



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110520152 A

(43)申请公布日 2019.11.29

(21)申请号 201880018514.6

(22)申请日 2018.03.14

(30)优先权数据

62/471,045 2017.03.14 US

62/576,278 2017.10.24 US

62/623,269 2018.01.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022443 2018.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/170134 EN 2018.09.20

(71)申请人 俄亥俄州创新基金会

地址 美国俄亥俄州

(72)发明人 胡志伟

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司

公司 11713

代理人 康健 王思琪

(51)Int.Cl.

A61K 39/00(2006.01)

A61K 38/36(2006.01)

A61K 38/48(2006.01)

A61K 38/00(2006.01)

A61K 47/68(2017.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/04(2006.01)

权利要求书2页 说明书43页

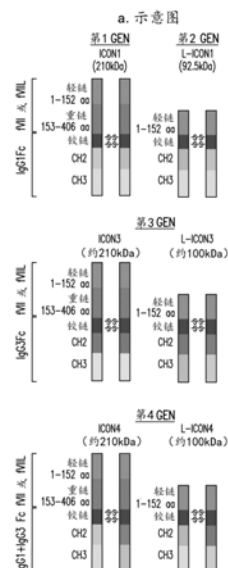
序列表26页 附图14页

(54)发明名称

与靶向组织因子的IGG3免疫缀合物有关的方法和组合物

(57)摘要

本发明公开了与免疫缀合物有关的方法和组合物。特别公开了免疫缀合物,所述免疫缀合物包含IgG3的Fc部分以及因子VII轻链或因子VII。还公开了免疫缀合物蛋白,其中所述免疫缀合物蛋白包含缀合到因子VII的IgG1和IgG3免疫球蛋白的杂合Fc区。这些免疫缀合物能够靶向表达组织因子(TF)的细胞。



1. 一种包含免疫缀合物蛋白的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白包含缀合到因子VII的IgG3免疫球蛋白的Fc区。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述因子VII是因子VII轻链。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述因子VII是全长。

4. 根据权利要求3所述的组合物,其中所述因子VII包含K341A突变。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物靶向表达组织因子(TF)的细胞。

6. 根据权利要求2所述的组合物,其中因子VII轻链包含人和鼠因子VII。

7. 根据权利要求1所述的组合物,其中IgG3包含R435H突变。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白包含SEQ ID NO:2。

9. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白由包含SEQ ID NO:1的核酸编码。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白被编码为表达载体中的分泌分子。

11. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述表达载体是复制缺陷型腺病毒载体。

12. 根据权利要求6所述的组合物,其中所述表达载体是腺相关表达载体。

13. 根据权利要求1所述的组合物,其中光敏剂偶联到所述免疫缀合物。

14. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述光敏剂包含光动力学染料。

15. 一种用于治疗或预防对其有需要的受试者的疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据权利要求1所述的组合物。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述疾病与组织因子(TF)表达相关。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述疾病包括涉及已血管化的肿瘤、血栓形成、类风湿性关节炎、子宫内膜异位或黄斑变性的病理性新生血管。

18. 根据权利要求15所述的方法,其中所述疾病与表达TF的巨噬细胞相关。

19. 根据权利要求15所述的方法,其中所述疾病是病毒感染,诸如埃博拉或HIV。

20. 根据权利要求15所述的方法,其中所述疾病是动脉粥样硬化。

21. 根据权利要求15所述的方法,其中根据权利要求1所述的组合物能够预防癌转移。

22. 根据权利要求15所述的方法,其中根据权利要求1所述的组合物能够治疗转移癌。

23. 根据权利要求15所述的方法,其中通过施用药学上可接受的载体中的所述免疫缀合物蛋白来治疗所述受试者。

24. 一种包含免疫缀合物蛋白的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白包含缀合到因子VII的IgG1和IgG3免疫球蛋白的杂合Fc区。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述因子VII是因子VII轻链。

26. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述因子VII是全长。

27. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述因子VII包含K341A突变。

28. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述组合物靶向表达组织因子(TF)的细胞。

29. 根据权利要求25所述的组合物,其中因子VII轻链包含人和鼠因子VII。

30. 根据权利要求24所述的组合物,其中IgG3包含R435H突变。

31. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白被编码为表达载体中的

分泌分子。

32. 根据权利要求31所述的组合物,其中所述表达载体是复制缺陷型腺病毒载体。

33. 根据权利要求31所述的组合物,其中所述表达载体是腺相关表达载体。

34. 根据权利要求24所述的组合物,其中光敏剂偶联到所述免疫缀合物。

35. 根据权利要求34所述的组合物,其中所述光敏剂包含光动力学染料。

与靶向组织因子的IGG3免疫缀合物有关的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年3月14日提交的美国临时申请号62/471,045;2017年10月24日提交的美国临时申请号62/576,278;以及2018年1月29日提交的美国临时申请号62/623,269的权益,所有这三份临时申请据此全文以引用方式并入本文。

[0003] 政府支持条款

[0004] 本发明是在由国家转化科学促进中心(National Center for Advancing Translational Sciences)授予的批准号UL1TR001070的政府资助下完成的。政府对本发明拥有一定的权利。

背景技术

[0005] 组织因子(“TF”)是作为凝血级联主要引发剂的跨膜糖蛋白。在正常生理状况下,活性TF不与血液接触。在血管损伤期间,内皮下TF和胶原暴露于血液会导致凝血因子和血小板活化,并且随后引起止血栓子形成。多种临床环境中TF表达的不当诱导能够引起危及生命的血栓形成和/或促成病理性并发症。据信斑块破裂后的TF暴露会引起血栓性闭塞,从而引起急性心肌梗塞和中风。在这些环境中,凝血因子所活化的促炎信号通路还会促成水肿形成和梗塞面积增加。与血管成形术相关的血管损伤引起SMC上的TF上调,据信这会诱导与再狭窄相关的细胞信号通路。癌症和革兰氏阴性脓毒症中的TF过表达引起危及生命的血栓形成以及炎性通路的活化。

[0006] TF是病理性血管生成的调节剂。体内研究表明,TF也是体内唯一病理性血管生成血管内皮细胞(VEC)表面受体,这是因为其在体内选择性表达于患者或动物模型的肿瘤血管(Contrino等人,1996年;Folkman等人,1996年;Hu等人,1999年;Hu等人,2001年;Cheng等人,2011年;Duanmu等人,2011年)、眼部(Bora等人,2003年)和异位子宫内膜(Krikun等人,2010年)新生血管中的血管生成VEC上。血管内皮生长因子(VEGF)在血管生成依赖性癌和非恶性人疾病(Ferrara等人,2002年)诸如黄斑变性(Klagsbrun等人,1987年)、类风湿性关节炎(Afuwape等人,2002年)和子宫内膜异位(Fujimoto等人,1999年)中起着中心作用。具体地讲,VEGF通过结合于这些血管生成依赖性疾病的病理性新生血管(通常为微血管或毛细血管)中VEC上的VEGR受体来刺激血管生成(Hu等人,《血管生成》(Angiogenesis),2016年)。通过使用VEGF诱导的体外血管生成血管内皮模型,证实了TF是血管生成特异性受体及因子VII靶向治疗的靶标,从而表明TF靶向剂能够具有治疗癌(实体癌和白血病)、湿性年龄相关性黄斑变性(AMD)、子宫内膜异位和类风湿性关节炎的治疗潜能。

[0007] TF是一种常见又有特异性的生物标志物,而且是实体癌中的癌细胞、癌干细胞(CSC)(Hu等人,《肿瘤靶标》(Oncotarget),2016年)和肿瘤血管内皮细胞的治疗靶标。TF在这些癌细胞中高表达,例如,乳腺癌中表达率为80%-100%,三阴性乳腺癌中表达率为50%-85%(Hu等人,《癌症免疫研究》(Cancer Immunol Res),2018年),肺癌中表达率为40%-80%,并且卵巢癌中表达率为84%。这三种类型的癌症不仅难以控制,而且是美国 and 全世界的主要死因且通常会形成基于CSC的化疗和放疗抗性(Vidal等人,2014年;

Moncharmont等人,2012年;Koch等人,2010年)。除了乳腺、肺和卵巢癌之外,TF还以高百分比表达于许多其他人实体癌以及白血病和肉瘤中(Hu,《抗体》(Antibodies),2018年),例如原发性黑色素瘤中表达率为95%且转移性黑色素瘤中表达率为100%,胰腺癌中表达率为53%-90%,结肠直肠癌中表达率为57%-100%,肝细胞癌中表达率为63%-100%,原发性和转移性前列腺癌中表达率为60%-78%,并且神经胶质瘤中表达率为47%-75%。最近已证实,乳腺、肺和卵巢癌中的癌干细胞表达了TF,并且TF靶向剂能够根除这些表达TF的癌干细胞而不出现药物抗性(Hu等人,《肿瘤靶标》(Oncotarget),2016年)。

