受的非毒性载体共同使用,所述载体例如是灭菌水或盐水、二元醇例如聚乙二醇、植物来源的油等。具体而言,具有生物相容性、生物可降解性的丙交酯聚合物,丙交酯乙交酯共聚物或聚氧乙烯,聚氧丙烯共聚物可以是有用的赋形剂。其它可能有用的施予系统包括:乙烯乙酸乙烯共聚物颗粒、渗透泵和可植入的灌注系统(infusion system) 和脂质体。如果需要的话,一种或多种合适的抗体或片段将是溶液或悬浮液形式的(或可重构为溶液或悬浮液的冻干形式),并将优选包括大约 0.01%至 10% (w/w) 的本发明的抗体,优选地,大约 0.01%至 5% (w/w) 的抗体。

[0106] 如所讨论的,可根据本发明,将抗体或片段作为唯一活性试剂施用或与已知的其它抗脓毒病效法一起施用。例如,此类抗体或片段可在用一种或多种合适的抗生素干预(典型地,广谱静脉给药抗生素疗法)之前、之中或之后施予。优选的抗生素包括那些已知具有广谱抗微生物活性的抗生素,涵盖抗革兰氏阳性、革兰氏阴性以及厌氧细菌。因此,在一种实施方式中,在施予本文公开的抗体及片段期间或之后,给予此类抗生素,优选地,肠道外给予,剂量为足以获得杀菌血清水平。在对患者进行稳定之后,多种被认可的辅助疗法(supportive therapies) 可被用于帮助痊愈,例如施予氧气、静脉注射液和增加血压的药物。透析在肾衰竭的事件中可能是必需的,如果发生了呼吸衰竭,机械换气通常是需要的。

[0107] 具有脓毒病和相关征状发生“风险”的人包括但不限于:非常老和非常年轻的个体。还处于风险中的是具有被攻击的免疫系统(challenged immune systems) 的那些个体,例如,感染有 DNA 或 RNA 病毒,例如 HIV 或疱疹的患者。几乎任何的细菌生物都能导致脓毒病。某些真菌和(很少见)病毒能促进脓毒病和相关征状。通常,细菌或真菌释放的毒素能导致直接的器官(例如,肺、肾)或组织损伤,并可导致低血压和/或器官功能不良。这些毒素还使得身体产生严重的炎性应答,其能导致脓毒性休克。

[0108] 其它风险因素包括潜在的病症,例如糖尿病,血癌(淋巴瘤或白血病);以及泌尿生殖系统、肝或胆系统和肠系统的其它恶性肿瘤和疾病。其它的风险因素是新近感染、长时间的抗生素疗法以及被暴露于新近的侵袭性手术或药物方案。脓毒病和相关征状的征状是本领域内已知的,其包括但不限于,发热、寒战、头昏眼花、呼吸短促、心悸、发凉和/或

苍白的手足、发热、焦躁 (agitation)、嗜睡和精神混乱。

[0109] 使用方法中的一种或组合,治疗给予者可对本发明用于预防或治疗脓毒病和相关征状的成功进行评估。典型地,前述症状中的一种或多种被减轻或消除可被作为脓毒病或相关征状已被处理的标志。优选地,获得此类治疗的患者存活时间是未获得此类干预的患者的至少约两倍。

[0110] 如所讨论的,本发明提供了用于在哺乳动物中减少细胞因子产生的方法,例如,通过向哺乳动物施予治疗有效量的至少一种能与组织因子 (TF) 特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或其片段来实现。优选地,哺乳动物中,因子 X 或因子 IX 与复合体的结合被抑制,该施用足以降低细胞因子的产生。合适的人化抗体、嵌合抗体或其片段公开于本文中。用于在哺乳动物中监测细胞因子产生的可接受的方法是已知的,其包括实施例部分列出的特定方法。

[0111] 根据本发明的治疗用抗体和片段可被用于非肠道或静脉内施予,特别是以液体溶液的形式。此类组合物可以方便地以单位剂量施予,可根据制药学领域已知的方法来制备。见 Remington's Pharmaceutical Sciences, (Mack Publishing Co., Easton PA, (1980))。术语“单位剂量”指,物理分散单位中的本发明的治疗组合物,其适合作为单位剂量用于灵长类动物,例如,人类,每个单位含有计算出能产生想要的治疗效果的预先确定量的活性物质以及所需的稀释剂和载体。单位剂量取决于多种因素,包括:将被治疗的脓毒病的类型和严重程度、个体的普通健康状况、治疗历史等。典型地,将被施予的抗体的精确量可由医生的判断来决定,但是,单位剂量通常将取决于施予途径,其在每天 10ng/kg 体重至 50mg/kg 体重的范围内,更典型地,在每天 100ng/kg 体重至 10mg/kg 体重的范围内。用于强化注射中的最初施予的合适方案也是可变的,但是下述方案是典型的:最初的施予,接着是通过随后的注射或其它施予进行的以一个或多个小时为间隔的重复剂量。或者,可进行足够的连续或间歇静脉内输注,以保持血液中抗体(或合适的片段)的浓度在至少大约 10 纳摩尔/升至 10 微摩尔/升之间。

[0112] 优选地,用于本发明的抗体和片段在用于公开的方法和试验中时,是相当纯的。抗体是“相当纯的”表示,已与天然情况下伴随其的组分分离开的抗体或蛋白质。例如,通过使用标准免疫亲和或蛋白质 A 亲和纯化技术,可用天然 TF 作为抗原或蛋白质 A 树脂,从杂交瘤或细胞培养基中纯化出本发明的抗体。类似地,通过使用本发明的抗体,用标准免疫亲和纯化技术,可以获得相当纯的形式的天然 TF。具体而言,当总蛋白中的至少 50% (给定样品中,总蛋白的重量%) 是本发明的抗体或蛋白质时,抗体或蛋白质就是相当纯的。优选地,抗体或蛋白质占总蛋白的至少 60 重量%,更优选地,至少 75 重量%,进一步更优选地,至少 90 重量%,最优选地,总物质的至少 98 重量%。纯度可以通过已知方法容易地测得,例如,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)、柱色谱(例如亲和色谱、尺寸排除色谱)、质谱或 HPLC 分析。优选地,抗体和片段将以灭菌形式使用。

[0113] 本发明的抗体的分子量将根据多种因素变动,例如,其预期的用途,抗体是否包括缀合的 (conjugated) 或重组融合的毒素、药物、放射性同位素或可探测到的标记等。分子量还将根据对抗体进行的翻译后修饰(如果存在的话,例如糖基化)的本质和程度而有所变动。修饰是下述宿主的功能,所述宿主包括用于与产生非糖基化抗体的 *E. coli* 一起表达的宿主和产生糖基化抗体的真核宿主,例如哺乳动物细胞或植物。通常,本发明的抗体将具

有大约 20 至 150kDa 之间的分子量。此类分子量可以通过分子尺寸方法,例如 SDS-PAGE,接着进行蛋白质染色或 Western 印记分析容易地测定。

[0114] 可将前述用于制造人化 cH36 抗体的方法容易地改造以制造根据本发明的其它人化抗体和抗原结合片段,这是显而易见的。

#### [0115] A. 制备人化抗组织因子结合抗体

[0116] 人化抗组织因子结合抗体的制备和用途被描述了。还见下面的实施例 1-3。

[0117] 简言之,优选的抗体与人类组织因子结合,以形成结合复合体。组织因子可以是天然存在的或重组的人类组织因子 (rhTF)。优选地,因子 X 或因子 IX 与复合体的结合受到抑制。在一种优选的发明实施方式中,人化抗体具有小于大约 1nM 的针对 hTF 的表观亲合常数 ( $K_A, M^{-1}$ ), 优选地,小于大约 0.5nM,更优选地,在大约 0.01nM 至大约 0.4nM 之间。关于测定人化抗体的亲合常数的更多信息,见下文实施例 1-3。“特异性结合”指,用标准免疫技术,例如 RIA、Western 印记或 ELISA 进行测量时,人化抗体与 TF (或 rhTF) 形成可被探测到的结合复合体,而不与其它抗原结合。

[0118] 更优选的根据本发明制造的人化抗 TF 结合抗体,通过表面等离子 (surface plasmon) 分析 (具体而言,根据下文中实施例 3 的方案的 BIAcore 分析) 进行测定时,展示出至少大约  $1 \times 10^8 M^{-1}$  的针对天然人类 TF 的表观亲合常数 ( $K_A, M^{-1}$ ),更优选地,通过表面等离子分析进行测定时,至少大约  $5 \times 10^8 M^{-1}$ ,又更优选地,通过表面等离子共振分析进行测定时,针对天然人类 TF 的表观亲合常数 ( $K_A, M^{-1}$ ) 为至少大约  $3 \times 10^9 M^{-1}$ 。本发明抗体的上述相当高的结合亲合性与以前报道的抗体的低得多的结合亲合性明显相反。

[0119] 已通过本发明的方法人化的特定组织因子结合抗体,即 H36. D2. B7 的核酸 (SEQ ID NOS. 1 和 3) 和氨基酸 (SEQ ID NOS. 2 和 4) 序列。例如,见附图的图 1A 和 1B,以及 PCT 申请 W098/40408。SEQ ID NOS. 1 和 2 分别是轻链可变结构域的核酸和氨基酸序列,SEQ ID NOS. 3 和 4 分别是重链可变结构域的核酸和氨基酸序列,在所有这些序列中,用下划线表示高变区 (CDRs 或互补决定区域)。

[0120] 本发明的其它组织因子结合人化抗体将与图 1A 和 1B 所示的轻链或重链的其中之一或全部具有高度的氨基酸序列相同性。更具体地,此类抗体包括与 SEQ ID NOS. 2 和 / 或 4 具有至少大约百分之七十的同源性 (氨基酸序列相同性) 的那些,更优选地,与 SEQ ID NOS. 2 和 / 或 4 具有大约百分之八十或更高同源性,进一步更优选地,与 SEQ ID NOS. 2 和 / 或 4 具有大约百分之八十五、九十或九十五或更高同源性。

[0121] 本发明的更特殊的组织因子结合人化抗体将与 SEQ ID NOS. 2 和 4 的高变区 (图 1A 和 1B 中的双下划线部分) 具有高度的氨基酸序列相同性。特定抗体将具有轻链可变结构域上的一个、两个或三个高变区,其与 H36. D2. B7 的轻链可变结构域的一个、两个或三个相应的高变区具有高度的序列相同性 (至少 90% 或 95% 的氨基酸序列相同性) 或与它们相同, (所述相应的高变区在图 1A 中以下划线表示,还显示于下文中) :

[0122] 1) LASQTID (SEQ ID NO. 5) ;

[0123] 2) AATNLAD (SEQ ID NO. 6) ;和

[0124] 3) QQVYSSPFT (SEQ ID NO. 7) 。

[0125] 能与组织因子结合的、已通过本文所述的方法人化的其它特定的抗体将具有重链可变结构域上的一个、两个或三个高变区,其与 H36. D2. B7 的重链可变结构域的一个、两个

或三个相应的高变区具有高度的序列相同性（至少 90% 或 95% 的氨基酸序列相同性）或与它们相同，（所述相应的高变区在图 1B 中以下划线表示，还显示于下文中）：

[0126] 1) TDYNVY (SEQ ID NO. 8) ;

[0127] 2) YIDPYNGITIYDQNFKG (SEQ ID NO. 9) ; 和

[0128] 3) DVTTALDF (SEQ ID NO. 10)。

[0129] 优选地，编码本文公开的部分或全部抗体或片段的某些核酸将具有足够（优选地，至少大约 100、200 或 250 个碱基对）的长度，以在下述中度严谨的条件（本文中被称为“正常严谨度”条件）下与 SEQ ID NO. 1 和 / 或 SEQ ID NO. 3 的序列结合：在 37°C 的温度下，使用包含溶于 0.9M 盐水 / 0.12M 柠檬酸钠 (6×SSC) 缓冲液中的 20% 甲酰胺的杂交缓冲液，在 37°C 用 2×SSC 缓冲液洗一次的时候，保留结合。

[0130] 更具体地，某些核酸（优选地，至少大约 100、200 或 250 个碱基对）在下述高度严谨条件（本文中被称为“高严谨度”条件）下将与 SEQ ID NO. 1 和 / 或 SEQ ID NO. 3 的序列结合：在 42°C 的温度下，使用包含溶于 0.9M 盐水 / 0.12M 柠檬酸钠 (6×SSC) 缓冲液中的 20% 甲酰胺的杂交缓冲液，在 37°C 用 1×SSC 缓冲液洗两次的时候，保留结合。

[0131] 优选地，合适的核酸包含至少 20 个碱基对，更优选地，至少大约 50 个碱基对，进一步更优选地，本发明的核酸包含至少大约 100、200、250 或 300 个碱基对。

[0132] 本发明的优选的核酸通常将表达本发明的抗体，所述抗体展示出如本文所公开的优选的结合亲和力和其它属性。更多信息还见 U. S. Pat. No. 5, 986, 065 和 PCT/US98/04644 (W098/40408)。

[0133] 其它合适的核酸将与图 1A 和 1B 所示的轻链或重链序列中之任一或全部具有相当高的序列相同性。更具体地，优选的核酸将包含与 SEQ ID NOS. 1 和 / 或 3 具有至少大约百分之七十同源性（核苷酸序列相同性）的序列，更优选地，与 SEQ ID NOS. 1 和 / 或 3 具有大约百分之八十或更高的同源性，进一步更优选地，与 SEQ ID NOS. 1 和 / 或 3 具有大约百分之八十五、九十或九十五或更高的同源性。

[0134] 还有特定的核酸序列将与 SEQ ID NOS. 1 和 3 的高变区（在图 1A 和 1B 中以下划线表示）具有高度的序列相同性。此类核酸包括下述这些：所述核酸用于编码抗体轻链可变结构域，并具有用于编码高变区的一条、两条或三条序列，其与编码 H36. D2. B7 的相应高变区的一条、两条或三条序列具有高度的序列相同性（至少 90% 或 95% 的核苷酸序列相同性）或与它们相同，（这些相应高变区在图 1A 中以下划线表示，还显示于下文中）

[0135] 1) CTGGCAAGTCAGACCATTGAT (SEQ ID NO :11) ;

[0136] 2) GCTGCCACCAACTTGGCAGAT (SEQ ID NO :12) ; 和

[0137] 3) CAACAAGTTTACAGTTCTCCATTACGT (SEQ ID NO :13)。

[0138] 更特定的核酸还编码抗体重链可变结构域，并具有用于编码高变区的一条、两条或三条序列，其与编码 H36. D2. B7 的相应高变区的一条、两条或三条序列具有高度的序列相同性（至少 90% 或 95% 的序列相同性）或与它们相同，（这些相应高变区在图 1B 中以下划线表示，还显示于下文中）：

[0139] 1) ACTGACTACAACGTGTAC (SEQ ID NO. 14) ;

[0140] 2)

[0141] TATATTGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAACTTCA

[0142] AGGGC(SEQ ID NO. 15) ;和

[0143] 3)GATGTGACTACGGCCCTTGACTTC(SEQ ID NO. 16)。

[0144] 用于本发明的方法的结合 TF 的更特定的人化抗体是下述这些：其构架区域 (FRs) 1、2、3 和 4 中的每一个都与图 3A 所示的轻链 FR 序列 (SEQ ID NOS. 81-125)，优选地，图 3A 中以“LC-09”表示的序列具有至少大约 90% 的氨基酸序列相同性，优选地，至少大约 95% 或更高的相同性。此外特定的人化抗体包括轻链恒定结构域，其与图 5A (SEQ ID NO. 191) 或图 6A (SEQ ID NO. 193) 所示的序列具有至少大约 90% 的氨基酸序列相同性，优选地，至少大约 95% 或更高的序列相同性。

[0145] 进一步特定的人化抗体是下述这些：其构架区域 (FRs) 1、2、3 和 4 中的每一个都与图 4A 所示的重链序列 (SEQ ID NOS. 129-184)，优选地，图 4A 中以“HC-08”表示的序列具有至少大约 90% 的氨基酸序列相同性，优选地，大约 95% 或更高的相同性。此外的人化抗体具有重链恒定结构域，其与图 5B (SEQ ID NO. 192) 或图 6B (SEQ ID NO. 194) 所示的序列具有至少大约 90% 的氨基酸序列相同性，优选地，至少大约 95% 或更高的序列相同性。

[0146] 在某些实施方式中，人化抗体将具有如公布的 U. S. 申请号 20030190705 所公开的 IgG1 (hOAT) 或 IgG4 (hFAT) 同种型。

[0147] 本发明还提供了本文公开的人化抗体的功能性片段。此类片段的例子包括但不限于，以小于大约 1nM 的亲合常数 (Kd) 与 TF 结合的那些，优选地，小于大约 0.5nM，更优选地，在大约 0.01nM 至大约 0.4nM 之间。具体优选的是抗原结合 Fab、Fab' 和 F(ab)<sub>2</sub> 片段。

[0148] 如所讨论的，本发明涉及下述人化抗体，其包括至少一种鼠的互补决定区域 (CDR)，例如，CDR1、CDR2、CDR3。在一种发明实施方式中，抗体与人类组织因子 (TF) 特异性结合，形成复合体。典型地，因子 X 或因子 IX 与 TF 或 TF-FVIIa 的结合以及由 TF-FVIIa 对其的活化受到抑制。如上文提到的，优选的 CDR (轻链和重链) 来自啮齿类来源，典型地，来自小鼠。

[0149] 在本发明的人化抗体的一种实施方式中，抗体还包括至少一个人类构架区域 (FR) 亚群。优选地，所有的 FRs (轻链和重链) 都是人类的。

[0150] 在更为特殊的实施方式中，与人类 TF 结合的重链高变区的第一个 CDR (CDR1) 与图 4B 所示的 CDR1 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 185) 至少 90% 相同，优选地，与该序列至少大约 95% 相同或更高。典型地，重链高变区的第二个 CDR (CDR2) 与图 4C 所示的 CDR2 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 186) 至少 90% 相同，优选地，与该序列至少大约 95% 相同或更高。还优选地，重链高变区的第三个 CDR (CDR3) 与图 4D 所示的 CDR3 序列 (SEQ ID NO. 187) 至少 90% 相同，更优选地，与该序列至少大约 95% 相同或更高。

[0151] 在另一种发明实施方式中，与人类 TF 结合的轻链高变区的第一个 CDR (CDR1) 与图 3B 所示的 CDR1 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 126) 至少 90% 相同，优选地，至少大约 95% 相同或更高。典型地，轻链高变区的第二个 CDR (CDR2) 与图 3C 所示的 CDR2 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 127) 至少 90% 相同，优选地，大约 95% 相同或更高。优选地，轻链高变区的第三个 CDR (CDR3) 与图 3D 所示的 CDR3 氨基酸序列 (SEQ ID NO. 128) 至少 90% 相同，更优选地，与该序列至少 95% 相同或更高。

[0152] 适用于本发明方法的其它人化抗体包括：与人类 TF 结合的重链高变区的第一个构架区域 (FR1)，该 FR1 与作为“FR1HC-08”所显示的、图 4A 中的氨基酸序列 (SEQ ID

NO. 161) 至少 90% 相同, 优选地, 与该序列大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, FR1 包含下述氨基酸改变中的至少一种: E1 到 Q; Q5 到 V; P9 到 G; L11 到 V; V12 到 K; Q19 到 R; 以及 T24 到 A。优选地, FR1 包括这些改变中的两种、三种、四种、五种或六种, 具有全部这些氨基酸改变对于很多应用来说是优选的。

[0153] 其它人化抗体适当地与人类 TF 结合, 其包括重链高变区的第二个构架区域 (FR2), 该 FR2 与作为“FR2HC-08”显示的、图 4A 中所显示的序列 (SEQ ID NO. 162) 至少 90% 相同, 优选地, 与该序列大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, 该 FR2 具有下述氨基酸改变中的至少一种: H41 到 P 和 S44 到 G。优选的 FR2 包括这两种氨基酸改变。

[0154] 本发明还涉及对与人类 TF 结合的人化抗体的使用, 其中, 重链高变区的第三个构架区域 (FR3) 与作为“FR3HC-08”所显示的、图 4A 中的序列 (SEQ ID NO. 163) 至少 90% 相同, 优选地, 与该序列大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, FR3 包含下述氨基酸改变中的至少一种: S76 到 T; T77 到 S; F80 到 Y; H82 到 E; N84 到 S; T87 到 R; D89 到 E 和 S91 到 T。优选地, FR3 包括这些氨基酸改变中的两种、三种、四种、五种或六种, 具有全部七种上述氨基酸改变通常是优选的。

[0155] 本发明还涉及适当地与人类 TF 结合的人化抗体, 其中, 重链高变区的第四个构架区域 (FR4) 与作为“FR4HC-08”显示的、图 4A 中所显示的氨基酸序列 (SEQ ID NO. 164) 至少 90% 相同, 优选地, 与该序列至少大约 95% 相同或更高。优选地, FR4 包括如下氨基酸改变: L113 到 V。

[0156] 其它人化抗体与人类 TF 结合, 还涉及轻链高变区的第一个构架区域 (FR1), 其与作为“FR1 LC-09”所显示的、图 3A 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO. 110) 至少大约 90% 相同, 优选地, 与该序列至少大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, FR1 包含下述氨基酸改变中的至少一种: Q11 到 L; L15 到 V; E17 到 D; 和 S18 到 R。优选的 FR1 包括此类氨基酸改变中的两种或三种, 具有全部四种氨基酸改变通常是优选的。

[0157] 本发明还涉及对与人类 TF 结合的人化抗体的使用, 其中, 轻链高变区的第二个构架区域 (FR2) 与作为“FR2LC-09”所显示的、图 3A 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO. 111) 至少大约 90% 相同, 优选地, 与该序列至少大约 95% 相同或更高。优选的 FR2 具有下述氨基酸改变: Q37 到 L。

[0158] 还包括在本发明内的是对与人类 TF 结合的特殊人化抗体的使用, 其中, 轻链高变区的第三个构架区域 (FR3) 与作为“FR3 LC-09”所显示的、图 3A 中的氨基酸序列 (SEQ ID NO. 112) 至少大约 90% 相同, 优选地, 与该序列至少大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, FR3 包含下述氨基酸改变中的至少一种: K70 到 D; K74 到 T; A80 到 P; V84 到 A 和 N85 到 T。优选地, FR3 包括此类氨基酸改变中的两种、三种或四种, 具有全部五种氨基酸改变通常是优选的。

[0159] 其它适用于本文公开的方法的人化抗体能与 TF 结合, 并包括轻链高变区的第四个构架区域 (FR4), 其与作为“FR4LC-09”所显示的、图 3A 中的序列 (SEQ ID NO. 113) 至少大约 90% 相同, 优选地, 与该序列至少大约 95% 相同或更高。在一种实施方式中, FR4 包含下述氨基酸改变中的至少一种, 优选地, 所有的如下改变: A100 到 Q 和 L106 到 I。

[0160] 本发明还涉及前述人化抗体的人类 TF 结合片段。此类片段的例子包括: Fab、Fab' 和 F(ab)<sub>2</sub>。关于根据本发明制造的另外优选的人化抗 TF 抗体, 见公布的 U. S. 申请号

20030190705 和其中引用的参考文献。

[0161] 遵循 Budapest Treaty, 下述三种核酸载体, pSUN36 (人化抗 TF 抗体 Ig G1-HC 表达载体)、pSUN37 (人化抗 TF 抗体 Ig G4-HC 表达载体) 和 pUSN38 (人化抗 TF 抗体 LC 表达载体) 已被保藏于 10801 University Boulevard, Manassas VA 20110-2209 的 American Type Culture Collection (ATCC)。这些载体被分配了如下的编号: PTA-3727 (pSUN36); PTA-3728 (pSUN37) 和 PTA-3729 (pSUN38)。

[0162] 用于制造和使用本发明的抗 TF 抗体的合适的表达和纯化策略已被公开于: 例如公布的 U. S. 申请号 20030190705 中。

[0163] 如所讨论的, 本发明还提供了用于进行本文提供的方法中的一种或多种的有用的试剂盒。在一种实施方式中, 所述试剂盒包括: 至少一种能与人类组织因子 (TF) 特异性结合以形成复合体的人化抗体、嵌合抗体或其片段, 其中因子 X 或因子 IX 与所述复合体的结合受到抑制。还典型地, 人化抗体、嵌合抗体或其片段被提供于药学上可接受的载体 (vehicle) 中, 例如盐水、水或缓冲液。所述试剂盒可以包括药学上可接受的用于在使用前溶解人化抗体、嵌合抗体或其片段的载体。

[0164] 下述非限制性的实施例用于对本发明进行阐述。在下述实施例以及别处中, 将本发明的方法用于对鼠抗组织因子抗体 H36 的人化。见 U. S. Patent Nos. 5, 986, 065 和 6, 555, 319; U. S. Patent Application Publication No. 20030082636; W003/037911 和 W098/40408, 以及公布的 U. S. 专利申请号 20030190705, 和其中引用的参考文献, 以及上述讨论。一些情况下, 为方便的缘故, 将 H36 或 cH36 的 Fab 片段分别称为“H36-Fab”和“cH36-Fab”。

[0165] 本文中提到的所有文件都通过引用的方式被整体完全包括进本文中。

#### [0166] 实施例 1 抗组织因子抗体的人化

[0167] U. S. Pat. Nos. 5, 986, 065 和 6, 555, 319 中描述了怎样制造和使用被称为 H36. D2 (一些时候还称为 H36, 如上所述) 的特定鼠抗体。本实施例显示了怎样制造和使用该抗体的人化版本。人化的 H36 抗体具有多种用途, 包括: 帮助最小化人类抗小鼠抗体 (HAMA) 免疫应答的可能。这些和其它不想要的应答引起了关于在人类治疗应用中使用 H36 抗体的问题。

#### [0168] A. 制备嵌合抗组织因子抗体 (cH36)

[0169] 前述 H36 抗体是 IgG2a 鼠抗体。先将 H36 转化为用于临床发展的小鼠-人类嵌合抗体。为达到该目的, 克隆 H36 的重链和轻链基因 (见 U. S. Patent NO. 5, 986, 065)。将重链可变结构域与人类 IgG4 恒定 (Fc) 结构域融合, 将轻链可变结构域与人类 kappa 轻链恒定结构域融合。得到的 IgG4 $\kappa$  嵌合抗体被命名为 cH36 (也被称为 Sun01-cH36)。就 H36 或 cH36 在具有慢性疾病的患者中的多种用途而言, 完全人化的 cH36 是优选的, 其将能降低或消除任何的人抗嵌合抗体 (HACA) 免疫应答。对 cH36 的人化如下所述。

#### [0170] B. cH36 抗体的人化策略

[0171] 对嵌合抗组织因子抗体 cH36 的人化可以通过本发明的“FR 最好适合 (best-fit)”方法来获得。该方法最大程度上利用了下述事实: 具有已知氨基酸序列或人类 IgG 片段序列的大量的人类 IgGs 是公众数据库中可获得的。cH36 中小鼠重链和轻链可变结构域的个体构架区域的序列与 Kabat 数据库 (see e. g., Kabat et al. in Sequences of Proteins

of Immunological Interest Fifth Edition, U. S. Dept. of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office (1991) NIH Publication No. 91-3242 或 <http://immuno.bme.nwu.edu>。中的相应重链或轻链可变结构域或人类构架（或其片段）的序列相比。下述标准被用于选出用于人化的想要的人类 IgG 构架区域亚群：(1) 错配的氨基酸的个数被保持为尽可能的低。(2) “游标 (vernier)” 区域内部的氨基酸（该区域内的氨基酸可对 CDR 结构进行调节，以及微调与抗原的适合程度，见 Foote, J. and Winter, G., J. of Mol. Bio. 224(2) :487-499 [1992]) 保持不变。(3) 当对相似的候选者进行评价时，保守氨基酸取代是优先的。用于这种比较的匹配程序可在 Kabat 数据库中发现。见 Johnson G, Wu T. “Kabat database and its application: Future directions.” *Nucleic Acids Res.* 29 : 205-206 (2001)。程序发现并比对了 Kabat's 数据库中人类序列与小鼠序列之间的同源性区域。通过使用这种独特的 FR 最好适合方法，可以预见到，目标 IgG 的人化 LC 或 HC 可变结构域可以具有来自至少一种人类 IgG 分子或多达四种不同的人类 IgG 分子的全部四种 FRs。

[0172] B(i). 对人类 IgG Kappa 轻链可变结构域构架区域的选择

[0173] 将 cH36LC 的每个构架区域中的氨基酸序列与 Kabat 数据库中人类 IgG kappa 轻链可变结构域中的 FRs 的氨基酸序列相比。基于上述三个标准来选择最好适合的 FR。

[0174] 具有 Kabat Database ID No. 005191 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36LC FR1 进行人化。具有 Kabat Database ID No. 019308 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36LC FR2 进行人化。在 cH36LC FR1 中制造出下述突变，以与具有 Kabat Database ID No. 015191 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列匹配：Q11 → L, L15 → V, E17 → D, S18 → R。在 cH36LC FR2 中制造出 Q37 → L 的突变，以与具有 Kabat Database ID No. 019308 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列匹配（序列信息见表 1A）。

[0175] 具有 Kabat Database ID No. 038233 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36LC FR3 进行人化。具有 Kabat Database ID No. 004733 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36LC FR4 进行人化。在 cH36LC FR3 中制造出下述突变，以与具有 Kabat Database ID No. 038233 的人类 IgG kappa 轻链可变区的氨基酸序列匹配：K70 → D, K74 → T, A80 → P, V84 → A, N85 → T。在 cH36 LC FR4 中制造出 A100 → Q 和 L106 → I 的两种突变，以与具有 Kabat Database ID No. 004733 的人类 IgG kappa 轻链可变结构域的氨基酸序列匹配（序列信息见表 1B）。

[0176] B(ii). 对人类 IgG 重链可变结构域构架区域的选择

[0177] 将 cH36HC 的每个构架区域中的氨基酸序列与 Kabat 数据库中人类 IgG 重链可变结构域中的 FRs 的氨基酸序列相比。基于上述三个标准来选择最好适合的 FR。

[0178] 具有 Kabat Database ID No. 000042 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36HC FR1 进行人化。具有 Kabat Database ID No. 023960 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列被选出，用于对 cH36HC FR2 进行人化。在 cH36HC FR1 中制造出下述突变，以与具有 Kabat Database ID No. 000042 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列匹配：E1 → Q, Q5 → V, P9 → G, L11 → V, V12 → K, Q19 → R, T24 → A。在 cH36HC FR2 中制造出 H41 → P 和 S44 → G 的两个突变，以与具有 Kabat Database ID No. 023960 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列匹配（序列信息见表 2A）。

[0179] 具有 Kabat Database ID No. 037010 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列被选出,用于对 cH36HC FR3 进行人化。具有 KabatDatabase ID No. 000049 的人类 IgG kappa 重链可变结构域的氨基酸序列被选出,用于对 cH36HC FR4 进行人化。在 cH36HC FR3 中制

[0180] 一旦决定了想要的人类构架区域,下面三种技术就被用于获得轻链和重链中想要的氨基酸取代:(1) 普通 PCR 被用于克隆,以将克隆或诊断用限制性内切酶位点引入,以及以改变定位于可变结构域末端的氨基酸残基。(2) 基于 PCR 的诱变被用于同时改变多个氨基酸位点,尤其是当这些残基位于可变结构域中间的情况下。(3) 定点诱变被用于将一种或两种氨基酸取代同时引入。按照 Stratagene's "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" (Catalog#200518) 来进行定点诱变。

[0181] 每个步骤之后,对经过部分人化的克隆进行测序,稍后将这些可变结构域中的一些克隆进表达载体。质粒 tKMC180 被用于表达 LC 突变体, pJRS 355 或 pLAM356 载体被用于表达 HC 突变体,分别作为 IgG1 或 IgG4。然后将这些克隆中的一些组合起来,在 COS 细胞中短暂表达,以通过 ELISA 来确定表达水平。

[0182] 抗 TF 重和轻可变结构域的最终完全人化的形式被克隆到某些时候在本文中被称为“大载体 (mega vector)”的材料中,并将其转染进 CHO 和 NSO 细胞,用于 IgG 表达。然后用稳定的细胞系来生产足以用于分析的量的入化抗 TF。得到的人化版本是 100% 人类来源的(不考虑 CDR 序列的话)。人化的 IgG4kappa 版本被命名为 hFAT (humanized IgG Fournti-Tissue Factor Antibody, 人化 IgG 四抗组织因子抗体), IgG1 kappa 版本被命名为 hOAT (humanized IgG One Anti-Tissue Factor Antibody, 人化 IgG- 抗组织因子抗体)。cH36 的这些完全人化的版本将被用于治疗慢性指征 (indication), 例如血栓形成、癌症以及炎性疾病。

[0183] C. 产生人化的抗 TF 抗体重链

[0184] 1. 用质粒 pJA1IgG4TF. A8 (用于嵌合 H36 的表达载体) 作为模板,用引物 TFHC1s2 和 TFHC1as2, 来对抗 TF mAb cH36 重链 (HC) 可变结构域进行 PCR 扩增和向 pGem T-easy 中的克隆。引物 TFHC1s2 引入了起始密码子上游的 BsiW1 位点,以及构架 (FR) 1 中的 E1 到 Q 的氨基酸改变。引物 TFHC1as 在 FR4 中引入了 L113 到 V 的氨基酸改变。该步骤产生了构建体 HC01。

[0185] 2. 用前面的构建体 (HC01) 和下述四种引物进行基于 PCR 的诱变,产生了构建体 HC02。上游 PCR 使用引物 TFHC1s2 和 TFHC7as。造出下述突变, 以与具有 Kabat Database ID No. 037010 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列匹配: S76 → T, T77 → S, F80 → Y, H82 → E, N84 → S, T87 → R, D89 → E, S91 → T。在 cH36 HC FR4 中制造出 L113 → V 的突变, 以与具有 Kabat Database ID No. 000049 的人类 IgG 重链可变结构域的氨基酸序列匹配 (序列信息见表 2B)。

[0186] 表 1. 对 cH36 和人类轻链 (LC) FR 序列的比较

[0187] 表 1A (SEQ ID NOS 27-30, 分别按出现顺序)

[0188]

名称	LC-FR1 (23 aa)			LC-FR2 (15 aa)	
	1	10	20	35	49
CH36-LC	DIQMTQSPASQSASLGESVTITC			WYQQKPGKSPQLLIY	
人类 -LC	L V DR			L	
	005191			019308	

[0189] 表 1B (SEQ ID NOS 31-34, 分别按出现顺序)

[0190]

名称	LC-FR3 (32 aa)					LC-FR4 (10 aa)	
	57	60	70	80	88	98	
CH36-LC	GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDEVNYIC					FGAGTKLELK	
人类 -LC	D T P AT					Q I	
	038233					004733	

[0191] 表 2. 对 cH36 和人类重链 (HC) FR 序列的比较

[0192] 表 2A (SEQ ID NOS 35, 195, 36 和 196, 分别按出现顺序)

[0193]

名称	HC-FR1 (30 aa)					HC-FR2 (14 aa)	
	1	10	20	30	36		
CH36-HC	EIQLQQSGPELVKPGASVQVSCKTS GYSFT					WVRQSHGKSLEWIG	
人类 -HC	Q	V	G VK	R	A	P	G
	000042					023960	

[0194] 表 2B (SEQ ID NOS 37-40, 分别按出现顺序)

[0195]

名称	HC-FR3 (32 aa)				HC-FR4 (11 aa)	
	67	75	85	95	107	117
CH36-HC	KATLTVDKSSTTAFMHLNSLTSDSAVYFCAR				WGQGTTLTVSS	
人类 -HC	T S Y E S R E T				V	
	037010				000049	

[0196] 下游 PCR 用引物 TFHC7s 和 TFHC1as2。用上游和下游 PCR 产物作为模板, 使用引物 TFHC1s2 和 TFHC1as2 进行 PCR, 产生了 HC02。用引物 TFHC7s 和 TFHC7as 向 FR2 中引入了两种氨基酸改变: H41 到 P 以及 S44 到 G。

[0197] 3. 用 HC02 作为模板, 用下述四种引物进行基于 PCR 的诱变, 产生构建体 HC03。上游 PCR 使用引物 TFHC1s2 和 TFHC5as2。下游 PCR 用引物 TFHC5s 和 TFHC1as2。用上游和下游 PCR 产物作为模板, 使用引物 TFHC1s2 和 TFHC1as2 进行 PCR, 产生了 HC03。用引物 TFHC5s 和 TFHC5as2 向 FR3 中引入了三种氨基酸改变: T87 到 R、D89 到 E 和 S91 到 T。还在位点 87 引入了 BglIII 位点。

[0198] 4. 用引物 TFHC2s 和 TFHC3as, 用 pGem 中的 HC03 作为模板来进行 PCR 扩增。TFHC2s 位于 pGem 克隆位点的上游。TFHC3as 位于构架 3 中, 在 FR3 中引入了两种氨基酸改变: H82 到 E 和 N84 到 S。将得到的 PCR 条带克隆进 pGem, 然后用 BsiWI 和 BglIII 来消化合适尺寸

的插入物。将该片段克隆进 HC03 产生了 HC04。

[0199] 5. 用 HC04 作为模板以及下述引物进行基于 PCR 的诱变,得到了 HC05。上游 PCR 使用引物 TFHC1s2 和 TFHC6as。下游 PCR 使用引物 TFHC6s 和 TFHC1as2。用上游和下游 PCR 产物作为模板,用引物 TFHC1s2 和 TFHC1as2 进行诱变 PCR,产生了 HC05。该步骤在 FR3 中引入了如下氨基酸改变 :S76 到 T, T77 到 S 和 F80 到 Y。

[0200] 6. 用 HC05 作为模板以及下述四种引物进行基于 PCR 的诱变,得到了 HC06。上游 PCR 使用引物 TFHC2s 和 TFHC2as2。下游 PCR 使用引物 TFHC3s2 和 TFHC1as2。用 TFHC2as2 进行的扩增在 FR1 中引入了氨基酸改变 :P9 到 G。引物 TFHC3s2 将 Q19 改变为 R, T24 改变为 A。用上游和下游 PCR 产物作为模板,用引物 TFHC1s2 和 TFHC1as2 进行 PCR,产生了 HC06。

[0201] 7. 在构建 HC06 期间,自发地引入了 FR1 的位点 2 上从 I 到 M 的点突变。用 HC06 作为模板,用 TFHC1s3 和 TFHC1as2 作为引物进行 PCR 扩增,更正了该错误的取代,还在 FR1 中引入了氨基酸改变 :Q5 到 V。得到的构建体是 HC07。

[0202] 8. 用 HC07 作为模板,和用下述引物通过基于 PCR 的诱变来制造构建体 HC08。TFHC2s 和 TFHC2as3 被用于上游产物。下游产物是用 TFHC1s3 和 TFHC1as2 在前面扩增出来的 (见步骤 7)。用引物 TFHC2as3 在 FR1 中引入两种氨基酸改变 :L11 到 V 和 V12 到 K。自发的点突变导致了 CDR2 的位点 64 上发生了苯丙氨酸向亮氨酸的改变 (F → L)。进一步的筛选和测序产生了构建体 HC08R1,其 CDR2 上的位点 64 处具有正确的序列

[0203] 9. 通过定点诱变,从 HC07 来产生两个构建体 HC11 和 HC12。用 HC07 作为模板,使用两种互补引物 TFHC8sP 和 TFHC8asP 来产生 HC11,其含有 FR1 上的三种氨基酸改变 :G9 到 P, L11 到 V 和 V12 到 K。然后,对 HC11 进行甲基化和柱纯化,用于下一轮定点诱变。用 HC11 作为模板,用互补引物 TFHC9sL 和 TFHC0asL 进行 PCR,产生 HC12,其具有 FR1 中从 V11 到 L 的突变。

[0204] 10. 通过用 HC12 作为模板,用互补引物 TFHC10sK 和 TFHC10asK 进行 PCR,从 HC12 获得构建体 HC09。HC09 含有氨基酸改变 :FR1 中, K12 到 V。

[0205] 11. 从 HC09 来制造构建体 HC10。用 HC09 作为模板,用互补引物 LV-1 和 LV-2 进行 PCR,结果产生了 HC10,其含有 FR1 中的从 L11 到 V 的突变。

[0206] 每个突变步骤之后,对经过部分人化或完全人化的克隆进行测序,稍后将这些可变结构域中的一些克隆进表达载体。将 pJRS355 或 pLAM356 载体用于表达与人类 IgG1 或 IgG4 的 Fc 融合的 HC 突变体。

[0207] 图 3A-D 概括了步骤 1-11,显示了引入到 FR1-4 中的增加的 (incremental) 氨基酸改变。除 HC08 之外,所有其它重链突变体和 cH36 在 CDR2 中都含有位点 64 上的 F。HC08 具有位点 64 上的从 F 到 L 的突变。图 4B-D 显示了重链 CDR 序列。

[0208] 用于重链人化的引物

[0209] (SEQ ID NOS 41-62,分别按出现顺序)

[0210] TFHC1s2

[0211] 5' TTTTCGTACGTCTTGTCCCAGATCCAGCTGCAGCAGTC 3'

[0212] TFHC1as2

[0213] 5' AGCGAATTCTGAGGAGACTGTGACAGTGGTGCCTTGGCCCCAG 3'