[0008] 还已证实,实验动物的一种AMD模型脉络膜新生血管(CNV)表达了TF(Bora等人,2003年)。最近已证实,异位子宫内膜病灶中的血管生成血管内皮细胞表达了TF(Krikun等人,2010年)。

[0009] 需要的是与免疫靶向剂有关的方法和组合物,该免疫靶向剂特异性地靶向表达TF的血管生成VEC和癌细胞,并且表现出相比于靶向表达TF的细胞的其他试剂更强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。

发明内容

[0010] 本文公开了包含免疫缀合物蛋白的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白包含缀合到因子VII轻链或全长(含或不K341A)的IgG3免疫球蛋白的Fc区。这些免疫缀合物在本文中称为第三代靶向组织因子的ICON,分别被命名为L-ICON3和ICON3。还公开了使用L-ICON3和ICON3的方法和试剂盒。

[0011] 本文还公开了包含免疫缀合物蛋白的组合物,其中所述免疫缀合物蛋白包含缀合到因子VII轻链或全长(含或不K341A)的IgG1和IgG3免疫球蛋白的杂合Fc区。这些免疫缀合物在本文中称为第四代靶向组织因子的ICON,分别被命名为L-ICON4和ICON4。

[0012] 在附图和下面的描述中阐述了本发明的一个或多个实施方案的细节。根据下面的描述和附图以及权利要求,本发明的其他特征、目标和优点将显而易见。

附图说明

[0013] 并入本说明书中并且构成本说明书一部分的附图示出了本公开的若干方面,并与说明书一起用于解释本公开的原理。

[0014] 图1A至图1C示出了靶向组织因子的免疫缀合物(ICON)的第三代和第四代的示意图和表征。1A示出了靶向TF的免疫缀合物(ICON)的第一代、第二代、第三代(L-ICON3和ICON3)和第四代(L-ICON4和ICON4)的示意图。1B示出了ICON1、L-ICON1、L-ICON3和ICON3的分子量。1C示出了L-ICON1和L-ICON3的荧光蛋白印迹。注意:L-ICON1和ICON1蛋白的上样量为3 μ g/泳道,并且L-ICON3蛋白的量为L-ICON1和ICON1的约一半(1.5 μ g)。

[0015] 图2示出了重组L-ICON1和L-ICON3蛋白之间的亲和纯化差异。将从L-ICON1或L-ICON3的CHO生产细胞获取的、补充有1 μ g/ml维生素K1的1ml无血清培养基(SFM4CHO)(西格玛公司(Sigma))与蛋白A或蛋白G磁微珠(伯乐公司(Bio-Rad))一起温育,并且将所捕获的蛋白在1 $\times$ SDS上样缓冲液中洗脱并通过SDS-PAGE进行分析,然后使用1:10,000稀释的抗人IgG HRP缀合物(西格玛公司(Sigma))和ECL试剂(Pierce公司)进行蛋白印迹。不含L-ICON蛋白的新鲜无血清培养基(SFM)用作阴性培养基对照。

[0016] 图3A至图3F示出了L-ICON3蛋白能够结合鼠和人癌细胞两者,这允许从动物研究转化成人临床试验并且表明L-ICON3疗法具有治疗多种实体癌的治疗潜能。(ns:不显著)。

[0017] 图4A和图4B示出了L-ICON3能够引发ADCC和CDC(补体依赖性细胞毒作用)以杀伤靶癌细胞。图4A示出了L-ICON3相比于L-ICON1在体外能更有效地介导ADCC以杀伤人卵巢癌细胞。图4B示出了CDC。人IgG(hIgG)用作同种型阴性对照。

[0018] 图5A至图5B示出了L-ICON1相比于ICON在体外对癌细胞(MDA-MB-231)具有更强的结合力,并且在体内能更有效地治疗CB-17SCID小鼠的原位小鼠模型中的人癌(MDA-MB-231)。通过每周瘤内注射(箭头)来施用编码ICON、L-ICON1的腺病毒载体或未编码插入片段而作为对照(AdBlank)。图5B中每组有5只小鼠。