[0214] TFHC7s

- [0215] 5' GTGAGGCAG AGCCCTGGAAAGGGCCTTGAGTGGATTGG 3'  
TFHC7as
- [0217] 5' CCAATCCACTCAAGGCCCTTTCCAGGGCTCTGCCTCAC 3'  
TFHC5s
- [0219] 5' GCATCTCAACAGCCTGAGATCTGAAGACACTGCAGTTTATTTCTGTG 3'  
TFHC5as2
- [0221] 5' CTGCAGTGTCTTCAGATCTCAGGCTGTTGAGATGCATGAAGGC 3'  
TFHC3as
- [0223] 5' GTCTTCAGATCTCAGGCTGCTGAGCTCCATGAAGGCTGTGGTG 3'  
TFHC2s
- [0225] 5' TACGACTCACTATAGGGCGAATTGG 3'  
TFHC6s
- [0227] 5' CTGTTGACAAGTCTACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAG 3'  
TFHC6as
- [0229] 5' CTGCTGAGCTCCATGTAGGCTGTGCTGGTAGACTTGTC AACAG 3'  
TFHC2as2
- [0231] 5' GCACTGAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCACCTCCAGACTGCTGCAGC 3'  
TFHC3s2
- [0233] 5' CTGGGGCTTCAGTGCGGGTATCCTGCAAGGCTTCTGGTTACTCATTAC  
3'  
TFGC1s3
- [0236] 5' TCGTACGTCTTGTC CAGATCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGGTGAGC 3'  
TFHC2as3
- [0238] 5' GCACTGAAGCCCCAGGCTTCTTCACCTCACCTCCAGACTGCACC 3'  
TFHC9sL
- [0240] 5' GCAGTCTGGACCTGAGCTGAAGAAGCCTGGGG 3'  
TFHC9asL
- [0242] 5' CCCCAGGCTTCTTCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3'  
TFHC8sP
- [0244] 5' GCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGGTGAAGAAGCC 3'  
TFHC8asP
- [0246] 5' GGCTTCTTCACCTCAGGTCCAGACTGCACCAGC3'  
TFHC10sK
- [0248] 5' GCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC 3'  
TFHC10asK
- [0250] 5' GAAGCCCCAGGCTTCACCAGCTCAGGTCCAGACTGC 3'  
LV-1
- [0252] 5' CAGTCTGGACCTGAGGTGGTGAAGCCTGGG 3'  
LV-2

[0254] 5' CCCAGGCTTCACCACCTCAGGTCCAGACTG 3'

[0255] D. 产生人化抗 TF 抗体轻链

[0256] 1. 用质粒 pJAIgG4TF. A8 (用于嵌合 H36 的表达载体) 作为模板, 用引物 TFLC1s2. 1 和 TFLC1as2 来进行 PCR 扩增。该步骤向编码区域的上游引入了克隆位点 AgeI。其还在 FR4 中引入了 L106I 突变。该步骤产生了构建体 LC03。

[0257] 2. 用互补引物 TFLC5s 和 TFLC5as, 用 LC03 作为模板, 来进行定点诱变。该步骤在 FR2 中引入了突变 Q37L, 为诊断目的加入了 PstI 位点。该新构建体被命名为 LC04。

[0258] 3. 用 LC04 作为模板, 用引物 TFHC2s 和 TFLC2as1 来进行 PCR 扩增。该步骤产生了将被用于步骤 6 中的片段 A。该步骤在 FR1 中引入了 Q11L 和 L15V 突变。

[0259] 4. 用 LC04 作为模板, 用引物 TFLC1s2. 1 和 TFLC1asR 来进行 PCR 扩增。这在 LC 可变结构域的末端引入了 KpnI 位点。将该 PCR 片段克隆进 pGEM 产生了将被用于步骤 6 中的 pGEM04K。

[0260] 5. 用 LC04 作为模板, 用引物 TFLC2s 和 TFLC4as 来进行 PCR 扩增。该步骤产生了将被用于步骤 6 中的片段 C。三种突变: FR1 中的 E17D、S18R 和 FR4 中的 A100Q 在该步骤中被引入。

[0261] 6. 用片段 A 和片段 C 作为模板, 用引物 TFHC2s 和 TFLC4as, 进行基于 PCR 的诱变, 产生片段 D。将片段 D 克隆进 pGEM04K 产生了构建体 LC05。

[0262] 7. 用 pGEM04K 作为模板, 用引物 TFLC1s2. 1 和 TFLC4as 来进行 PCR 扩增。该步骤产生了片段 H, 然后将其克隆进 pGEM04K。这在 FR4 中引入了 A100Q 突变, 该构建体被命名为 LC06。

[0263] 8. 用 LC06 作为模板, 用引物 TFLC1s2. 1 和 TFLC3as 进行 PCR 扩增。该步骤产生了将被用于步骤 10 中的片段 I。这在 FR3 中引入了 K70D 和 K74T 突变。

[0264] 9. 用 LC06 作为模板, 用引物 TFLC3s2 和 TFLC4as 进行 PCR 扩增。该步骤产生了将被用于步骤 10 中的片段 F。这在 FR3 中引入了 A80P 突变。

[0265] 10. 用片段 I 和片段 F 作为模板, 用引物 TFLC1s2. 1 和 TFLC4as 进行 PCR, 产生了片段 J。将片段 J 克隆进 pGEM 产生了构建体 LC07。

[0266] 11. 用互补引物 TFLC08sds 和 TFLC08sdsa, 用 LC07 作为模板来进行定点诱变。该步骤在 FR3 中引入了突变 V84A 和 N85T。该构建体被命名为 LC08。

[0267] 12. 将来自 LC05 的含有突变 Q11L、L15V、E17D、S18R 和 Q37L 的 AgeI 至 Eco0109I 片段克隆进 LC08。这产生了构建体 LC09。

[0268] 13. 用 LC09 作为模板, 用互补引物 LC105 和 LC103 来进行定点诱变。该步骤在 FR3 中引入了 T85N 突变, 产生了构建体 LC10。

[0269] 14. 用 LC10 作为模板, 用互补引物 LC115 和 LC113 进行定点诱变。该步骤在 FR3 中引入了 D70K 突变。这产生了构建体 LC11。

[0270] 15. 用 LC11 作为模板, 用互补引物 LC125a 和 LC123a 进行定点诱变。该步骤在 FR2 中引入了 K42Q 突变。这产生了构建体 LC12。

[0271] 每个突变步骤之后, 对部分人化或完全人化的 LC 克隆进行测序, 稍后将这些可变结构域中的一些克隆进表达载体 tKMC180

[0272] 用于轻链人化的寡核苷酸引物:

- [0273] (SEQ ID NOS 63-81, 分别按出现顺序)
- [0274] TFLC1as2 :
- [0275] 5' TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCCCAG 3'
- [0276] TFLC1s2. 1 :
- [0277] 5' ACCGGTGATATCCAGATGACCCAGTCTCC 3'
- [0278] TFLC5s :
- [0279] 5' GGTTAGCATGGTATCTGCAGAAACCAGGG 3'
- [0280] TFLC5as :
- [0281] 5' CCCTGGTTTCTGCAGATACCATGCTAACC 3'
- [0282] TFHC2s :
- [0283] 5' TACGACTCACTATAGGGCGAATTGG 3'
- [0284] TFLC2as1 :
- [0285] 5' CCACAGATGCAGACAGGGAGGCAGGAGACTG 3'
- [0286] TFLC1asR :
- [0287] 5'
- [0288] TTCGAAAAGTGTACTTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTACCAGCACCGAAC
- [0289] G 3'
- [0290] TFLC2s :
- [0291] 5' CCTGTCTGCATCTGTGGGAGATAGGGTCACCATCACATGC 3'
- [0292] TFLC4as :
- [0293] 5' GATCTCCAGCTTGGTACCCTGACCGAACGTGAATGG 3'
- [0294] TFLC3as :
- [0295] 5' GTAGGCTGCTGATCGTGAAAGAAAAGTCTGTGCCAGATCC 3'
- [0296] TFLC3s2 :
- [0297] 5' CACGATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGTAATTATTACTGTG 3'
- [0298] TFLC08sds :
- [0299] 5' GCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAAG 3'
- [0300] TFLC08sdsa :
- [0301] 5' CTTGTTGACAGTAATAAGTTGCAAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGC 3'
- [0302] LC105 :
- [0303] 5' CAGCAGCCTACAGCCTGAAGATTTTGCAAATTATTACTGTCAAC 3'
- [0304] LC103 :
- [0305] 5' GTTGACAGTAATAATTTGCAAAATCTTCAGGCTGTAGGCTGCTG 3'
- [0306] LC115 :
- [0307] 5' CAGTGGATCTGGCACAAAGTTTCTTTCACGATCAGCAGC 3'
- [0308] LC113 :
- [0309] 5' GCTGCTGATCGTGAAAGAAAACCTTGTGCCAGATCCACTG 3'
- [0310] LC125a :
- [0311] 5' CTGCAGAAACCAGGGCAATCTCCTCAGCTCCTG 3'

[0312] LC123a :

[0313] 5' CAGGAGCTGAGGAGATTGCCCTGGTTTCTGCAG 3'

[0314] 图 5A 显示了人类 kappa 轻链恒定结构域的序列 (SEQ ID NO. 191)。图 5B 显示了人类 IgG1 重链恒定结构域 (SEQ ID NO. 192)。图 6A 显示了 hFAT (IgG4) 恒定结构域序列 (SEQ ID NO. 193)。图 6B 提供了人类 IgG4 重链恒定结构域 (SEQ ID NO. 194)。关于前述免疫球蛋白恒定结构域序列的其它公开资料, 还见公布的 U. S. 专利申请号 20030190705 和其中引用的参考文献。

[0315] 实施例 2 人化抗 TF 抗体的表达和纯化

[0316] 将部分人化或完全人化的 LC 和 HC 克隆克隆进表达载体。质粒 tKMC18 被用于表达与人类 kappa 链融合的 LC 突变体, pJRS 35S 或 pLAM356 载体被用于表达与人类 IgG1 或 IgG4 的 Fc 融合的 HC 突变体。然后将 HC 和 LC 克隆的一些组合共转染至 COS 细胞中。通过 ELISA, 针对整个 IgG 的生产和与 TF 的结合, 对 COS 细胞中短暂表达的 IgG 进行检测。关于与这些特殊载体相关的公开资料, 见公布的 U. S. 专利申请号 20030190705 和其中引用的参考文献。

[0317] 将抗 TF 重和轻可变结构域的最后完全人化形式 (HC08 和 LC09 的组合) 克隆进被称为 Mega 表达载体 (pSUN34, 见图 2) 的材料, 并转染进 CHO 和 NSO 细胞, 用于 IgG 表达。克隆出能产生 IgG4 $\kappa$  或 IgG1 $\kappa$  人化抗 TF 抗体的稳定转染的细胞系。然后将选出的稳定的细胞系用于生产足以进行分析的量的人化抗 TF。得到的人化版本是接近于 100% 人类来源的 (不考虑 CDR 序列的情况下)。人化的 IgG4kappa 版本 (由 pSUN35 生产的) 被命名为 hFAT (人化 IgG 四抗组织因子抗体), IgG1 kappa 版本 (由 pSUN34 生产的) 被命名为 hOAT (人化 IgG 一抗组织因子抗体)。cH36 的这些完全人化的版本将被用于治疗慢性指征, 例如癌症以及炎性疾病。

[0318] 能表达 (HC08 和 LC09 的组合) 的一种 NSO 细胞系 (OAT-NSO-P10A7) 被解冻, 并被扩展到 10mL IMDM 培养基中, 培养基中补充有 10% FBS, 处于 15mL 的管中, 然后对其进行离心。将细胞沉淀重新悬浮于 10mL 新鲜的培养基中, 转移至 T25 瓶中, 在 37°C 于 5% CO<sub>2</sub> 中培养。为制备足够数量的细胞以接种中空纤维生物反应器 (hollow fiber bioreactor), 将细胞扩增 (expand), 以获得总共  $6 \times 10^8$  个细胞。按照厂商说明书来设置生物反应器。收获的细胞被沉淀出来, 将其重新悬浮于含有 35% FBS 的 60mL IMDM 中, 然后注射进生物反应器的毛细管外空间。每天都监测葡萄糖和乳酸盐的浓度, 对收获的物质进行离心, 并收集起来。用 ELISA 试验对收获的物质进行针对抗 TF 抗体浓度的检测。然后对收集的含有抗 TF 抗体 (hFAT) 的样品进行纯化, 按照下文所述进行分析。

[0319] A. r 蛋白质 A 琼脂糖 (sepharose) 高流速色谱

[0320] 重组的人化抗 TF 单克隆抗体由两条轻链和两条重链组成。重链是小鼠可变结构域 (未改变的, 或如上所述人化的) 和人类 IgG1 或 IgG4Fc 结构域的融合, 而轻链则含有小鼠可变结构域 (未改变的, 或如上所述人化的) 和人类  $\kappa$  结构域。已经良好地得出了如下结果: 人类 IgGFc 区域具有对于蛋白质 A 或重组蛋白质 A (r 蛋白质 A) 的高度亲和性。

[0321] 通过向每 ml 样品中加入 0.08ml 8.0 的 1M Tris-HCl, 将含有人化抗 TF 抗体 (hFAT) 的收集物调节为 pH 8.0 $\pm$ 0.1。然后将样品过滤通过低蛋白质结合的 0.22 微米过滤器 (例如, Nalgene 灭菌一次性组织培养物过滤器单元, 其具有来自 Nalge Nunc

International, Cat. No. 167-0020 的聚醚砜膜)。应用样品之后,用 5 床体积 (bed volume) 的 20mM Tris-HCl (pH8.0) 来洗 r 蛋白质 A 柱 (来自 Pharmacia), 以去除未结合的物质, 例如培养基蛋白质。鉴于收获的培养基含有高含量的牛血清, 使用分步 pH 梯度洗涤来从柱中移走牛 IgG。通过增加缓冲液 A (100mM 乙酸钠) 中缓冲液 B (100mM 乙酸) 的相对百分比, 来获得分步 pH 梯度。典型的 pH 分步洗涤中, 使用 20%、40% 和 60% 的缓冲液 B。用 100% 的缓冲液 B 对该柱进行洗脱, 基于  $A_{280}$  收集洗出部分。通过加入 1M Tris 碱将收集的部分调节为 pH8.5。

#### [0322] B. Q 琼脂糖高流速色谱

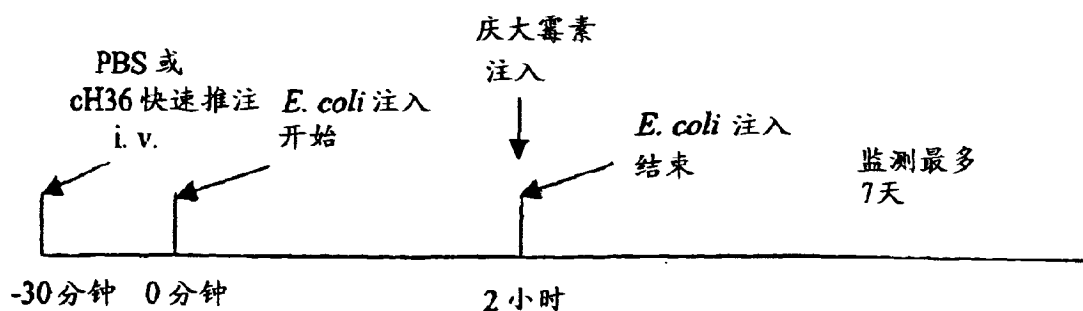
[0323] 阴离子交换色谱对于根据其电荷分离蛋白质是非常有效的。用两倍体积的水来稀释洗脱出并经过 pH 调节的来自 r 蛋白质 A 柱的样品, 检查 pH, 并将其调节为 8.5。然后将样品载入 5mL (1.6×2.5cm) 的 Q 琼脂糖高流速柱 (用 20mM Tris-HCl, pH8.5 平衡过的), 用 (1) 5 床体积的 20mM Tris-HCl, pH8.5; 和 (2) 4 床体积的含有 100mM NaCl 的 20mM Tris-HCl, pH8.5 来洗柱。然后用若干床体积的含有 500mM NaCl 的 20mM Tris-HCl, pH8.5 来洗脱 IgG 蛋白质。收集蛋白质峰, 用超滤设备将缓冲液交换成 PBS。

#### [0324] 实施例 3 恒河猴中的脓毒性休克模型

[0325] 在该模型中, 通过在恒河猴中注入活的 *E. coli* (革兰氏阴性细菌) (见 Taylor et al., J. Clin. Invest. 79 :918-825 (1987)) 来诱导脓毒性休克。通过 *E. coli* 诱导的休克能导致对凝血和炎症的激活, 最终导致死亡。用前文中 Taylor et al. 所述的恒河猴脓毒性休克模型, 对本发明的抗 TF 抗体延长经过活 *E. coli* 处理过的恒河猴的存活时间的能力进行检测。在研究前, 重 3-5 千克的恒河猴禁食过夜, 实验的早上用盐酸氯胺酮 (ketamine) (14mg/kg, 肌肉注射) 将其固定。然后通过经由皮肤的导管向头静脉施予戊巴比妥钠, 以保持手术麻醉处于轻微的水平 (最初, 2mg/kg, 大约每 20 至 45 分钟加入额外的量, 持续 6 小时)。股静脉无菌条件下暴露, 将导管插入到一条后肢中, 用于取血样和施予庆大霉素。通过 30 分钟静脉内输注, 施予庆大霉素。在 *E. coli* 注入结束时 ( $t = 2$  小时), 施予了 9mg/kg 的注入量。*E. coli* 注入后 6 小时, 施予了 4.5mg/kg 的注入量。第 1 天之后, 每天再施予一次额外的庆大霉素 (4.5mg/kg, 肌内), 持续另外的 3 天。每只猴子都被置于侧卧位置, 接触温控加热衬垫, 并且对直肠温度进行监测。对动物从口部插入管子, 允许它们自发呼吸。

[0326] 在注射前少于 12 小时, 新鲜制备出 *E. coli* 菌株 086 :K61H (ATCC33985)。每只猴子获得 2 小时的 *E. coli* 静脉输注, 剂量为  $4 \times 10^{10}$  CFU/kg。对照组猴子在注入 *E. coli* 前 30 分钟获得 PBS。治疗组猴子在注入 *E. coli* 前 30 分钟 (见用于注射安排的时间表) 获得快速推注 (2-3 分钟) 剂量的抗组织因子抗体 (cH36, 如果需要的话, 稀释于 PBS 中)。经由皮肤的导管被用于注入 *E. coli*、PBS 和抗 TF 抗体。

[0327]



[0328] 用于施予抗 TF 抗体和 E. coli 的时间表

[0329] 对所有的猴子进行 8 小时的连续监测,在最多 7 天的时间内进行 针对下述方面的每日观察:存活时间;每小时监测并记录;最初 8 小时内每小时检测并记录温度,然后在最多 7 天中,每天一次。

[0330] 在下述时间点收集血样:如表 3 所示,  $T = -0.5^*$ 、 $0^{**}$ 、1、2、4、6、24 小时,用于对血液参比和炎性细胞因子进行分析 ( $* T = -0.5$ ,恰在注射 cH36 或盐水对照之前; $** T = 0$ ,恰在注入 E. coli 之前,但在注入 cH36 或盐水对照之后 30 分钟)。

[0331] 表 3. 用于收集血样的安排

[0332]

时间点	血液学	用于分析的血浆
1 天;t = -0.5 小时 (恰在试验项目或载体注入之前)	X	X
1 天;t = 0 小时 (处理后 30 分钟,恰在 E. coli 注入之前)	X	X
1 天;1 小时 (E. coli 注入之后)	X	X
1 天;2 小时 (E. coli 注入之后)	X	X
1 天;4 小时 (E. coli 注入之后)	X	X
1 天;6 小时 (E. coli 注入之后)	X	X
1 天;24 小时 (E. coli 注入之后)	X	X
全血体积/时间点	1. 0mL	1. 8mL
抗凝血剂	DETA	柠檬酸钠

[0333] 本研究的结果显示于表 4 和图 7A-D 中。当施予 10mg/kg 静脉快速推注时(表 4),抗 TF 抗体 cH76 非常好地保护了恒河猴免受 E. coli 诱导的脓毒性休克,同时削弱了炎性细胞因子 IL-8 和 IL-1 $\beta$ ,在较小的程度上削弱了 IL-6 和 TNF- $\alpha$  (图 7A-D)。

[0334] 表 4. cH36 对恒河猴中 E. coli 诱导的脓毒性休克的保护作用

[0335]

处理	重量 (kg)	性别	存活时间 (hr)	平均存活时间 (hr)
盐水	3.6 4.5	F M	8 24	16
Suno1-cH36 (10mg/kg)	3.1 4.0	F M	> 168 54	> 111

[0336] 实施例 4 狒狒中的急性肺损伤模型

[0337] A. 急性肺损伤是脓毒病发病和致死的重要因素。感染有革兰氏阴性脓毒病的患者具有急性呼吸窘迫综合征和多种器官衰竭的高发生率。已经显示,用活性位点失活的因子 VIIa 去阻止组织因子的功能,能限制狒狒中脓毒病诱导的急性肺损伤和其它器官损害(见 Welty-Wolf, K. et al., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164:1988(2001))。急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的一个重要的病理生理学特征是对外源性凝血的局部激活和对纤维蛋白溶解的抑制。随着损伤的发展,这些干扰导致纤维蛋白在肺的肺泡空间和微血管、组织间隙沉着,导致毛细管闭塞和透明膜形成。外源性凝血途径的组分(例如,TF、凝血酶和纤维蛋白)为炎症细胞交通 (traffic) 的改变和血管渗透性的增加提供信号。前凝血剂 (procoagulant) 和纤维蛋白还能促进损伤中的其它关键事件,包括补体激活、前炎性细胞因子的产生、对纤维蛋白溶解的抑制和受损的肺的重构。已经确定:脓毒病诱导的 TF 表达激活了肺中的外源性凝血级联,导致了前凝血环境,其导致纤维蛋白沉着并且增强了炎症。通过阻止外源性凝血的起始事件,实验性 ARDS 期间,它们对于肺中前炎性事件和紊乱的纤

维蛋白转换的效果可被更正,严重的结构和功能损伤的发展可被防止。近来的研究表明,用活性位点被抑制的因子 VIIa (FVIIai) 或 TF 途径抑制剂 (TFPI) 来预防 TF- 因子 TIIa 复合体上凝血的起始,可以削弱脓毒病中的炎症以及纤维蛋白的沉着,由此限制了狒狒中的急性肺损伤 (ALI) 和其它的器官损害。

[0338] 用于脓毒病诱导的 ALI 模型的模型已在狒狒中建立。见 Welty- Wolf, K. et al. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 164 :1998(2001)。在该模型中,通过启动注入 (priming infusion) 被杀死的 E. coli,来预先激活高动力型 (hyperdynamic) 心血管和全身炎症应答。12 小时后,将第二次活的 E. coli 剂量给予动物,以诱导与具有脓毒病和 ARDS 的人类似的肺部和肾脏衰竭。用该模型,通过 FVIIai 和 TFPI 来阻止 TF 功能,其显示出能削弱全身炎症应答,降低组织中纤维蛋白的沉着,预防了肺和肾脏损伤。

[0339] 在该模型中,对过夜禁食的成年狒狒 (*Papio cyanocephalus*) 给予肌肉内注射的氯胺酮 (20-25mg/kg) 镇静剂,并且进行插管。用氯胺酮 (3-10mg/kg/h) 和安定 (diazepam) (每两小时 0.4-0.8mg/kg) 来保持深度的镇静。在呼吸测量前,用体积循环通风机对动物进行机械通风 (21% O<sub>2</sub>),用巴夫龙 (pancuronium) (静脉内给药 4mg) 对动物进行间歇麻痹。通过用于血液动力学监测的股切开,来放置留置的动脉管线和肺部动脉导管。所有的动物都获得大约 10<sup>9</sup>CFU/kg 的经过热杀死的 E. coli 086 :K61H(ATCC 33985),其作为 60 分钟的注入在 t = 0h 时,活的 E. coli 之前 12 小时给予。通过 60 分钟注入体积为 50mL 的 10<sup>10</sup>CFU/kg 的活的 E. coli 来诱导脓毒病。在完成活的 E. coli 的注入后 60 分钟,施予庆大霉素 (3mg/kg i. v.) 和头孢他定 (1gm i. v.)。如果需要的话,用流体来保持肺部毛细血管楔压 (PCWP) 为 8-12mmHg,并对血压进行支持。多巴胺被用于血压过低,此时平均动脉压 (MAP) 降至低于 65mmHg,尽管使用了流体。48 小时后 (活的细菌注入后 36 小时),通过 KCl 注射对动物进行深度麻醉和杀死。每小时记录生理参数,包括心率 (HR)、温度、动脉血压、肺部动脉血压、通风机参数和流体吸收率。如所报道的,通过热稀释法、中心静脉压 (CVP)、PCWP、动脉和混合静脉血气体、氧饱和、氧含量和血球蛋白,每六小时获得对心脏输出量 (CO) 的测量。每六小时测量一次尿管输出量,计算总的流体平衡为总 i. v. 流体吸收减去尿输出量。

[0340] 用下面列出的关于肺损伤的生理、组织和生化终点 (endpoint),通过对药物处理的动物和载体处理的动物的应答进行比较,来评价关于每种干预的治疗效果。

[0341] ●生理终点是作为肺泡到动脉 O<sub>2</sub> 区别 (AaD<sub>O<sub>2</sub></sub>)、肺系统顺应性 (C<sub>L</sub>)、肺动脉压、肺血管阻力 (PVR) 和组织 W/D 比率被评估。二级终点是流体体积要求、血清 HCO<sub>3</sub>、恒定 PaCO<sub>2</sub> 下的 V<sub>E</sub>、尿输出量、肌酐和系统 DO<sub>2</sub>、VO<sub>2</sub> 和 VCO<sub>2</sub>。

[0342] ●被分析的病理终点是总体组织外观 (gross tissue appearance) 和定性光显微分析,包括纤维蛋白沉着,于肺、肾、肾上腺和其它组织中。

[0343] ●生化终点是组织髓过氧化物酶 (MPO) 水平、总的组织蛋白质和灌洗 (lavage) 蛋白质以及灌洗 LDH。通过湿 / 干重来测量肺和小肠水肿。

[0344] 在 0、12、13、18、24、36 和 48 小时处取血样。血浆 (来自柠檬酸化的血) 和血清分离,贮藏于 -80°C。用 ELISA 试剂盒 (R and D System, In., Minneapolis, MN), 针对白细胞介素 (IL)6 和 IL 8 来分析血浆样品。

[0345] 实验方案如表 5 所概括。

[0346] 表 5. 实验方案

[0347]

时间(小时)	0	6	12	14	18	24	30	36	42	48		
热杀死的 <i>E. coli</i>	X											
活的 <i>E. coli</i>			X									
抗生素				X								
载体或药物				X	X	X	X	X	X	X		
研究*	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
牺牲										X		
*研究包括血清、血浆、尿和生理测量， 它们被列出于详细方法中。												

[0348] 用针对 cH36Fab 的 3.5mg/kg 的总抗体剂量和针对 cH36 的 5.25mg/kg 的总抗体剂量来进行 TF 阻断。注入活的微生物后两小时，开始测试项目的静脉内载入剂量（对于 cH36Fab, 1.8mg/kg, 对于 cH36, 2.7mg/kg），此时施予抗生素，接着是 34 小时的匀速注入：每小时 50 mcg/kg 的 cH36Fab 或 75mcg/kg/ 小时的 cH36。

[0349] 表 6. 实验设计

[0350]

组	处理	# 动物
1	脓毒病 + 载体	5
2	脓毒病 + cH36Fab (总共 3.5mg/kg, 载入 1.8mg/kg, 50mcg/kg/hr 注入 34 小时)	2
3	脓毒病 + Suno1-cH36 (总共 5.25mg/kg, 载入 2.7mg/kg, 75 mcg/kg/hr 注入 34 小时)	5

[0351] 通过快速推注 cH36, 接着注入来阻断 TF, 在被 *E. Coli* 攻击的狒狒中, 能够将前炎症性细胞因子 IL-8 和 I1-6 的系统性表达削弱至较低的水平 (图 11A-B), 并提供对肾和肺的部分保护。期间的分析显示, cH36 的施予削弱了平均肺动脉压、肺系统顺应性的增加 (图 8A-B) 以及肺泡 - 动脉氧梯度的增加。迄今所检查的动物的肾脏在尸体剖检中看起来总体正常, 肾髓过氧化物酶水平保持得更低 (图 9A), 尿输出在实验期间被维持。被处理的动物中小肠湿 / 干比显著低于对照动物, 表明 cH36 处理过的动物中水肿更少 (图 9B)。

[0352] 这些数据显示, 用 Suno1-CH36 靶向 TF 对凝血进行阻断, 可以预防革兰氏阴性脓毒病中的器官损伤的发展以及炎症。这些数据还第一次显示了用于用抗凝血剂控制人类 ARDS 的新策略。

[0353] B. 下述数据进一步显示, cH36 和 cH36-Fab 有用于预防脓毒病狒狒中的肺损伤。

[0354] 简言之, 本实施例这部分的目的是进一步验证 Suno1-cH36 和 cH36-Fab 对肺中炎症以及前凝血 - 纤维蛋白溶解平衡的作用, 并将之关联于狒狒的实验性脓毒病模型中 ALI 中结构和气体交换的异常。见上文中 A 节。

[0355] 对所有的狒狒 (*Papio cyanocephalus*) 进行机械通风 (21% O<sub>2</sub>), 麻醉, 并在活的 *E. coli* (1-2 × 10<sup>10</sup>CFU/kg) 脓毒病发作之前 12 小时, 通过静脉给予热杀死的 *E. coli* 的剂量 (1 × 10<sup>9</sup>CFU/kg)。研究设计由三组狒狒构成, 如下文中表 7 所示。第一组中的狒狒 (n = 6)

被施予 载体 (PBS), 被作为对照。第二组中的动物 ( $n = 3$ ) 被注射 cH36-Fab ( 总共 3.5mg/kg, 1.8mg/kg 快速推加载入剂量, 接着是匀速注入 50mcg/kg/hr, 持续 34 小时)。第三组 ( $n = 6$ ) 获得了 cH36 ( 总共 5.25mg/kg, 2.7mg/kg 快速推加载入剂量, 接着是匀速注入 50mcg/kg/hr, 持续 34 小时)。药物的静脉内载入剂量 ( 对 cH36-Fab 而言, 1.8mg/kg, 对 cH36 而言, 2.7mg/kg) 在注入活的微生物后 2 小时开始 (14 小时的时间点), 接着是匀速注入每小时 50mcg/kg 的 cH36-Fab, 或 75mcg/kg/ 小时的 cH36, 直到 48 小时时达到实验终点。在 14 小时的时间点施予抗生素。通过用肺损伤的生理、组织学和生化参数来比较被治疗的动物与对照的应答, 对治疗效果进行评估。

[0356] 表 7. 实验设计

[0357]

组	处理	狒狒数量
1	脓毒病 + 载体	6
2	脓毒病 + cH36-Fab ( 总共 3.5mg/kg, 1.8mg/kg 载入, 注入 50mcg/kg/hr, 持续 34 小时)	3
3	脓毒病 + cH36 ( 总共 5.25mg/kg, 2.7mg/kg 载入, 注入 75mcg/kg/hr, 持续 34 小时)	6

[0358] 从上述数据中可以推断出: 用 cH36 处理过的动物对脓毒病具有较少的高动力型全身应答。

[0359] 如果需要的话, 下述材料和方法被用于进行本实施例中的实验。在表明的情况下, 它们还可被用于本公开文本中的其它地方。

[0360] C. 材料和方法

[0361] 在活的 *E. coli* ( $1-2 \times 10^{10}$  CFU/kg) 脓毒病发作之前 12 小时, 被机械通风 (21%  $O_2$ )、麻醉的狒狒 (*Papio cyanocephalus*) 通过静脉被给予热杀死的 *E. coli* 的剂量 ( $1 \times 10^9$  CFU/kg)。药物的静脉载入剂量 ( 对于 cH36-Fab, 1.8mg/kg, 或者对于 cH36, 2.7mg/kg) 在注入活的微生物后 2 小时开始 (14 小时), 此时施予抗生素, 接着是匀速注入每小时 50mcg/kg 的 cH36-Fab 或 75mcg/kg/ 小时的 cH36。总的抗体剂量为: 对 cH36-Fab 而言, 3.5mg/kg, 对 cH36 而言, 5.25mg/kg。治疗在革兰氏阴性脓毒病发作之后起始, 因为我们在前文中已经显示, TF 阻断作为援救 (rescue) 策略是有效的。因为最早的研究显示, 整个抗体较之 FAB 具有更好的疗效以及无有害作用, 因此我们对未经过治疗的脓毒病对照和用 cH36 整个抗体治疗过的脓毒病动物进行比较。实验组如表 7 所示。用 ANOVA 进行关于生理数据的统计学分析, 用 t 检验或 Mann Whitney U 对生化和 BAL 数据进行分析。数据被表示为平均值  $\pm$  sem 的形式, 还显示了 p 值。

[0362] 根据合适的指导来对动物进行操作。动物被随机分为治疗 and 脓毒病对照组。过夜禁食后, 对每只动物都通过肌肉内给予氯胺酮 (20-25mg/kg) 进行镇静, 并插管。用氯胺酮 (3-10mg/kg/h) 和安定 ( 每 2 小时 0.4-0.8mg/kg) 来保持高度镇静。在呼吸测量之前, 用体积循环通风机来对动物进行通风, 用巴夫龙 (4mg 静脉给药) 进行间歇麻痹。FiO<sub>2</sub> 是 0.21, 潮气量 (tidal volume) 为 12ml/kg, 呼气末正压为 2.5cmH<sub>2</sub>O, 速率被调节为能保持 40mmHg 的动脉 PCO<sub>2</sub>。通过用于血液动力学监测的股切开, 来放置留置的动脉管线和肺动脉导管。活的 *E. coli* 注入开始后两小时 (14 小时), 动物获得硫酸庆大霉素 (3mg/kg iv) 和头孢他定 (1gm iv)。以足以将肺部毛细管楔压 (PCWP) 保持在 8 至 12mmHg 的速率, 用静脉内体积注入 (intravenous volume infusion) (Ringer' s 乳酸盐) 来支持动物。如果需要的话, 用

多巴胺将平均动脉压保持为 60mmHg。48 小时后（活细菌注入后 36 小时），用 KCl 注射对动物进行深度麻醉，并将其杀死。预先确定的提前终止标准包括：难控制的低血压（尽管使用了多巴胺和足够的 PCWP，MAP 仍小于 60mmHg）、血氧不足（需要  $\text{FIO}_2$  高于 40%）或难控制的代谢酸中毒（ $\text{pH} < 7.10$ ， $\text{PaCO}_2$  正常）。实验方案与上文中表 5 所示的相同。

[0363] 每小时记录生理参数，包括心率（HR）、温度、动脉血压、肺动脉压、通风机参数和流体吸收。通过热稀释法、中心静脉压（CVP）、PCWP、动脉和混合静脉血气体、氧饱和、氧含量和血球蛋白（Hgb），每六小时获得对心脏输出量（CO）的测量。每六小时测量一次尿管输出量，计算总的流体平衡为总 i. v. 流体吸收减去尿输出量。

[0364] 在 0、12、13、18、24、36 和 48 小时处取血样。在全血上来进行全血球计数（Sysmex-1000 Hemocytometer；Sysmex, Inc., Long Grove, IL）。血浆（来自柠檬酸化的血液）和血清被分离，并被贮藏于  $-80^\circ\text{C}$ 。用 ST4 机械凝血分析仪（Diagnostica Stago, Parsippany, NJ）来测量纤维蛋白原。对前凝血酶时间（PT）和激活的部分促凝血酶原激酶时间（aPTT）重复测量两次，用显色试验，在 MDA 凝血分析仪（Organon Teknika, Durham, NC）上来测量抗凝血酶 III（ATIII）活性，其被表示为试剂盒标准的 %。ELISA 被用于测量血浆和 BAL 中的血浆凝血酶 - 抗凝血酶（TAT）复合物（Dade Behring, Deerfield, IL）。通过 Sunol Molecular（Miramar, FL）来测量血液和 BAL 中的 cH36 和 cH36-Fab 水平。用 ELISA 试剂盒（R and D systems, Inc., Minneapolis, MN），针对白细胞介素  $1\beta$ （IL- $1\beta$ ）、IL-6、IL-8 和 TNF 受体 -1（TNFR-1）来对血清样品进行检测。用标准临床技术来测量血中的肌酸酐。

[0365] 在验尸过程中按照下文所述来收集组织：实验后，打开胸腔，左边的主支气管被结扎，左肺被移开。用 240mL 0.9% 盐水在左上肺叶进行 BAL。来自左下肺叶的肺组织样品被人工充气，并浸入 4% 多聚甲醛中，用于光显微。从左肺残留部分中随机取四份样品，用于湿 / 干重测定，要小心处理以避免大血管和支气管结构。来自肺、肾、肝、小肠、心脏和肾上腺的其它样品被急速冷冻于液氮中，贮藏于  $-80^\circ\text{C}$ 。在 30cm 的固定压力下，用 0.85M 二甲胂酸钠缓冲液（ $\text{pH} 7.4$ ）中的 2% 戊二醛对整个的右肺进行 15 分钟的充气固定（inflation-fix）。通过浸入 4% 的多聚甲醛，对来自肾、肝、小肠、心脏和肾上腺的其它组织进行固定。随机选择四份小肠样品，用于湿 / 干重测定。

[0366] 按照（Am J Resp Crit Care Med 1998；157：938）所述，来测量肺组织匀浆（homogenate）中髓过氧化物酶（MPO）活性和蛋白质浓度，以及 BAL 中的乳酸盐脱氢酶（LDH）浓度。MPO 活性被表示为吸光率 / 分钟 / g 湿重组织的变化。LDH 值被表示为每升中的活性单位（U/L）。

[0367] 下述实施例的重要目的是：测定 cH36 和 cH36-Fab 对肺中前凝血 - 纤维蛋白溶解平衡以及炎症的影响。还有一个目的是将这些参数与狒狒中实验性脓毒症模型中的 ALI 的结构和气体交换异常关联起来。

[0368] D. 结果：用 cH36 进行治疗能预防具有 E. coli 脓毒病的狒狒中纤维蛋白原的耗竭

[0369] 简言之，cH36 治疗削弱了纤维蛋白原的耗竭，以及 TAT 复合物的形成，这与依赖 TF 的凝血激活的抑制一致。在脓毒症对照中，纤维蛋白原降低至最初值的大约 50%，但是在用 cH36 治疗过的动物中，平均纤维蛋白原水平并未降低到基线值以下（图 10A，对比脓毒症对照， $p < 0.01$ ）。在脓毒症期间，脓毒症对照中 PT 增加，这是由于发展的凝血病导致的，在治

疗过的动物中 PT 也增加,这是由于药物注入的药理影响。三种经过 cH36-Fab 治疗的动物中的 PT 和纤维蛋白原的值也被显示出来,用于比较。cH36-Fab 中的值较之整个抗体治疗的动物有所降低,这表明,Fab 片段具有较低的对于 TF 的亲合性(图 10A、B)。两组中 PTT 都增加,并且没有显著差异。两组中注入活细菌后,TAT 复合体都增加,在 14 小时处形成峰,然后降低。在用 cH36 治疗过的动物中,TAT 峰值更低,水平降低得更快(图 10D,  $p < 0.01$ )。TAT 复合体形成的差异不是由于 ATIII 水平的差异导致的,因为两组中 ATIII 的降低相似,在实验结束时均为初始值的 35-40%。

[0370] E. 用 Suno1-cH36 治疗削弱了脓毒病诱导的急性肺损伤

[0371] cH36 减少了具有建立起的 E. coli 脓毒病的狒狒中的 ALI,削弱了脓毒病诱导的气体交换异常、肺部高血压以及肺部系统顺应性的损失。这些生理数据显示于图 8A-C 中。注入杀死的细菌后,两组中肺泡动脉氧梯度(AaDO<sub>2</sub>, mmHg)都增加,  $t = 12$  小时时,活的细菌脓毒病发作之后,脓毒病对照组中进一步恶化。较之脓毒病对照动物,用 cH36 的治疗能预防脓毒病期间气体交换方面的逐步恶化( $p = 0.001$ ,图 8A)。脓毒病对照组的一只动物在活细菌脓毒病发作之后需要补充的氧以用于逐渐发展的血氧不足。cH36 治疗组的一只动物也需要氧,但仅为 18-22 小时,在此期间充氧作用逐渐改善,补充的氧气被断掉,回到室内空气。在实验的末尾,该动物中 AaDO<sub>2</sub> 回复到注入热杀死或活的细菌之前测量的初始值。脓毒病诱导的平均肺动脉压(PAM, mmHg)增加被 cH36 减轻(对比未受治疗的脓毒病对照,  $p < 0.0001$ ,图 8B),但是肺部血管阻力没有差别,这表明,这是由于治疗过的动物中对心脏输出量的影响造成的。cH36 还能预防脓毒病对照动物中发现的肺部系统顺应性(Cst,以 mL/cmH<sub>2</sub>O 表示)降低( $p < 0.01$ ,图 8C)。PaCO<sub>2</sub> 被控制于正常范围内,两组中都是 35-45mmHg 之间,但是,在脓毒病对照中稍微高一点( $p = 0.03$ ),尽管分钟通气率高 20% (VE, l/分钟,  $p = 0.015$ ),这表明,cH36 削弱了脓毒病诱导的无效腔(dead space)的增加(表 7)。