[0019] 图6A至图6C示出了L-ICON3相比于L-ICON1在体内鼠TNBC的原位小鼠模型中更有效。图6A示出了L-ICON3蛋白能够结合于鼠三阴性乳腺癌(TNBC)4T1细胞。图6B示出了L-ICON3相比于L-ICON1在体内鼠TNBC 4T1的原位小鼠模型中更有效。图6C示出了所有小鼠在L-ICON1和L-ICON3治疗之后存活下来,而所有对照小鼠在开始瘤内注射腺病毒载体之后的第11天死亡。图6B至图6C中每组有5只小鼠。

[0020] 图7示出了L-ICON3能有效地治疗CB-17SCID小鼠的原位患者源性异种移植物(PDX)小鼠模型中的患者的TNBC。在第0天通过以下方式生成原位TNBC PDX模型:将含BRCA-1突变的TNBC PDX从供体NSG小鼠(NOD SCID gamma)(杰克逊实验室(Jackson Laboratory),JAX TM00089,乳腺肿瘤标志物:TNBC ER-/PR-/HER2-、BRCA1 V757fs)移植到4周龄雌性CB-17SCID(Taconic Farms公司)的左侧第四乳腺脂肪垫中。当肿瘤达到130mm³的平均体积(第9天)时,将这些小鼠随机分为对照组和L-ICON3组(每组中n=5),并且分别用AdBlank(对照载体)和AdL-ICON3腺病毒载体的1×10¹⁰个病毒颗粒(VP)进行瘤内(i.t.)注射。在第13、17和20天进行额外i.t.注射。用卡尺以毫米(mm)为单位测量肿瘤宽度(W)和长度(L)并且使用公式(W)²×L/2(mm³)计算肿瘤体积(mm³),以此确定治疗功效。数据以平均值±SEM呈现,并且使用Prism软件(GraphPad公司)通过统计显著性的t检验进行分析。

[0021] 通过使用对L-ICON1和L-ICON3具有特异性的引物进行PCR,图8A和图8B示出了L-ICON3插入片段cDNA在制作血清型9腺相关病毒(AAV9)之前的质粒DNA(pAAV-CMV)中以及在完整AAV9病毒载体(AAV9-L-ICON3)中以正确大小存在。M:以千碱基(Kb)为单位的DNA梯状条带。eGFP:作为阴性对照载体的增强型绿色荧光蛋白。

[0022] 图9示出了经由AAV9-L-ICON3(n=5)的单次静脉内注射的L-ICON3疗法能有效地治疗原位小鼠模型中的患者的TNBC PDX,如图7所述。AAV9-eGFP是阴性对照载体(n=2)。

[0023] 图10A至图10B示出了由因子VII人源比色法活性检测确定的L-ICON1和ICON的促凝活性。FVII的活性形式(FVIIa)(American Diagnostica公司)作为阳性凝血对照;FVIIa-FRR:活性位点受抑制的FVIIa(American Diagnostica公司)作为凝血非活性对照。表1中也列出了它们的凝血活性。代表性数据以来自两个独立实验的平均值±SEM呈现。图10A至图10B示出了L-ICON1没有可检测的促凝活性,而ICON具有FVIIa(100%)的约5-6%促凝活性。图10表明用非凝血轻链修饰ICON从L-ICON1和L-ICON3完全去除了促凝活性。

[0024] 图11是血管生成依赖性人疾病以及巨噬细胞相关人疾病中组织因子的选择性表达的流程图示例。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 本文所用的冠词“一个”和“一种”是指冠词的语法对象中的一个或超过一个(即,至少一个)。以举例的方式,“元素”意指一个元素或超过一个元素。

[0027] 如本文所用,“约”在涉及可测量的值(诸如,量、时距等)时,旨在涵盖偏离指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$,更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,并且还更优选地 $\pm 0.1\%$ 的变化,因为此类变化对于执行所公开的方法是合适的。

[0028] “预防性”治疗是向不表现出疾病病征或仅表现出疾病的早期病征的受试者施用以用于降低发展病变的风险的目的的治疗。本发明的化合物可作为预防性治疗给予,以减少发展病变的可能性或如果发展则使病变的严重性最小化。