[0372] 在尸体解剖之后,来自脓毒病对照动物的肺是稠密且出血的。来自用 cH36 治疗过的动物的肺的整体外观有所改善,在一些动物中,与正常的未受损伤的狒狒的肺看起来相同。两组中肺的湿/干重没有显著区别,脓毒病对照中为  $6.32 \pm 0.66$ ,在用 cH36 治疗过的动物中为  $5.57 \pm 0.34$  ( $p = \text{NS}$ ,正常参考范围为 4.6-5.0)。两组间 BAL 蛋白质和 LDH 也没有显著区别。在脓毒病对照组中 BAL 蛋白质为  $1.0 \pm 0.3$ ,cH36 治疗过的动物中为  $1.0 \pm 0.4$ ,脓毒病对照中 LDH 为  $23.9 \pm 10.6$ ,而 cH36 治疗过的动物中为  $10.6 \pm 3$ 。如髓过氧化物酶(MPO)活性(OD/分钟/gm 湿重)测量出的嗜中性粒细胞的积累,在 cH36 治疗过的动物中降低了超过 40% ( $p = 0.07$ )。

[0373] 肺部组织学研究显示了用 cH36 治疗过的脓毒病动物中的保护作用。脓毒病对照动物的肺具有加厚的肺泡隔膜、斑驳状的肺泡水肿和出血以及巨噬细胞和 PMN 对肺泡内炎性细胞的浸润(infiltration)。经过治疗的动物的肺具有改进的肺泡隔膜体系结构,降低的肺泡 PMN 浸润,较少的肺泡水肿,并且没有肺泡出血。

[0374] 实施例 5 脓毒病中用 cH36 的治疗能改善肾脏功能以及减少器官损伤

[0375] 用于进行本实施例的材料和方法在前文中已有描述。见,例如,实施例 4。

[0376] 用 cH36 进行治疗能改善脓毒病中肾脏的功能。较之未受治疗的对照,用 cH36 治疗的动物中,注入活 E. coli 后,尿输出量明显更高( $p < 0.001$ )。这并非由于复苏

(resuscitation) 的差异导致的,因为两组间流体平衡和全身性血液动力学相似。未受治疗的动物中,血液 pH 和血清  $[\text{HCO}_3^-]$  都更低(两种情况下,  $p < 0.0001$ ),值与脓毒病对照中混合代谢和呼吸酸中毒相符合。实验结束时,两组中血清肌酸酐没有不同,在治疗组中由于有一只未受保护的动物而有所变化。

[0377] 见图 13A-C(显示了对照和 cH36 抗体情况下,平均的尿输出量(13A),平均的血液 pH(13B) 以及血清碳酸氢盐水平(13C))。

[0378] 尸体解剖后发现,来自未受治疗的动物的肾脏肿胀且出血,而 cH36 治疗过的动物中则看起来更为正常。未受治疗的动物的肾脏的 H&E 染色部分局有斑驳状到广泛区域的急性肾小管坏死(ATN) 和肾小球损伤。受到治疗的动物的肾脏,除了一些小块的 ATN 之外,显示出正常的肾脏体系结构。受到治疗的动物肾脏中 MPO 值显著减小( $p = 0.01$ )。

[0379] 经过 cH36 治疗的动物中,其它器官损伤也有所改善。来自未受治疗的动物的肾上腺肿胀并出血,小肠非常水肿。相反,用 cH36 治疗过的动物中,肾上腺和小肠看起来都接近正常。在用 cH36 治疗过的脓毒病动物中,小肠湿/干重有所降低(Suno1-cH36 治疗的,  $6.46 \pm 0.62$ , 对比未受治疗的脓毒病对照动物,  $9.70 \pm 1.05$ ,  $p = 0.01$ )。组织学研究验证了小肠水肿的改善。肾上腺也被针对脓毒病而受到了保护,充血和出血被减少,细胞损伤的面积显著变小。除肺和肾脏中降低的嗜中性粒细胞含量之外,cH36 治疗还能显著地降低肝脏中的 PMN 含量( $p = 0.05$ ),组织学研究显示了肝细胞的损伤降低。

#### [0380] 实施例 6cH36 治疗削弱了脓毒病诱导的贫血

[0381] 用于进行本实施例的材料和方法已在上文中被描述。见,例如,实施例 4。

[0382] 在注入活的 *E. coli* 后,两组动物都发展出了嗜中性粒细胞减少、血小板减少以及贫血(见下表 8)。两个组中血红蛋白(Hgb) 都有所降低,但是在用 cH36 治疗过的脓毒病动物中显著更高(48 小时处,  $8.1 \pm 0.7$  对比  $10.8 \pm 0.8 \text{g/dL}$ ,  $p < 0.0001$ )。虽然在未受治疗的动物中血小板下降得更为迅速( $p < 0.0001$ ),但是该区别的临床显著性并不明显。注入活的 *E. coli* 后,所有动物都发展出了进行性血小板减少,在实验结束时,两个组中的平均血小板计数都为大约 30,000 或更少。注入后两小时( $t = 14$  小时)时,两个组中 WBC 都达到最低点,大约为  $1,000-1,500 (\times 10^3/\mu\text{L})$ ,在实验结束时,其逐渐增加至基线水平(经过治疗的为  $12,680 \pm 2,012$ ,与未经治疗的动物对比,其为  $10,500 \pm 1,336$ ,  $p = 0.07$ )。两只脓毒病对照动物发展出了自限性(self-limited) 血尿。两个组中的大多数动物在研究中的某些时间点具有伴随吸出的带血分泌物,但在 cH36 治疗的动物中没有显著出血的临床证据(即,血尿、咯血或从静脉或动脉导管位置流血),两个组中都没有发生严重的或危及生命的出血并发症。

[0383] 表 8

[0384]

时间 (h)	0	12	18	24	36	48	p 值
<b>Hgb (g/dL)</b>							
Sepsis	11.2 ± 0.3	10.6 ± 0.3	10.4 ± 0.5	10.4 ± 0.8	8.7 ± 0.8	8.1 ± 0.7	<0.0001
cH36	12.1 ± 0.5	11.8 ± 0.4	12.2 ± 0.5	12.4 ± 0.6	10.9 ± 0.8	10.8 ± 0.8	
cH36 Fab	11.7 ± 0.3	11.5 ± 0.5	12.5 ± 0.8	11.4 ± 0.3	11.3 ± 0.4	9.6 ± 0.1	
<b>Platelets</b>							
Sepsis	194 ± 15	126 ± 12	59 ± 7	33 ± 5	24 ± 5	26 ± 9	<0.0001
cH36	206 ± 15	167 ± 16	110 ± 13	64 ± 12	40 ± 4	30 ± 4	
cH36 Fab	197 ± 8	146 ± 4	87 ± 10	31 ± 5	21 ± 4	25	
<b>HR (次/分)</b>							
Sepsis	95 ± 6	116 ± 10	125 ± 9	129 ± 9	125 ± 5	127 ± 16	<0.01
cH36	84 ± 3	101 ± 4	135 ± 13	123 ± 11	105 ± 12	99 ± 9	
cH36 Fab	75 ± 7	89 ± 9	107 ± 14	109 ± 9	98 ± 15	98 ± 9	
<b>MAP (mmHg)</b>							
Sepsis	111 ± 2	104 ± 2	99 ± 9	102 ± 7	79 ± 10	78 ± 13	NS
cH36	102 ± 3	93 ± 3	97 ± 5	92 ± 6	78 ± 9	86 ± 5	
cH36 Fab	108 ± 4	85 ± 4	89 ± 9	78 ± 8	89 ± 4	63 ± 4	
<b>CO/kg</b>							
Sepsis	0.16 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.22 ± 0.03	0.22 ± 0.04	0.23 ± 0.02	<0.0001
cH36	0.15 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.18 ± 0.01	
cH36 Fab	0.12 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.15 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.02	
<b>DO<sub>2</sub>/kg</b>							
Sepsis	23.2 ± 2.2	28.1 ± 3.1	28.6 ± 4.1	26.2 ± 2.0	22.7 ± 24.3	20.1 ± 1.2	NS
cH36	23.8 ± 1.8	28.0 ± 1.0	23.8 ± 2.4	24.9 ± 3.5	23.1 ± 2.6	24.6 ± 2.1	
cH36 Fab	18.1 ± 1.6	21.8 ± 2.1	19.5 ± 1.8	20.9 ± 2.7	21.1 ± 1.8	16.4 ± 1.4	
<b>VO<sub>2</sub>/kg</b>							
Sepsis	5.4 ± 0.8	6.3 ± 1.4	6.7 ± 0.6	6.8 ± 1.3	5.7 ± 0.6	5.6 ± 0.7	NS
cH36	5.6 ± 0.4	6.6 ± 0.2	6.2 ± 0.4	5.6 ± 0.7	6.1 ± 0.6	6.2 ± 0.3	
cH36 Fab	4.0 ± 0.3	4.2 ± 0.2	3.7 ± 0.4	4.6 ± 0.3	3.7 ± 0.2	4.2 ± 0.2	
<b>SVR*kg</b>							
Sepsis	56602 ± 5459	41539 ± 5049	35290 ± 4941	37788 ± 5675	30713 ± 9152	26161 ± 5750	***
cH36	50833 ± 3782	37936 ± 895	49953 ± 8998	46811 ± 6290	37432 ± 3612	36058 ± 4362	
cH36 Fab	69095 ± 2475	43890 ± 5700	52763 ± 7023	39545 ± 7126	46570 ± 5101	32243 ± 8576	
<b>PCWP</b>							
Sepsis	10 ± 1	11 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 1	11 ± 1	NS
cH36	10 ± 0	10 ± 0	9 ± 1	9 ± 1	11 ± 2	9 ± 1	
cH36 Fab	12 ± 0	14 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	11 ± 1	12 ± 2	
<b>V<sub>T</sub></b>							
Sepsis	3.5 ± 0.3	3.5 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.2 ± 0.2	5.0 ± 0.5	5.1 ± 0.4	=0.015
cH36	3.7 ± 0.1	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.3	4.3 ± 0.2	
cH36 Fab	4.3 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.5 ± 0.1	5.0 ± 0.4	6.4 ± 0.8	6.2 ± 0.9	
<b>cH36 (ng/mL)</b>							
cH36	0	49.3 ± 5.5	51.8 ± 3.3	60.2 ± 6.0	53.0 ± 5.6	58.0 ± 8.3	
cH36 Fab	0	±	±	±	±	±	

[0385] 进行临床和组织学评估,对抗组织因子注射能抑制这些小鼠中的风湿性关节炎的发展进行了验证。

[0386] 参考前述实施例和讨论,我们发现,用 cH36 治疗的动物具有较少的对脓毒病的高动力型全身应答。大多数的全身性血液动力学测量,包括平均动脉压 (MAP)、PCWP、全身性血管阻力\* kg (SVR \* kg)、VO<sub>2</sub> 和 DO<sub>2</sub>,都没有被 cH36 的治疗所改变 (表 8)。两个组中,低血压应答于 IV 流体和多巴胺注入。直到预定的方案终止点,12 只动物中的 9 只还存活。总体上,活细菌脓毒病发作之后,用 cH36 治疗过的脓毒病动物具有更少的高动力型,没有进一步的心脏输出量 (CO/kg) 增加,在实验结束时,具有更少的心动过速和更高的全身血管阻力\* kg (SVR \* kg) (例如,表 7)。在一些情况下,经过治疗的动物和未受治疗的对照一样需要多巴胺和流体支持,两组之间并没有可探测到的关于 MAP 和 SVR 的区别。存活并没有被打算用作终点,因为在 48 小时的时间点所有动物都牺牲了。用 cH36-Fab 来治疗三只脓毒病动物,以对整体抗体和 Fab 片段之间的区别作出评价。如所预期的一样,整个抗体通常比

Fab 片段更为有效。

**[0387] 实施例 7 cH36 对前炎性细胞因子水平的影响**

[0388] 按照上文（例如实施例 5）已描述过的顺序，对血清和 BAL 流体中的细胞因子水平进行测量。在循环中，cH36 治疗削弱了 IL-8 ( $p < 0.01$ , 图 12)，但对 IL-1 $\beta$  或 TNFR-1 没有可探测到的影响。在 BAL 流体中，cH36 削弱了 IL-6、IL-8 和 TNFR-1 的升高。BAL 细胞因子水平展示于下表 9 中。我们还对可溶的凝血酶调节蛋白 (sTM) 进行了测量，在经过治疗的和没有经过治疗的动物中，血清或 BAL 中都没有发现不同。数据显示，用 Suno1-cH36 去阻断 TF-FVIIa 复合体上的 FX 结合位点来抑制凝血，能够至少部分地通过对肺泡间隔中前炎性细胞因子水平的影响来削弱急性肺损伤。这可能是对于局部细胞因子产生和 / 或蛋白质穿过肺泡上皮从循环中漏出的影响。

**[0389] 表 9. BAL 细胞因子水平**

[0390]

	脓毒病对照	Suno1-cH36	p 值	cH36-Fab
IL-6 (pg/mL)	600 $\pm$ 269	506 $\pm$ 522	0.05	1159 $\pm$ 435
IL-8 (pg/mL)	1081 $\pm$ 448	224 $\pm$ 176	0.037	1478 $\pm$ 755
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	6.9 $\pm$ 1.5	7.9 $\pm$ 3.1	NS	8.5 $\pm$ 1.8
TNFR1 (pg/mL)	294 $\pm$ 126	107 $\pm$ 31	0.09	167 $\pm$ 93
sTM (ng/mL)	1.67 $\pm$ 0.54	0.9 $\pm$ 0.11	NS	2.17 $\pm$ 0.72

[0391] [0386] 从实施例 4-7 中获得的某些结果可按照下文来概括：

[0392] 大多数的全身性血液动力学测量，包括平均动脉压 (MAP)、氧消耗 ( $VO_2/kg$ ) 和氧递送 ( $DO_2/kg$ )，都没有被 cH36 的治疗所改变（表 8）。平均肺部毛细血管楔压 (PCWP) 在脓毒病对照动物中稍高 ( $p < 0.01$ )，但两个组都在研究的预设参数范围内。全身性血管阻力 \* kg (SVR \* kg) 在经过治疗的动物中稍高 ( $p < 0.05$ , 表 3)。两个组中低血压应答于 IV 流体和多巴胺注入。在方案的预定终止点，12 只动物中的九只存活。在预定终止之前两只脓毒病对照动物因为具有难控制的血氧不足和呼吸酸中毒因 ALI 而死亡，一只在 30 小时处死亡，一只在 38 小时处。H36 组中的一只动物未受到保护，由于难控制的低血压和代谢酸中毒，死于 36 小时处。在该动物中，缺乏保护与较低的药物水平相关。总体上，在活的细菌脓毒病发作之后，用 cH36 治疗过的脓毒病动物具有更少的高动力性，心脏输出量 ( $CO/kg$ ) 没有进一步的增加，并且，在实验结束时，其具有更少的心动过速和更高的每 kg 全身性血管阻力 (SVR \* kg)（表 7）。

**[0393] 实施例 8 用 cH36-Fab (Fab 片段) 对狒狒进行的治疗**

[0394] 用 cH36-Fab 对三只脓毒病动物进行治疗，以寻找使用整个抗体和 Fab 片段之间的任何区别。治疗方案通常遵循上文已讨论过的程序。虽然该组太小，无法进行详细的统计研究，但是数据显示，Fab 片段对于削弱脓毒病诱导的凝血激活是有用的，增加的 TAT 值和纤维蛋白原的损耗类似于脓毒病对照。但是，这种作用较之用整个抗体所获得的结果是较为不显著的。相应地，较之用整个 cH36 抗体治疗过的动物，其中气体交换 ( $AaDO_2$ )、肺部高血压 (PAM) 和肺部顺应性 (Cst) 的改善一致性更低。生化方面，肺部 MPO 值与脓毒病对照相似。不欲被理论束缚的情况下，cH36 及其 Fab 片段之间的作用差别可能是由于在动物模型中 Fab 片段对于 TF 的更低的亲和性造成的。

**[0395] 实施例 9 在表达人类组织因子的转基因小鼠中，对胶原诱导的关节炎的抗组织因子抑制**

[0396] 胶原诱导的关节炎 (CIA) 是已建立起来的风湿性关节炎的实验模型,这是用 II 型胶原进行免疫之后在小鼠的易感株系中诱导出来的。除风湿性关节炎病理方面的免疫介导的机制之外,组织因子起始的对凝血级联的激活也已被暗示与该疾病的病程相关。在由于凝血激活而受到影响的关节中的纤维蛋白沉着,被相信能促进滑膜加厚和关节炎症。为确定用抗组织因子抗体的治疗是否能预防风湿性关节炎的防站,将用 cH36 对小鼠进行注射。

[0397] 为诱导 CIA,用在完全福氏佐剂中乳化的 100  $\mu$ g 的 II 型胶原对 7-12 周龄的小鼠尾巴基部进行皮内注射,在第 21 天时,再用在不完全福氏佐剂中乳化的 100  $\mu$ g 的 II 型胶原给予强化注射。恰在强化注射之前,通过 IV 注射给予小鼠 0.3mg 抗组织因子抗体 (对照组被注射 PBS)。随后,在研究期间每周给予抗组织因子抗体注射 (0.3mg) (对照组被注射 PBS)。

[0398] 针对四肢的红色和肿胀对动物进行评估,每周给三次临床分数。按照如下所述对临床严重性评分:每个肿胀的足趾 (除了拇指) 1 分 (最多 4 分),跗骨或腕骨关节 1 分,以及跖骨或掌骨关节 1 分,后爪最多 6 分,前爪最多 5 分。每个爪单独评分,每只小鼠的累积临床关节炎分数可以达到最多 22 分。

[0399] 本临时申请具有与公布的 U. S. 专利申请号 20030190705 相关的信息,后者与 2001 年 11 月 21 日提交的 U. S. Application No. 09/990, 586 相关,所述申请要求于 2001 年 10 月 29 日提交的 U. S. Provisional Application USSN 60/343, 306 为优先权。U. S. Application No. 09/990, 586 与 U. S. Application No. 09/293, 854 (现在的 U. S. Pat. No. 6, 555, 319) 相关,后者是 U. S. Application No. 08/814, 806 (现在的 U. S. Pat. No. 5, 986, 065) 的分案,U. S. Application No. 10/230, 880 要求 U. S. Application No. 09/990, 586 为优先权。U. S. Application Nos. 10/230, 880、09/990, 586、60/343, 306 和 U. S. Pat. Nos. 5, 986, 065 和 6, 555, 319 的公开文本通过引用每一个都被包括进本文。还通过引用包括的是公布的 U. S. 专利申请号 20030190705。

[0400] 本临时申请还涉及于 2003 年 6 月 19 日提交的 U. S. 临时申请序列 No. 60/480, 254, 其公开文本通过引用的方式被包括进本文。

[0401] 已参照优选的实施方式,对本发明进行了详细的描述。但是,应认识到,本领域的技术人员,在考虑到本文公开内容的情况下,可以在本发明的范畴和原则之内进行改良和改进。本文中公开的所有参考文献都以引用的方式被包括进来。

[0402] 本页其余部分有意留作空白。

[0001]

## 序列表

<110> JIAO, JIN-AN  
WONG, HING C.  
EGAN, JACK O.

<120> 用于治疗凝血相关紊乱的组合物和方法

<130> TNA-009.01

<140> 11/311,702

<141> 2005-12-19

<150> PCT/US04/017900

<151> 2004-06-04

<150> 60/538,892

<151> 2004-01-22

<150> 60/480,254

<151> 2003-06-19

<160> 196

<170> PatentIn Ver. 3.3

<210> 1

<211> 321

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(321)

<400> 1

gac att cag atg acc cag tct cct gcc tcc cag tct gca tct ctg gga 48  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
1 5 10 15

gaa agt gtc acc atc aca tgc ctg gca agt cag acc att gat aca tgg 96  
Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp  
20 25 30

tta gca tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa tct cct cag ctc ctg att 144  
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
35 40 45

tat gct gcc acc aac ttg gca gat ggg gtc cca tca agg ttc agt ggc 192  
Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

agt gga tct ggc aca aaa ttt tct ttc aag atc agc agc cta cag gct 240  
Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
65 70 75 80

gaa gat ttt gta aat tat tac tgt caa caa gtt tac agt tct cca ttc 288  
Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe  
85 90 95

## [0002]

acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg gag ctg aaa 321  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                   100                  105

<210> 2  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 2  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
   1                          5                          10                          15  
 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp  
                   20                          25                          30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile  
                   35                          40                          45  
 Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
   50                          55                          60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala  
   65                          70                          75                          80  
 Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe  
                   85                          90                          95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
                   100                          105

<210> 3  
 <211> 351  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(351)

<400> 3  
 gag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag cct ggg gct 48  
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
   1                          5                          10                          15  
 tca gtg cag gta tcc tgc aag act tct ggt tac tca ttc act gac tac 96  
 Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
                   20                          25                          30  
 aac gtg tac tgg gtg agg cag agc cat gga aag agc ctt gag tgg att 144  
 Asn Val Tyr Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                   35                          40                          45  
 gga tat att gat cct tac aat ggt att act atc tac gac cag aac ttc 192  
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe  
   50                          55                          60  
 aag ggc aag gcc aca ttg act gtt gac aag tct tcc acc aca gcc ttc 240

## [0003]

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe  
 65 70 75 80  
 atg cat ctc aac agc ctg aca tct gac gac tct gca gtt tat ttc tgt 288  
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 gca aga gat gtg act acg gcc ctt gac ttc tgg ggc caa ggc acc act 336  
 Ala Arg Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 ctc aca gtc tcc tca 351  
 Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 4  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 4  
 Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Asn Val Tyr Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45  
 Gly Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe  
 65 70 75 80  
 Met His Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr  
 100 105 110  
 Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 5  
 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp  
 1 5

<210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT

[0004]

<213> Mus musculus

<400> 6

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe Thr  
1 5

<210> 8

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Thr Asp Tyr Asn Val Tyr  
1 5

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 9

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe  
1 5

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 11

ctggcaagtc agaccattga t

21

<210> 12

<211> 21

[0005]

<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 12	
gctgccacca acttggcaga t	21
<210> 13	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 13	
caacaagttt acagttctcc attcacgt	28
<210> 14	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 14	
actgactaca acgtgtac	18
<210> 15	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 15	
tatattgatc cttacaatgg tattactatc tacgaccaga acttcaaggg c	51
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Mus musculus	
<400> 16	
gatgtgacta cggcccttga cttc	24
<210> 17	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列描述: 合成的寡核苷酸	
<400> 17	
gcacctccag atgttaactg ctc	23
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	

[0006]

<220>		
<223>	人工序列描述：合成的寡核苷酸	
<400>	18 gaartavccc ttgaccaggc	20
<210>	19	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的寡核苷酸	
<400>	19 ggagggcggcg gttctgacat tgtgmtgwm cartc	35
<210>	20	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的寡核苷酸	
<400>	20 athtcaggcc cagccggcca tggccgargt ycarctkcar caryc	45
<210>	21	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的寡核苷酸	
<400>	21 cccggggccac catgkccccw rctcagytyc tkg	33
<210>	22	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的寡核苷酸	
<400>	22 cccggggccac catggratgs agctgkgmta tsctc	35

[0007]

<210> 23  
 <211> 52  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
       寡核苷酸  
  
 <400> 23  
 atatactcgc gacagctaca ggtgtccact ccgagatcca gctgcagcag tc 52

<210> 24  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
       寡核苷酸  
  
 <400> 24  
 gacctgaatt ctaaggagac tgtgagagtg g 31

<210> 25  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
       寡核苷酸  
  
 <400> 25  
 ttaattgata tccagatgac ccagtctcc 29

<210> 26  
 <211> 45  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
       寡核苷酸  
  
 <400> 26  
 taatcgttcg aaaagtgtac ttacgtttca gctccagctt ggtcc 45

<210> 27  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

[0008]

&lt;400&gt; 27

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys  
 20

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 28

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

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 29

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 30

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

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 31

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
 1 5 10 15

Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

[0009]

&lt;400&gt; 32

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 33

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

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 34

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

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 35

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 20 25 30

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 36

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

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

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

[0010]

<400> 37  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met His  
 1 5 10 15  
 Leu Asn Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 38  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 38  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 39  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 39  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 40  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 40  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 41  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 41  
 tttcgtacgt cttgtcccag atccagctgc agcagtc 37

<210> 42

[0011]

- <211> 43  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物
- <400> 42  
agcgaattct gaggagactg tgacagtggg gccttgccc cag 43
- <210> 43  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物
- <400> 43  
gtgaggcaga gccctggaaa gggccttgag tggattgg 38
- <210> 44  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物
- <400> 44  
ccaatccact caaggccctt tccagggtc tgcctcac 38
- <210> 45  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物
- <400> 45  
gcatctcaac agcctgagat ctgaagacac tgcagtttat ttctgtg 47
- <210> 46  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物

[0012]

<400> 46  
 ctgcagtgtc ttcagatctc aggctggtga gatgcatgaa ggc 43

<210> 47  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 47  
 gtcttcagat ctcaggctgc tgagctccat gaaggctgtg gtg 43

<210> 48  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 48  
 tacgactcac tatagggcga attgg 25

<210> 49  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 49  
 ctggtgacaa gtctaccagc acagcctaca tggagctcag cag 43

<210> 50  
 <211> 43  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 50  
 ctgctgagct ccatgtaggc tgtgctggta gacttgtcaa cag 43

<210> 51  
 <211> 47

[0013]

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物  
  
 <400> 51  
 gcactgaagc cccaggcttc accagctcac ctccagactg ctgcagc 47  
  
 <210> 52  
 <211> 49  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物  
  
 <400> 52  
 ctggggcttc agtgogggta tctgcaagg cttctggta ctcattcac 49  
  
 <210> 53  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物  
  
 <400> 53  
 tcgtacgtct tgtccagat ccagctggtg cagtctggag gtgagc 46  
  
 <210> 54  
 <211> 44  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物  
  
 <400> 54  
 gcactgaagc cccaggcttc ttcacctcac ctccagactg cacc 44  
  
 <210> 55  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

[0014]

- <400> 55  
gcagctctgga cctgagctga agaagcctgg gg 32
- <210> 56  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述：合成的  
引物
- <400> 56  
ccccaggctt cttcagctca ggtccagact gc 32
- <210> 57  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述：合成的  
引物
- <400> 57  
gctggtgcag tctggacctg aggtgaagaa gcc 33
- <210> 58  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述：合成的  
引物
- <400> 58  
ggcttcttca cctcaggtcc agactgcacc agc 33
- <210> 59  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人工序列
- <220>  
<223> 人工序列描述：合成的  
引物
- <400> 59  
gcagctctgga cctgagctgg tgaagcctgg ggcttc 36
- <210> 60  
<211> 36  
<212> DNA

[0015]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
引物

<400> 60

gaagccccag gcttcaccag ctcaggtcca gactgc

36

<210> 61

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
引物

<400> 61

cagtctggac ctgaggtggt gaagcctggg

30

<210> 62

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
引物

<400> 62

cccaggcttc accacctcag gtccagactg

30

<210> 63

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
引物

<400> 63

ttcgaaaagt gtacttacgt ttgatctcca gcttggctcc ag

42

<210> 64

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
引物

<400> 64

[0016]

accggtgata tccagatgac ccagtctcc 29

<210> 65  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 65  
 ggtttagcatg gtatctgcag aaaccaggg 29

<210> 66  
 <211> 29  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 66  
 ccctggtttc tgcagatacc atgctaacc 29

<210> 67  
 <211> 25  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 67  
 tacgactcac tatagggcga attgg 25

<210> 68  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 引物

<400> 68  
 ccacagatgc agacagggag gcaggagact g 31

<210> 69  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

[0017]

<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	69	
	ttcgaaaagt gtacttacgt ttgatctoca gcttgggtacc agcaccgaac g	51
<210>	70	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	70	
	cctgtctgca tctgtgggag atagggtcac catcacatgc	40
<210>	71	
<211>	36	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	71	
	gatctccagc ttggtaccct gaccgaacgt gaatgg	36
<210>	72	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	72	
	gtaggctgct gatcgtgaaa gaaaagtctg tgccagatcc	40
<210>	73	
<211>	47	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列描述：合成的引物	
<400>	73	
	cacgatcagc agcctacagc ctgaagattt tgtaaattat tactgtc	47

[0018]

<210> 74  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物

<400> 74  
gcagcctaca gcctgaagat ttgcaactt attactgtca acaag 45

<210> 75  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物

<400> 75  
cttggtgaca gtaataagtt gcaaaatctt caggctgtag gctgc 45

<210> 76  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物

<400> 76  
cagcagccta cagcctgaag attttgcaaa ttattactgt caac 44

<210> 77  
<211> 44  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 人工序列描述: 合成的  
引物

<400> 77  
gttgacagta ataatttgca aaatcttcag gctgtaggct gctg 44

<210> 78  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人工序列

[0019]

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 引物  
  
 <400> 78  
 cagtggatct ggcacaaagt tttctttcac gatcagcagc 40  
  
 <210> 79  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 引物  
  
 <400> 79  
 gctgctgata gtgaaagaaa actttgtgcc agatccactg 40  
  
 <210> 80  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 引物  
  
 <400> 80  
 ctgcagaaac cagggcaatc tctcagctc ctg 33  
  
 <210> 81  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 引物  
  
 <400> 81  
 caggagctga ggagattgcc ctggtttctg cag 33  
  
 <210> 82  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus  
  
 <400> 82  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
  
 Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys  
 20

[0020]

<210> 83  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 83  
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 84  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 84  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
 1 5 10 15

Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 85  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 85  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 1 5 10

<210> 86  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 肽

<400> 86  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 87  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>

[0021]

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 87

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

<210> 88

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 88

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
1 5 10 15

Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 89

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 89

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

<210> 90

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 90

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys  
20

[0022]

<210> 91  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 91  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 92  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 92  
 Gly Val Pro Ser Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser Phe  
 1 5 10 15  
 Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

<210> 93  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 93  
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 94  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 94  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

[0023]

20

&lt;210&gt; 95

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

&lt;400&gt; 95

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

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

&lt;400&gt; 96

Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Phe	Ser
1				5					10					15	

Phe	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Phe	Val	Asn	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

&lt;210&gt; 97

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

&lt;400&gt; 97

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

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

[0024]

&lt;400&gt; 98

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

Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys  
 20

&lt;210&gt; 99

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

&lt;400&gt; 99

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

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

&lt;400&gt; 100

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
 1 5 10 15

Phe Lys Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Phe Val Asn Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

&lt;400&gt; 101

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

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; PRT

[0025]



1	5	10
<210> 106		
<211> 23		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成的 肽		
<400> 106		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Gln Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10 15
Glu Ser Val Thr Ile Thr Cys		
	20	
<210> 107		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成的 肽		
<400> 107		
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr		
1	5	10 15
<210> 108		
<211> 32		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 人工序列描述: 合成的 肽		
<400> 108		
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser		
1	5	10 15
Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	20	25 30
<210> 109		
<211> 10		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

[0027]

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 109  
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
1 5 10

<210> 110

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 110  
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 111

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 111  
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
1 5 10 15

<210> 112

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 112  
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys  
20 25 30

[0028]

<210> 113  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 113  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 114  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 114  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 115  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 115  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 116  
 <211> 32 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 116  
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser  
 1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys  
 20 25 30

[0029]

<210> 117  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 肽

<400> 117  
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 1 5 10

<210> 118  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 肽

<400> 118  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
 20

<210> 119  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 肽

<400> 119  
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr  
 1 5 10 15

<210> 120  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
 肽

[0030]

<400> 120

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 121

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的  
肽

<400> 121

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

<210> 122

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的  
肽

<400> 122

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys  
20

<210> 123

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的  
肽

<400> 123

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

<210> 124

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

[0031]

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 124

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Lys Phe Ser  
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asn Tyr Tyr Cys  
20 25 30

<210> 125

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 125

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

<210> 126

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 126

Leu Ala Ser Gln Thr Ile Asp Thr Trp Leu Ala  
1 5 10

<210> 127

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 127

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp  
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 128

Gln Gln Val Tyr Ser Ser Pro Phe Thr  
1 5

[0032]

<210> 129

<211> 30

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 129

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
20 25 30

<210> 130

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 130

Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
1 5 10

<210> 131

<211> 32

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 131

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met His  
1 5 10 15

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

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 132

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

<210> 133

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的  
肽

<400> 133

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

[0033]

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 20 25 30

<210> 134  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 134  
 Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 135  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的  
 肽

<400> 135  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met His  
 1 5 10 15

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

<210> 136  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 136  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

<210> 137  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

[0034]

<400> 137

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
20 25 30

<210> 138

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 138

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

<210> 139

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 139

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met His  
1 5 10 15

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

<210> 140

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 140

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

<210> 141

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

[0035]

<400> 141

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
20 25 30

<210> 142

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 142

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

<210> 143

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 143

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met His  
1 5 10 15

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

<210> 144

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 144

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

<210> 145

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

[0036]

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 145

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

Ser Val Gln Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
20 25 30

<210> 146

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 146

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

<210> 147

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 147

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Phe Met Glu  
1 5 10 15

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

<210> 148

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 148

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

<210> 149

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

[0037]

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 149

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

Ser	Val	Gln	Val	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr
			20					25					30

<210> 150

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 150

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

<210> 151

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 151

Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	

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

<210> 152

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 152

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

<210> 153

<211> 30

<212> PRT

[0038]

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 153

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

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

<210> 154

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 154

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

<210> 155

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 155

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

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

<210> 156

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 156

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

<210> 157

<211> 30

[0039]

<212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽  
  
 <400> 157  
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
                   20                  25                  30  
  
 <210> 158  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽  
  
 <400> 158  
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
   1                  5                  10  
  
 <210> 159  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽  
  
 <400> 159  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
   1                  5                  10                  15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
                   20                  25                  30  
  
 <210> 160  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽  
  
 <400> 160  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
   1                  5                  10  
  
 <210> 161

[0040]

<211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 161  
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 20 25 30

<210> 162  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 162  
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 163  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 163  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 164  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽

<400> 164  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

[0041]

<210> 165  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 165  
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
 20 25 30

<210> 166  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 166  
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 167  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 167  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
 20 25 30

<210> 168  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 168  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 1 5 10

[0042]

<210> 169

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 169

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

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

<210> 170

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 170

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

<210> 171

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 171

Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu
1				5					10					15	

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

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述: 合成的肽

<400> 172

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

[0043]

<210> 173  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽  
  
 <400> 173  
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
   1                  5                  10                  15  
  
 Ser Val Arg Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
                   20                  25                  30

<210> 174  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽  
  
 <400> 174  
 Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly  
   1                  5                  10

<210> 175  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的肽  
  
 <400> 175  
 Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
   1                  5                  10                  15  
  
 Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg  
                   20                  25                  30

<210> 176  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 人工序列描述：合成的  
       肽  
  
 <400> 176

[0044]

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

<210> 177

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 177

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

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

<210> 178

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 178

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

<210> 179

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 179

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

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

<210> 180

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

[0045]

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 180

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

<210> 181

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 181

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

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

<210> 182

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 182

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

<210> 183

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 183

Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu  
1 5 10 15

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

[0046]

<210> 184

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 184

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

<210> 185

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 185

Asp Tyr Asn Val Tyr  
1 5

<210> 186

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 186

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 187

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 187

Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe  
1 5

<210> 188

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 188

Asp Tyr Asn Val Tyr  
1 5

[0047]

<210> 189

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 189

Tyr Ile Asp Pro Tyr Asn Gly Ile Thr Ile Tyr Asp Gln Asn Leu Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 190

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列描述：合成的  
肽

<400> 190

Asp Val Thr Thr Ala Leu Asp Phe  
1 5

<210> 191

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 191

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

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

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
100 105

[0048]

<210> 192  
 <211> 332  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 192  
 Glu Phe Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser  
   1                  5                  10                  15  
 Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
                   20                  25                  30  
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
           35                          40                  45  
 Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
   50                          55                  60  
 Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
   65                          70                  75                  80  
 Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
                   85                          90                  95  
 Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro  
           100                          105                  110  
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
   115                          120                  125  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val  
   130                          135                  140  
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe  
   145                          150                  155                  160  
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro  
           165                          170                  175  
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr  
           180                          185                  190  
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val  
   195                          200                  205  
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala  
   210                          215                  220  
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg  
   225                          230                  235                  240  
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly  
           245                          250                  255  
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro  
           260                          265                  270  
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser  
           275                          280                  285

[0049]

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln  
 290 295 300

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His  
 305 310 315 320

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 193

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 193

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

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

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

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

<210> 194

<211> 329

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 194

Glu Phe Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys  
 1 5 10 15

Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu  
 35 40 45

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu  
 50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr  
 65 70 75 80

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val  
 85 90 95

[0050]

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro  
 100 105 110  
 Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 115 120 125  
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 130 135 140  
 Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr  
 145 150 155 160  
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 165 170 175  
 Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 180 185 190  
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 195 200 205  
 Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 210 215 220  
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met  
 225 230 235 240  
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 245 250 255  
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 260 265 270  
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 275 280 285  
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val  
 290 295 300  
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 305 310 315 320  
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 325

<210> 195

<211> 14

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 195

Trp Val Arg Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly  
 1 5 10

<210> 196

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

[0051]

<400> 196

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

## H36.D2.B7 抗组织因子轻链可变结构域

GACATTCAGATGACCCAGTCTCCTGCCCTCCAGTCTGCATCTCTGGGAGAAAGTGTCAACCATCACATGC  
 D I Q M T Q S P A S Q S A S L G E S V T I T C  
 CTGGCAAGTCAGACCATGATACATGGTTAGCATGGTATCAGCAGAAACCAGGAAATCTCCTCAGCTC  
L A S Q T I D T W L A W Y Q Q K P G K S P Q L  
 CTGATTTATGCTGCCACCACCTTGGCAGATGGGTCCTCCATCAAGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGCACA  
L I Y A A T N L A D G V P S R F S G S G T  
 AAATTTCTTCAAGATCAGCAGCCTACAGGCTGAAGATTTTGTAATAATTACTGTCAACAAGTTTAC  
 K F S F K I S S L Q A E D F V N Y Y C Q Q V Y  
AGTTCCTCATTCAAGTTCGGTGGACCAAGCTGGAGCTGAAA  
S S P F T F G A G T K L E L K

图 1A

## H36.D3.B7 抗组织因子重链可变结构域

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCCTGGGGCTTCAGTGCAGGTATCCTGCAAG  
 E I Q L Q Q S G P E L V K P G A S V Q V S C K  
 ACTTCTGGTTACTCATTCACTGACTACAACGTGTACTGGTGAGGCAGAGCCATGGAAGAGCCCTTGAG  
 T S G Y S F T D Y N V Y  
 TGGATTGGATATATGATCCTTACAATGGTATTACTATCTACGACCAGAACTTCAAGGGCAAGGCCACA  
W I G Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G K A T  
 TTGACTGTTGACAAGTCTTCCACCACAGCCCTTCATGCATCTCAACAGCCCTGACATCTGACGACTCTGCA  
 L T V D K S S T T A F M H L N S L T S D D S A  
 GTTATTCTGTGCAAGAGATGTGACTACGGCCCTTGACTTCTGGGGCCCAAGGCACCACCTCACAGTC  
 V Y F C A R D V T T A L D F  
 TCCTCA  
 S S

CDR 区域以下划线标出(单下划线用于核酸序列, 双下划线用于氨基酸序列)

图 1B

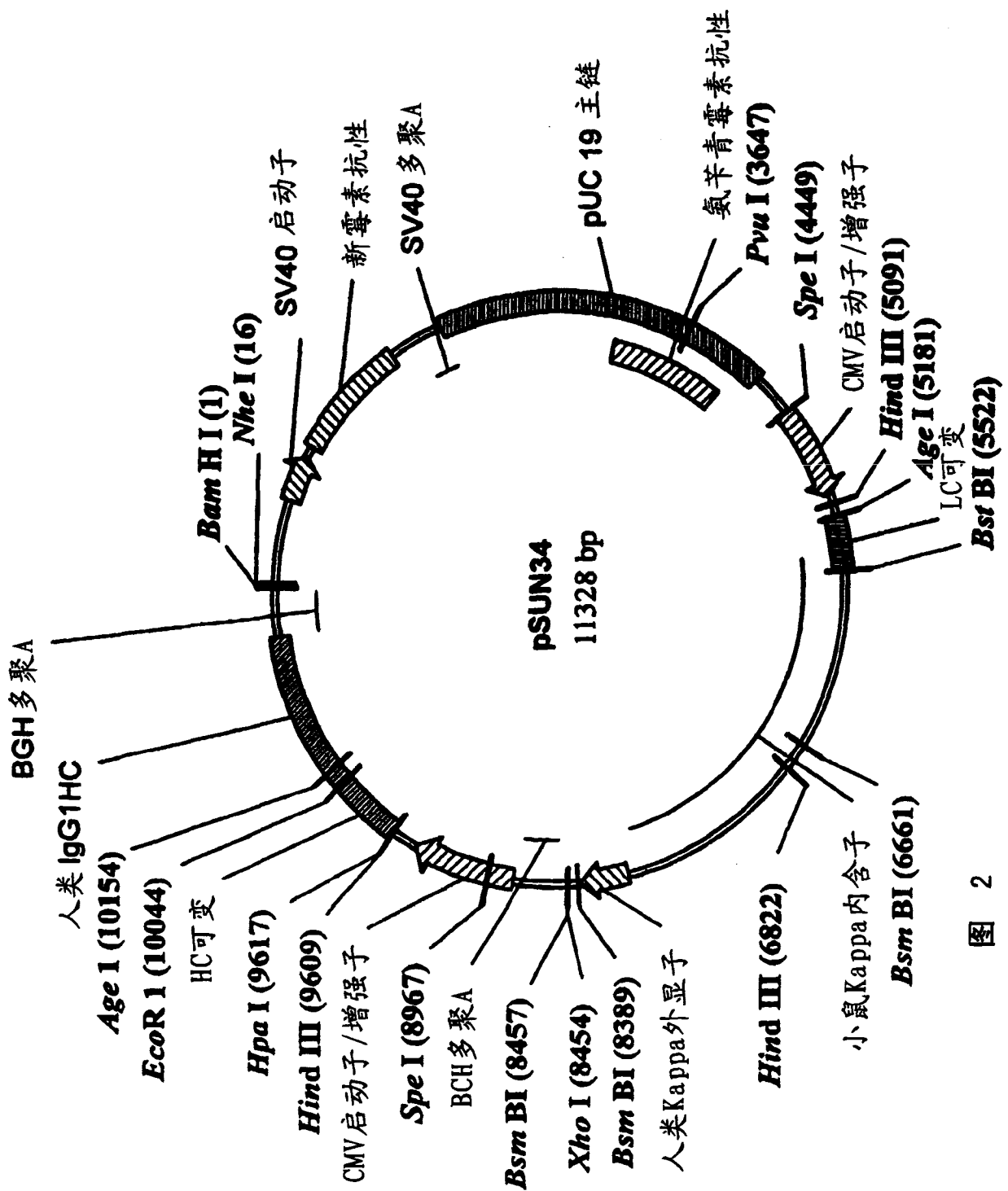


图 2

注意：1. 氨基酸序列以单字母编码表示。  
 2. 在阅读框4(FR4)可变结构域的最后一个残基之后立即就是h0AT或hFAT的恒定结构域的第一个残基。

FR1 (23 AA)	FR2 (15 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (10 AA)	名称
1 10 20 35	49 57 60	70 80	88 98 107	
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYQKPGKSPQLLIY GVESRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGAGTKLELK cH36-LC				
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGAGTKLEIK LC-03				
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPS FSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGAGTKLEIK LC-04				
DIQMTQSPASL <u>S</u> ASVGD <u>R</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGQGTKLEIK LC-05				
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGTKFSFKISSLQAEDFVNYYC FGQGTKLEIK LC-06				
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>D</u> FSFTISSLQPEDFATYYC FGQGTKLEIK LC-07				
DIQMTQSPASQASLGE <u>S</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>D</u> FSFTISSLQPEDFATYYC FGQGTKLEIK LC-08				
DIQMTQSPASL <u>S</u> ASVGD <u>R</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>D</u> FSFTISSLQPEDFATYYC FGQGTKLEIK LC-09				
DIQMTQSPASL <u>S</u> ASVGD <u>R</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>D</u> FSFTISSLQPEDFANYYC FGQGTKLEIK LC-10				
DIQMTQSPASL <u>S</u> ASVGD <u>R</u> VTITC WYLQKPGKSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>K</u> FSFTISSLQPEDFANYYC FGQGTKLEIK LC-11				
DIQMTQSPASL <u>S</u> ASVGD <u>R</u> VTITC WYLQKPGQSPQLLIY GVPSRFSGSGSGT <u>K</u> FSFTISSLQPEDFANYYC FGQGTKLEIK LC-12				