[0029] “治疗性”治疗是向表现出病变的病征或症状的受试者施用,以用于减少或消除那些病征或症状的目的的治疗。病征或症状可以是生物化学、细胞、组织学、功能性、主观或客观的。

[0030] 多肽的“片段”是指比全长多肽或蛋白质表达产物小的多肽的任何部分。在一个方面,片段是全长多肽的缺失类似物,其中一个或多个氨基酸残基已从全长多肽的氨基末端和/或羧基末端移除。因此,“片段”是下文所述的缺失类似物的子集。

[0031] 可互换使用的“类似物”或“衍生物”是指与天然存在的分子在结构上基本上类似且具有相同生物活性(尽管在某些情况下程度有所不同)的化合物,例如肽或多肽。基于涉及以下方面的一个或多个突变,类似物具有与衍生该类似物的天然存在的多肽相比不同的氨基酸序列组成:(i)多肽的一个或多个末端和/或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域处缺失一个或多个氨基酸残基、(ii)多肽的一个或多个末端(通常为“添加”类似物)和/或天然存在的多肽序列的一个或多个内部区域(通常为“插入”类似物)处插入或添加一个或多个氨基酸、或(iii)天然存在的多肽序列中的一个或多个氨基酸替换为其他氨基酸。

[0032] 当在生物体、组织、细胞或其组分的上下文中使用时,术语“异常”是指与显示“正常”(预期)相应特性的那些生物体、组织、细胞或其组分在至少一个可观察或可检测特征方面(例如,年龄、治疗、当日时间等)不同的那些生物体、组织、细胞或其组分。对于一个细胞或组织类型是正常或预期的特征对于不同的细胞或组织类型可能是异常的。

[0033] 如本文所用,“减轻”疾病意指降低疾病或病症的至少一种病征或症状的频率或严重性。

[0034] “核酸”是指多核苷酸并且包括多核糖核苷酸和多脱氧核糖核苷酸。根据本发明的核酸可包括嘧啶和嘌呤碱基(优选地分别为胞嘧啶、胸腺嘧啶和尿嘧啶以及腺嘌呤和鸟嘌呤)的任何聚合物或低聚物。(参见Albert L. Lehninger, Principles of Biochemistry (《生物化学原理》),第793-800页(沃斯出版公司(Worth Pub.),1982年),该文献全文并入本文以用于所有目的)。实际上,本发明设想了任何脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸或肽核酸组分以及它们的任何化学变体,诸如这些碱基的甲基化、羟甲基化或糖基化形式等。这些聚合物或低聚物在组成上可为异质或均质的,并且可从天然存在的来源分离或可通过人工的方式或合成的方式产生。另外,这些核酸可为DNA或RNA或它们的混合物,并且可以以单链或双链形式(包括同源双链体、异源双链体和杂合状态)永久或短暂存在。

[0035] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指由通过肽键共价

连接的氨基酸残基构成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两种氨基酸,并且不限于能够包含蛋白质序列或肽序列的最大氨基酸数。多肽包括任何肽或蛋白质,其包含通过肽键彼此接合的两个或更多个氨基酸。如本文所用,术语是指短链,其也通常在本领域中被称为例如肽、低聚肽和低聚物,并且指长链,其一般在本领域中被称为蛋白质,所述蛋白质具有许多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源多肽、低聚肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽的变体、经修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽、或它们的组合。

[0036] 如本文所用,“多核苷酸”包括cDNA、RNA、DNA/RNA杂合体、反义RNA、小发夹RNA(shRNA)、核酶、基因组DNA、合成形式和混合聚合物、正义和反义链两者,并且可经过化学或生物化学修饰而包含非天然或衍生、合成或半合成核苷酸碱基。另外,设想了野生型或合成基因的改变,包括但不限于一个或多个核苷酸的缺失、插入、置换或与其他多核苷酸序列的融合。

[0037] 如本文所用,术语“诊断”是指确定疾病或病症的存在。在本发明的一些实施方案中,提供了用于作出诊断的方法,所述方法允许确定特定疾病或病症的存在。

[0038] “疾病”是受试者的健康状态,其中受试者不能维持体内平衡,并且其中如果疾病没有改善则受试者的健康持续恶化。相比之下,受试者的“病症”是其中受试者能够维持体内平衡,但其中受试者的健康状态比其没有病症时可能的健康状态较不利的健康状态。如果不及时治疗,病症并不一定会导致受试者的健康状态进一步下降。