图 3A

cH36的轻链CDR序列

CDR1 (11 AA)	CDR2 (7 AA)	CDR3 (9 AA)
24 34	50 56	89 97
L A S Q T I D T W L A	A A T N L A D	Q Q V Y S S P F T

图 3B

图 3C

图 3D

除HC-08之外，其它所有的HC突变体和cH36含有CDR2上第64位上的F。  
 HC-08具有F64到L的突变(64位上从F变为L)

FRI (30 AA)	FR2 (14 AA)	FR3 (32 AA)	FR4 (11 AA)	名称
1	30 36	49 67	75 85 95 107 117	
EIQQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSHGKSL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKSS <sup>T</sup> AFMHLN <sup>S</sup> LTSDDS <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGTLL <sup>T</sup> VSS	CH36-HC
QIQQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSHGKSL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKSS <sup>T</sup> AFMHLN <sup>S</sup> LTSDDS <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-01
QIQQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKSS <sup>T</sup> AFMHLN <sup>S</sup> LTSDDS <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-02
QIQQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKSS <sup>T</sup> AFMHLN <sup>S</sup> LRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-03
QIQQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKSS <sup>T</sup> AFMHLN <sup>S</sup> LRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-04
DIQLQQSGPELVKPGASVQVSCKTS <sup>Y</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-05
DMQLQQSGGELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-06
QIQLVQSGGELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-07
QIQLVQSGGELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-08
QIQLVQSGGELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-08R1
QIQLVQSGPEVKRPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-11
QIQLVQSGPELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-12
QIQLVQSGPELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-09
QIQLVQSGPELVKPGASV <sup>R</sup> VSCCKA <sup>S</sup> SGYSFT	WVRQSPGKGL <sup>E</sup> EWIG	KATLTVDKS <sup>T</sup> STAYMEL <sup>S</sup> SLRS <sup>E</sup> DI <sup>A</sup> VYFCAR	WGQGT <sup>T</sup> VTVSS	HC-10

图 4A

重链CDR序列

CDR1 (5aa)	CDR2 (17 AA)	CDR3 (8AA)	名称
31 35	50	99	106
20 D Y N V Y	Y I D P Y N G I T I Y D Q N F K G	D V T T A L D F	CH36
31 35	50	99	106
D Y N V Y	Y I D P Y N G I T I Y D Q N L K G	D V T T A L D F	HC-08

图 4B

图 4C

图 4D

人类kappa轻链恒定结构域的序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSSTLTLSKADYEKHK  
KVIYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 5A

人类IgG1重链恒定结构域的序列:

EFASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYIC  
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV  
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL  
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

- 注意: 1. 氨基酸序列以单字母编码表示。  
2. 在读取框4 (FR4) 可变结构域的最后残基之后立即就是hOAT或hFAT的恒定结构域的第一个残基。  
3. 对hOAT或hFAT而言, LC恒定区是相同的。

图 5B

人类kappa轻链恒定结构域的序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEK  
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

图 6A

人类IgG4重链恒定结构域的序列:

EFASTKGPSVFFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTKTY  
TCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYYVDGV  
EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL  
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNNHHTQKSLSLSLGK

- 注意: 1. 氨基酸序列以单字母编码表示。  
2. 在阅读框4 (FR4) 可变结构域的最后残基之后立即就是h0AT或hFAT的恒定结构域的第一个残基。  
3. 对h0AT或hFAT而言, LC恒定区是相同的。