[0039] 如本文所用,术语“疗法”或“治疗方案”是指用于减轻或改变病症或疾病状态的那些活性物质,例如旨使用药理学、外科、饮食和/或其他技术减少或消除疾病或病症的至少一种病征或症状的治疗过程。治疗方案可包括一种或多种药物或手术的处方剂量。治疗将通常是有益的并且减少或消除病症或疾病状态的至少一种病征或症状,但在一些情况下,疗法的效果将具有不可取的作用或副作用。疗法的效果还将受到受试者的生理状态的影响,例如,年龄、性别、遗传、体重、其他疾病状况等。使用本文所公开的组合物进行的本文所公开的治疗能够用作独立的疗法或与手术、放疗、化疗、其他形式的免疫治疗(包括但不限于免疫检查点阻断、CAR-NK和T细胞、细胞因子、自然杀伤细胞、光动力学疗法等)联用。

[0040] 术语“治疗有效量”是指将引起正在被研究人员、兽医、医师或其他临床医生寻找的组织、系统或受试者的生物或医学响应的主题化合物的量。术语“治疗有效量”包括当施用,足以预防所治疗的病症或疾病的一种或多种病征或症状发展或在一定程度上减轻的化合物的量。治疗有效量将根据化合物、疾病及其严重性和待治疗的受试者的年龄、体重等而有所不同。

[0041] “治疗”疾病作为术语用于本文,意指降低受试者经历的疾病或病症的至少一种病征或症状的频率或严重性。

[0042] 除非特别指明,否则如本文所用,术语“细胞”还指单个细胞、细胞系、原代培养物或来源于此类细胞的培养物。“培养物”是指包含相同或不同类型的分离细胞的组合物。细胞系是一种特定类型的细胞的培养物,其能够无限期地复制,因此使得细胞系“永生”。细胞培养物能够为诸如琼脂的培养基上生长的细胞群。原代细胞培养物是来自细胞或直接取自活生物体的培养物,其不是永生的。

[0043] 术语“生物样品”是指组织(例如,组织活检)、器官、细胞(包括保持在培养物中的

细胞)、细胞裂解物(或裂解物级分)、来源于细胞或细胞物质的生物分子(例如,多肽或核酸)或来自受试者的体液。体液的非限制性示例包括血液、尿液、血浆、血清、泪液、淋巴液、胆汁、脑脊液、间质液、水性或玻璃体液、初乳、痰、羊水、唾液、肛门和阴道分泌物、汗液、精液、渗出液、流出物和滑液。

[0044] 范围:在整个本公开中,本发明的各个方面能够以范围格式呈现。应当理解,范围格式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应当理解为对本发明范围的不可改变的限定。因此,应当认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的单个数值。例如,应当认为范围诸如1至6的描述已经具体地公开了子范围,诸如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数值,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论范围宽度如何,这都适用。

[0045] 根据本文教导的方法,向受试者施用有效量的试剂。术语有效量和有效剂量可互换使用。术语有效量被定义为产生期望的生理应答所需的任何量。用于施用试剂的有效量和时间表可凭经验确定,并且进行此类测定在本领域技术的范围内。用于施用的剂量范围为足够大以产生影响(例如,减少或延迟)疾病或病症的一种或多种症状的期望效果的那些。剂量不应大到引起显著不良副作用,诸如不希望的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将随年龄、状况、性别、疾病类型、疾病或病症的程度、给药途径或该方案中是否包括其他药物而变化,并且能够由本领域技术人员确定。在任何禁忌症的情况下,个体医师能够调整剂量。剂量能够变化,并且能够在一天或几天内每天施用一次或多次剂量施用。对于给定类别的药物产品,能够在文献中找到关于适当剂量的指导。

[0046] 如本文所用,术语“治疗”(treatment、treat或treating)是指减少疾病或病症的作用或者疾病或病症的症状的方法。因此,在所公开的方法中,治疗能够是指已造成的疾病或病症的严重性或者该疾病或病症的症状减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。例如,与对照相比,如果受试者的疾病的一种或多种症状减少10%,则治疗病症的方法被认为是治疗。因此,与天然或对照水平相比,减少能够是10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或在10%和100%之间的任何百分比的减少。应当理解,治疗不一定是治愈或完全消除疾病、病症、或者该疾病或病症的症状。