图 6B

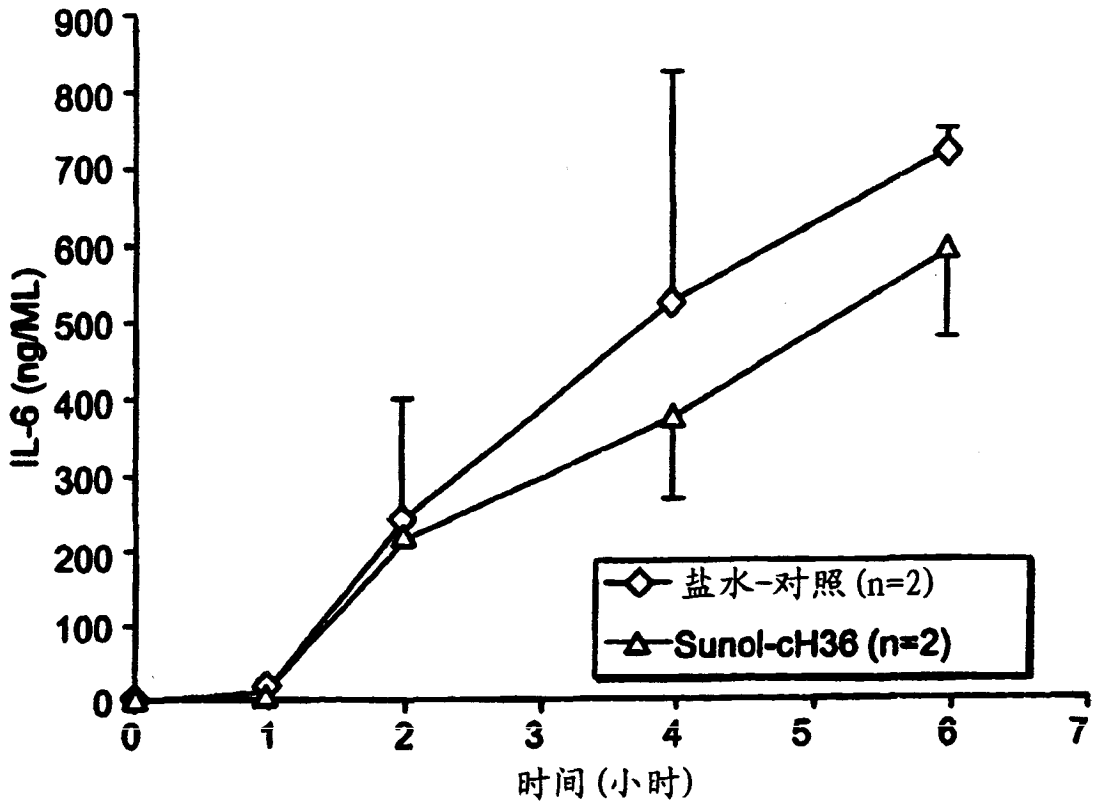


图 7A

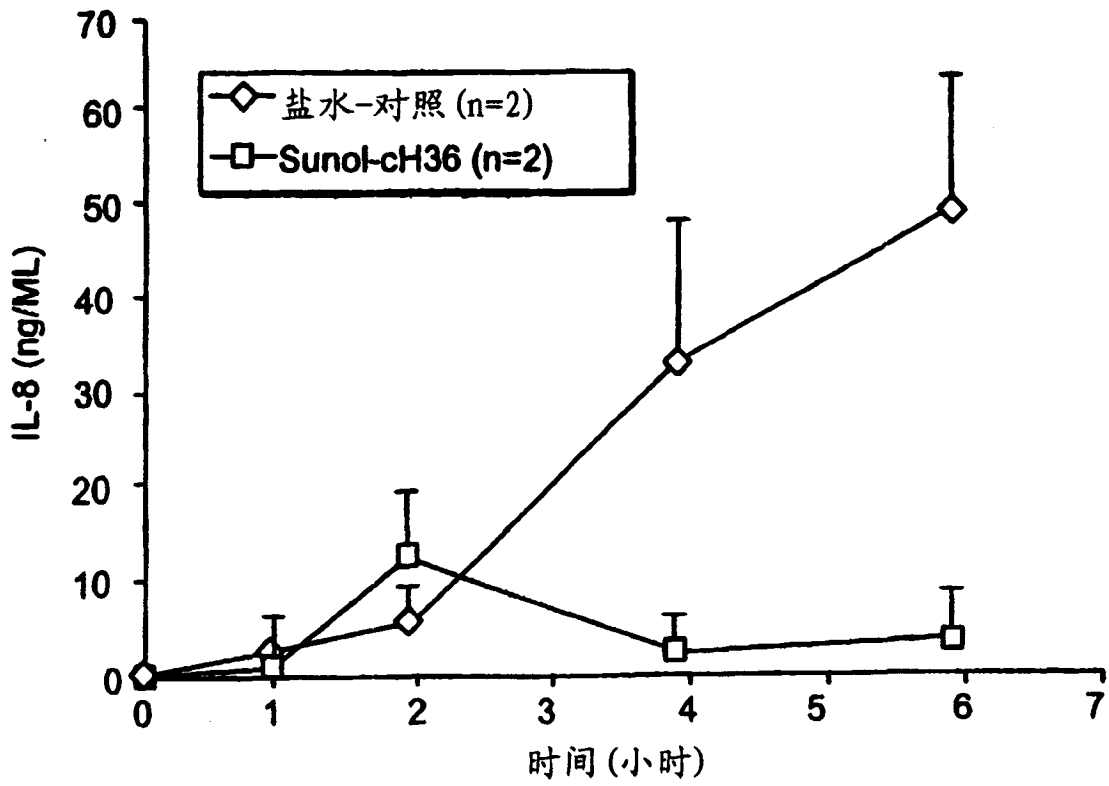


图 7B

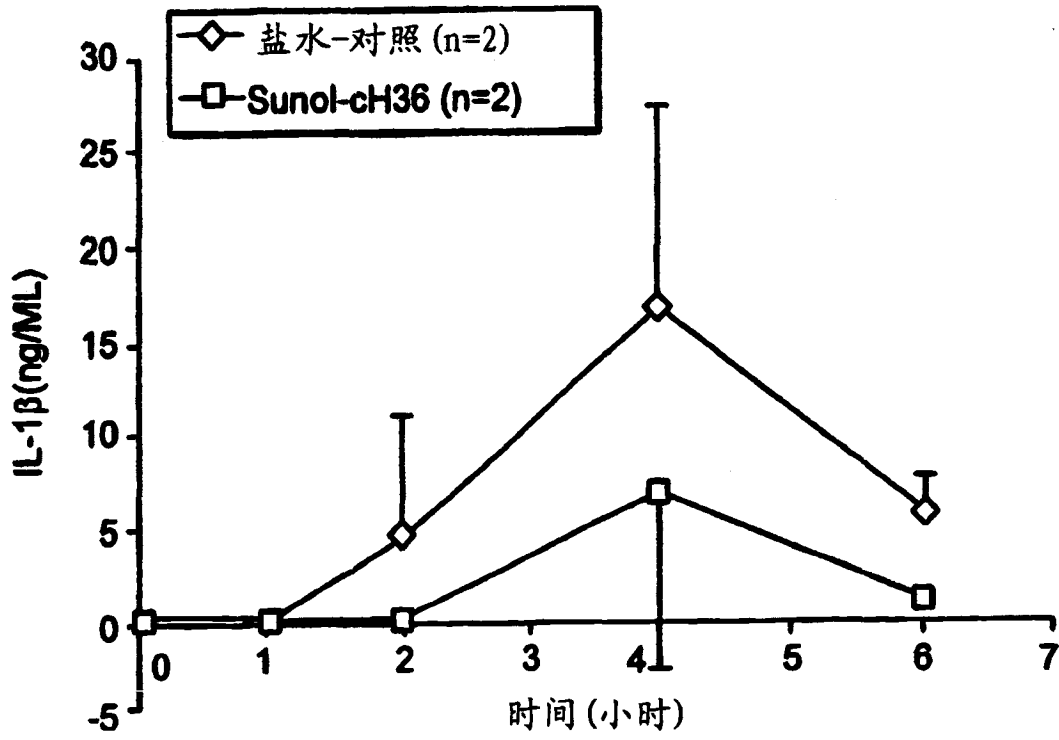


图 7C

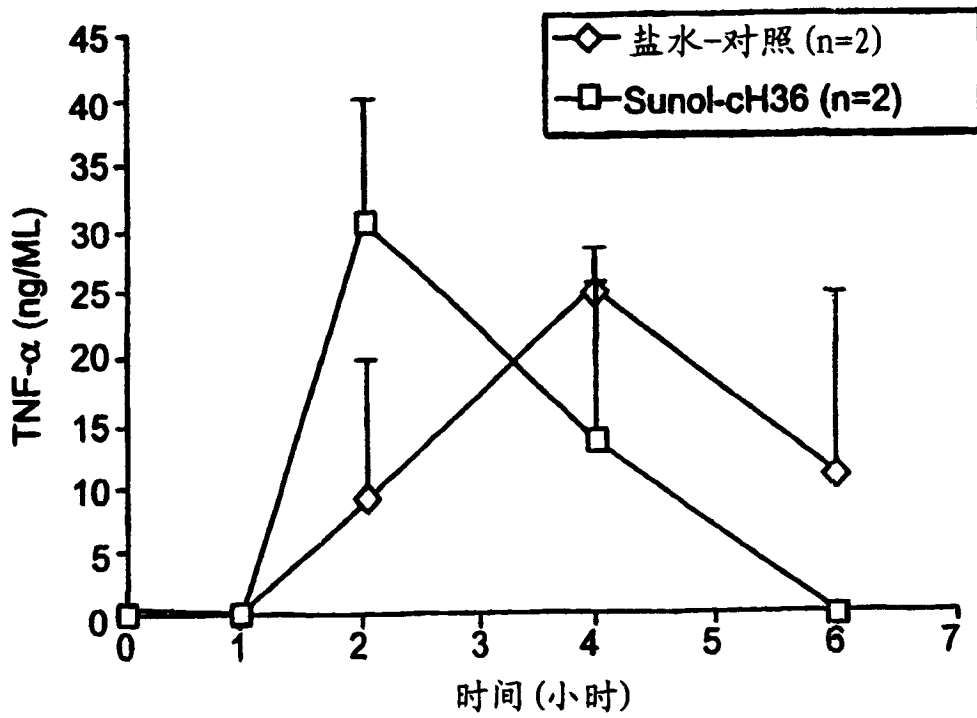


图 7D

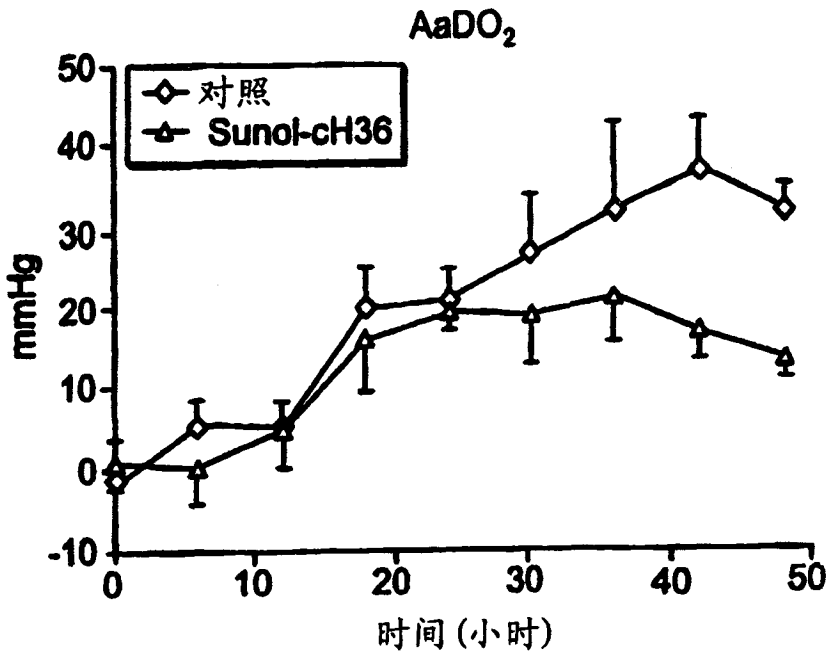


图 8A

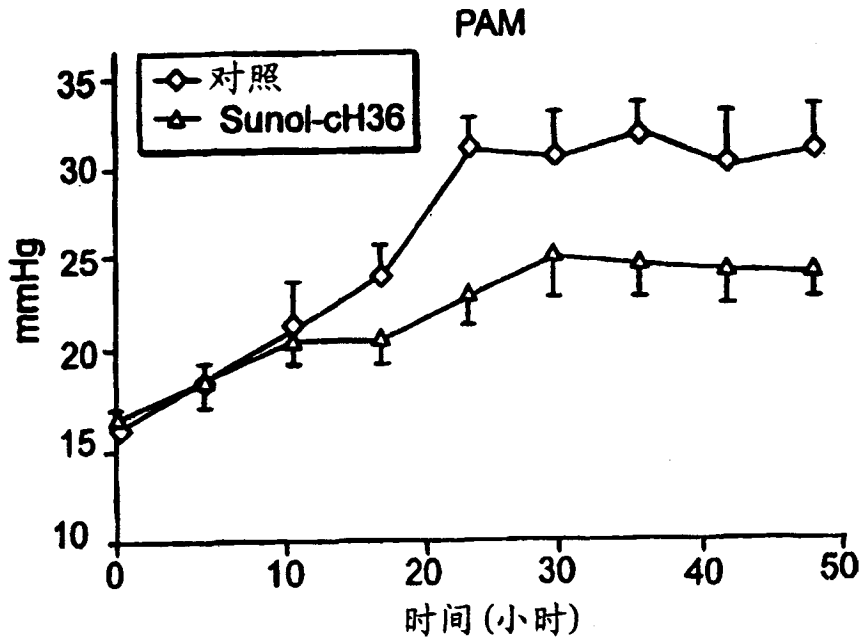


图 8B

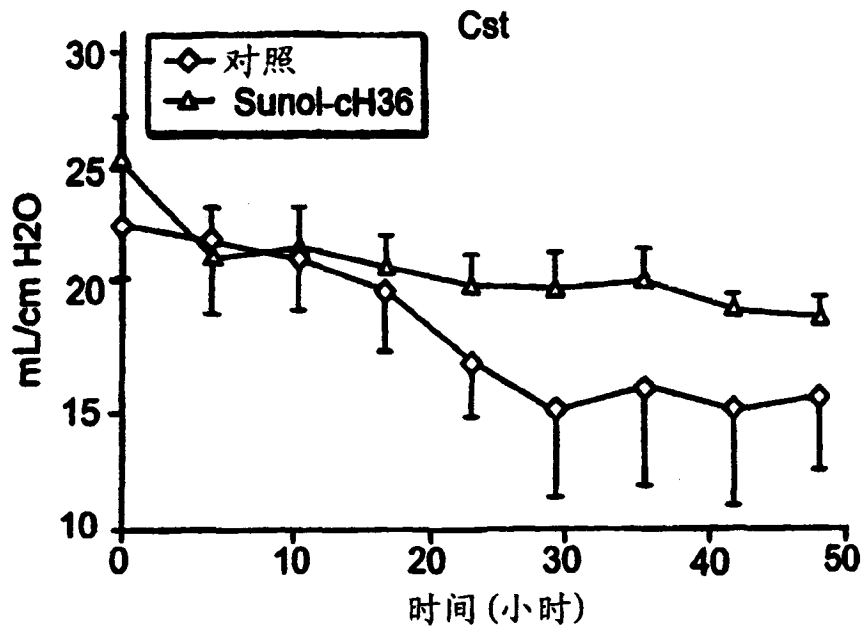


图 8C

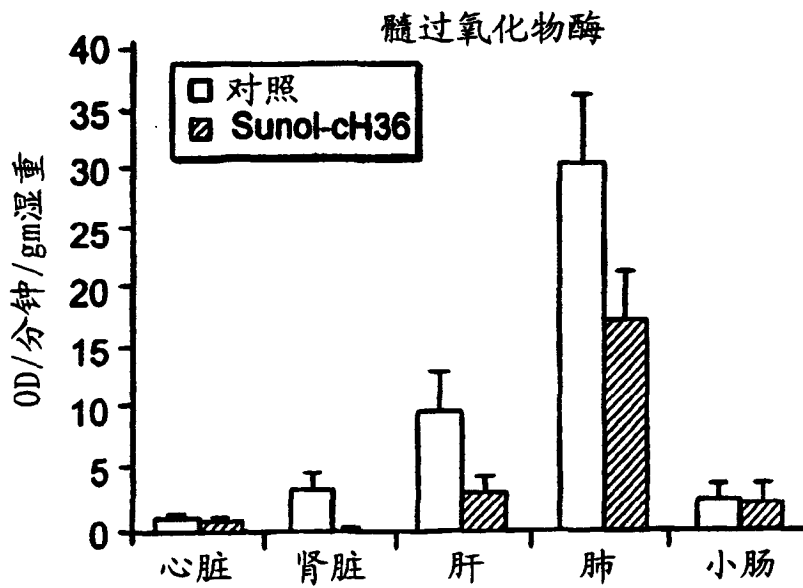


图 9A

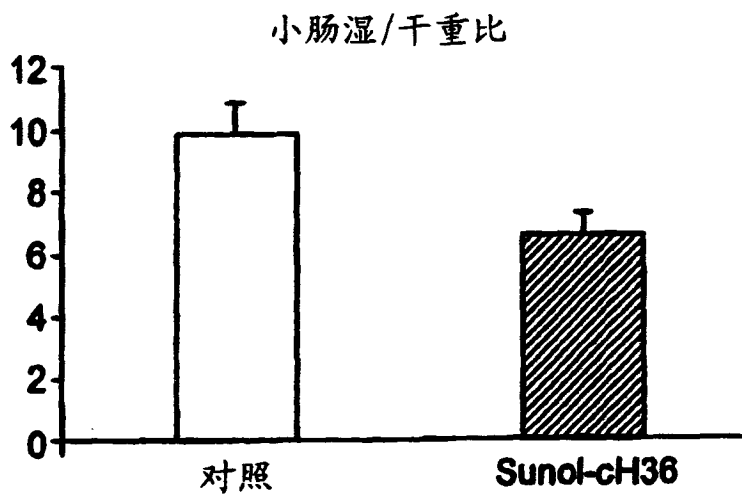


图 9B

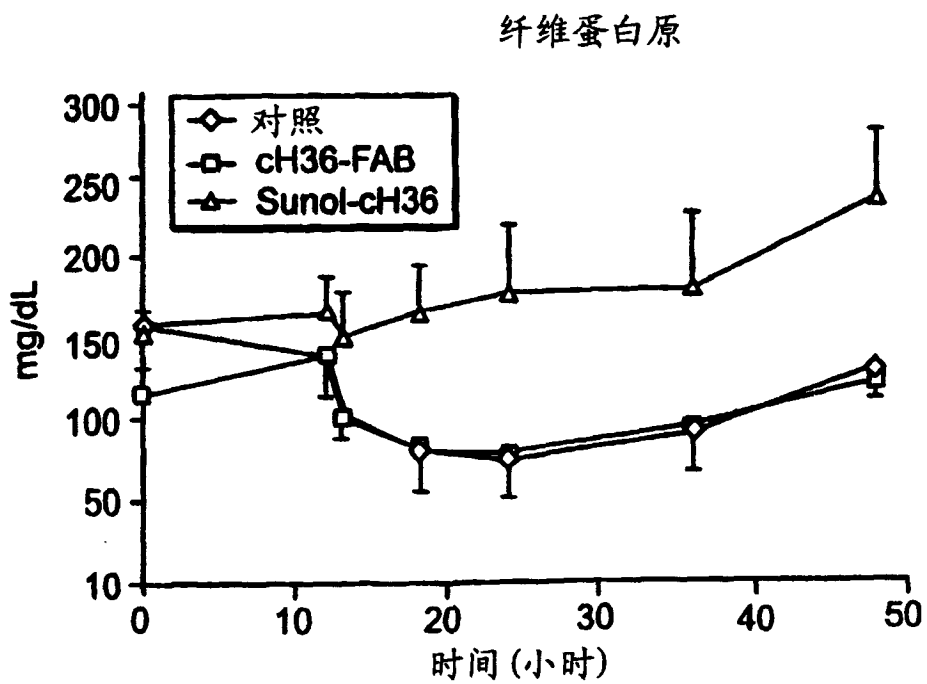


图 10A

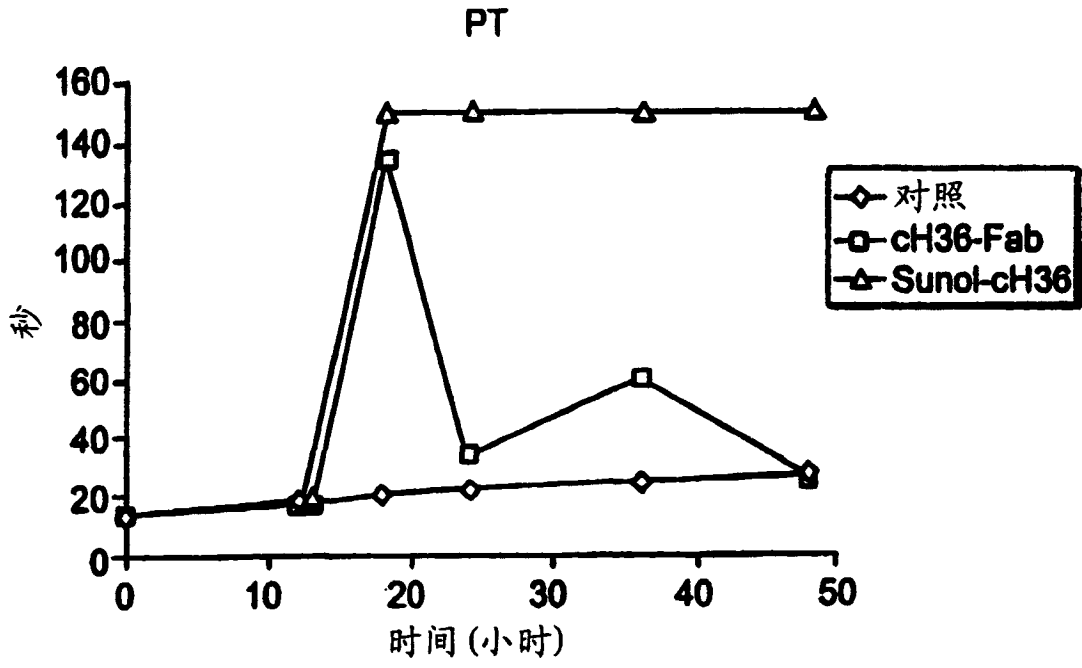


图 10B

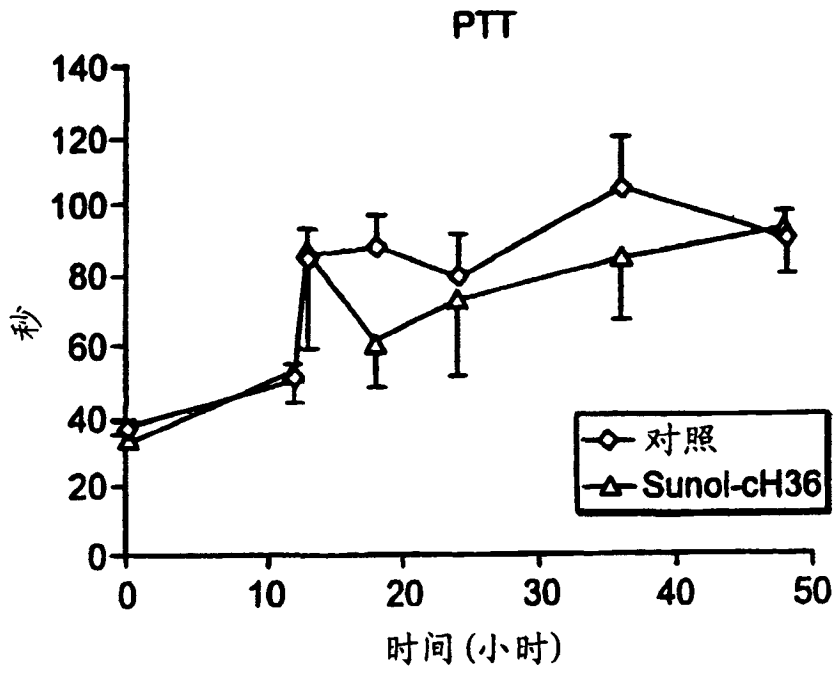


图 10C

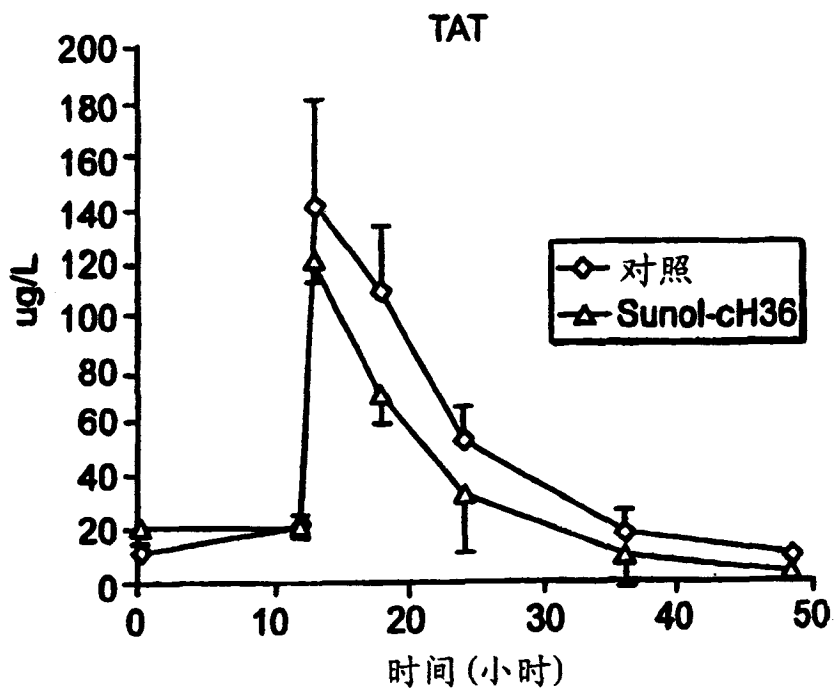


图 10D

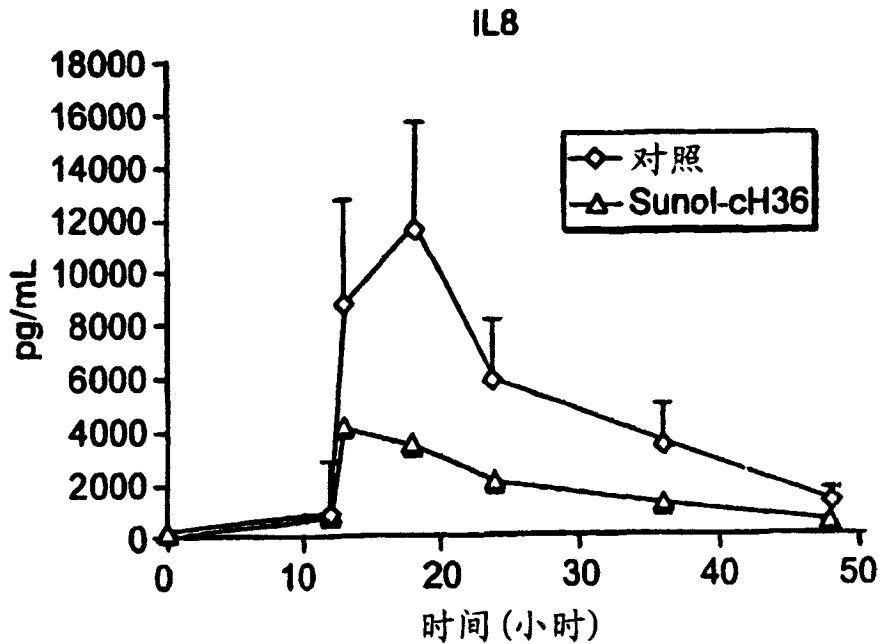


图 11A

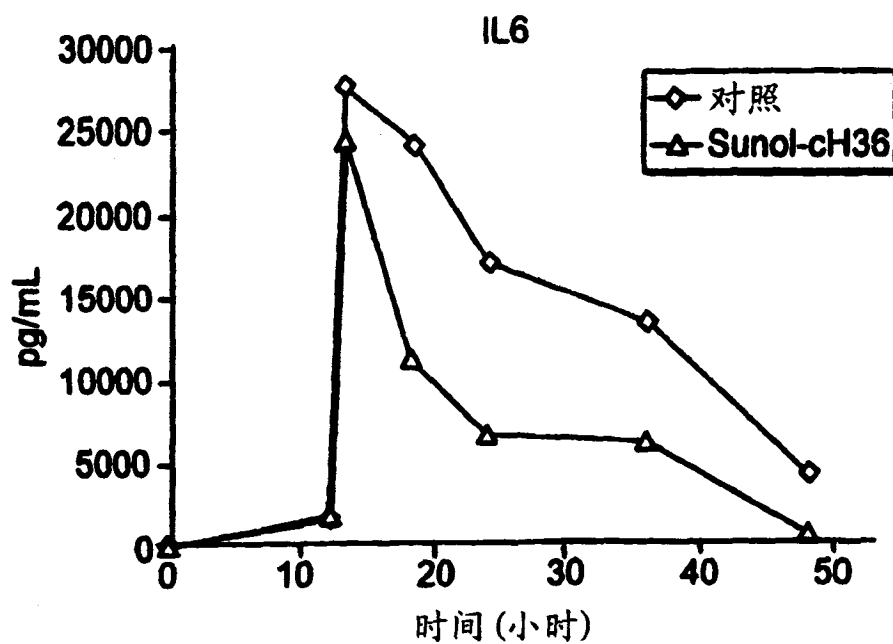


图 11B

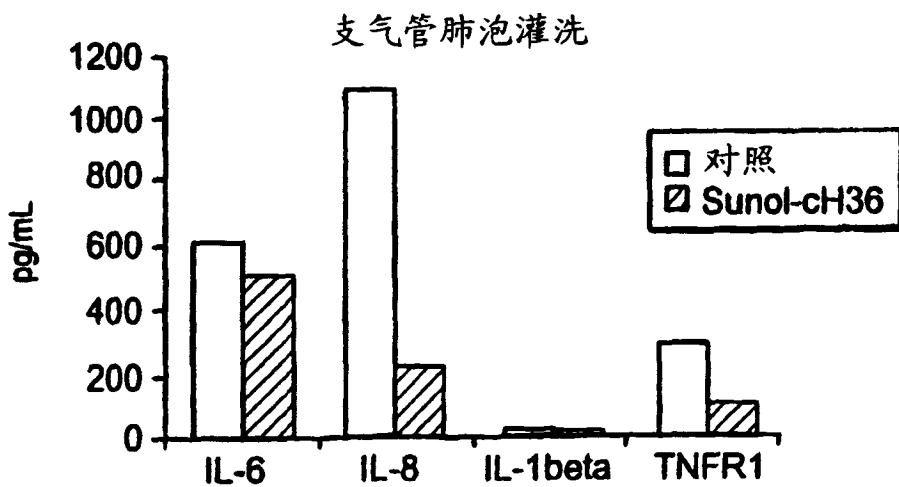


图 12

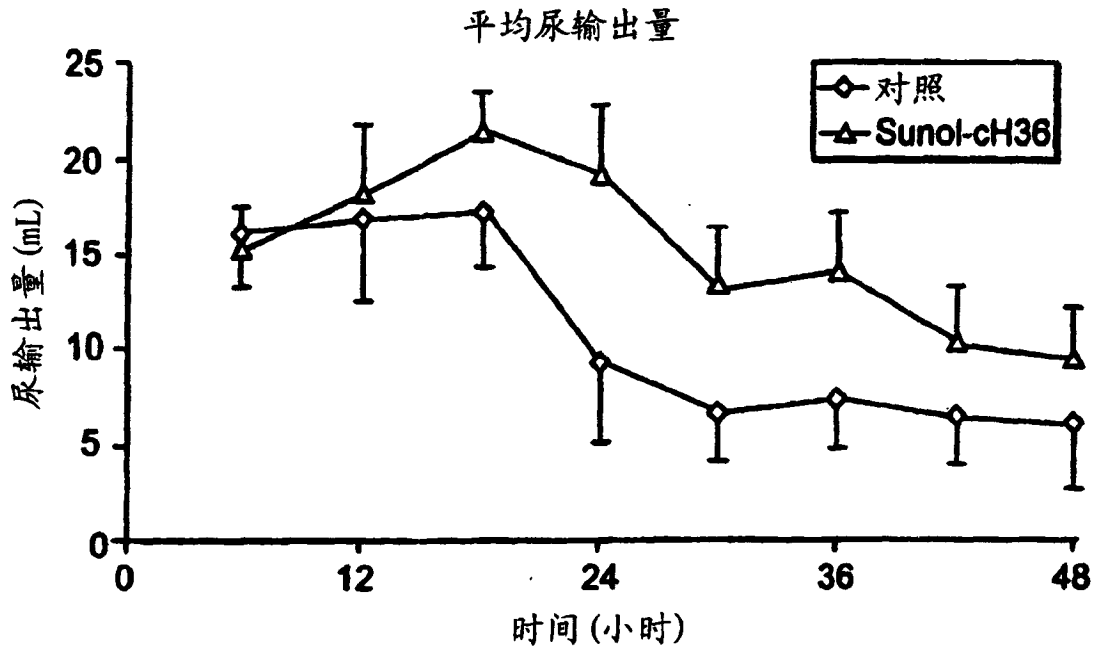


图 13A

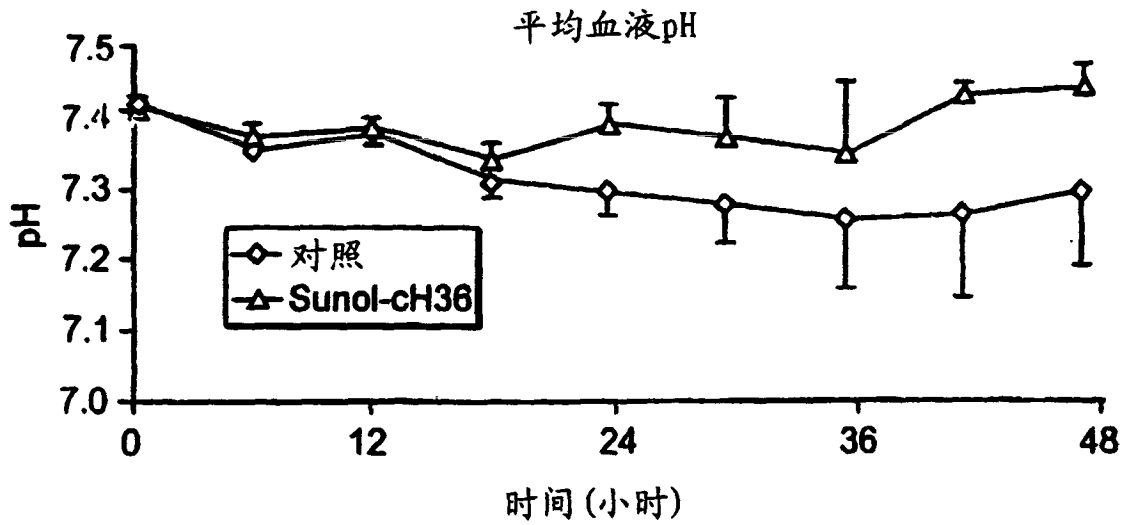


图 13B