[0047] 如本文所用,术语“预防(prevent、preventing和prevention)疾病或病症”是指在受试者开始表现出疾病或病症的一种或多种症状之前或几乎在受试者开始表现出疾病或病症的一种或多种症状的同一时间发生的动作,例如,施用治疗剂,该动作抑制或延迟疾病或病症的一种或多种症状的发作或恶化。如本文所用,提及降低、减少或抑制包括与对照水平相比,10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高的变化。此类术语能够包括但不一定包括完全消除。

[0048] 概述

[0049] 此前已报道了靶向表达TF的血管生成血管内皮细胞(VEC)和癌细胞的第一代试剂。第一代称为免疫缀合物试剂(Immuno-Conjugate agent,被命名为ICON),其由融合到IgG1的Fc区的含K341A突变的鼠或人因子VII(1-406aa,组织因子的天然配体)组成(图1A)(Hu等人,1999年,美国专利申请2005/0214298,该专利申请全文以引用方式并入本文)。经由第341位赖氨酸残基的靶向性突变(K341A)显著消除了ICON编码的酶原因子VII的促凝作用(Hu等人,2001年)。能够经由重组蛋白的静脉内注射或腺病毒载体的病灶内注射来施用

ICON。实验性黑色素瘤、前列腺和头颈部肿瘤的病灶内ICON免疫治疗引起了显著的肿瘤抑制,并且在一些情况下完全根除而不影响正常组织(Hu等人,《BMC免疫学》(BMC Immunology),2010年;Hu等人,《美国国家科学院院刊》(PNAS),2000年)。在结合于表达TF的癌细胞后,ICON能够介导自然杀伤细胞(NK)细胞依赖性抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)和补体依赖性细胞毒作用(CDC)作为其作用机制。为了实现靶向TF的PDT,Hu等人将单体fVII肽与光敏剂(PS)维替泊芬(VP)和Sn(IV)二氢卟吩e6(SnCe6)缀合在一起(分别称为fVII-VP和fVII-SnCe6)并证实靶向fVII的PDT在体外和体内人乳腺的小鼠模型中可选择性且有效地杀伤血管生成血管内皮细胞和癌细胞(Duanmu等人,2011年;Hu等人,《BMC癌症》(BMC Cancer),2010年;Hu等人,2011年)和肺癌(Cheng等人,2011年)。

[0050] ICON具有相对较大的分子量(210kDa),这能够限制其渗透到肿瘤组织中的能力。为了使ICON的分子量(MW)更小且对于免疫治疗更安全(去除其凝血活性),设计了第二代ICON(本文中称为L-ICON1(基因库登记号KX760097)),其仅由融合到IgG1Fc的fVII轻链(1-152aa)组成(图1a)。L-ICON1的分子量为约100kDa(为了更好地渗透到肿瘤微环境中),该分子量仅是IgG1抗体的分子量的三分之二并且相比于ICON减小超过50%(图1b);L-ICON1没有任何凝血活性(在体内更安全)(图7和表1),而在凝血活性位点含有突变(K341A)的第一代ICON仍然保留FVIIa的5%凝血活性(图7和表1)。L-ICON1相比于ICON更有效地治疗原位小鼠模型中的三阴性乳腺癌。

[0051] 本文公开了第三代靶向TF的ICON蛋白(ICON)(本文中称为L-ICON3和ICON3),其中因子VII(fVII)轻链或含K341A的全长fVII通过重组DNA技术融合到IgG3 Fc(图1a)。图1中显示,第三代L-ICON3和第二代L-ICON1对表达组织因子(TF)的细胞(诸如癌细胞)具有类似的结合活性,但L-ICON3相比于第二代L-ICON1能够在体外引发对癌细胞的更强ADCC细胞毒作用。

[0052] 本文公开了SEQ ID NO:2的氨基酸序列,其表示L-ICON3。还公开了SEQ ID NO:1,其是编码L-ICON3的核酸。

[0053] 本文公开了SEQ ID NO:3的氨基酸序列,其表示ICON3。还公开了SEQ ID NO:4,其是编码ICON3的核酸。

[0054] 人IgG3在所有IgG亚类中表现出最强的效应子功能,但具有短半衰期,原因不明。IgG3结合于IgG-补救受体(FcRn),但在存在IgG1的情况下FcRn介导的IgG3转运和挽救会由于IgG1和IgG3之间的细胞内竞争而受到抑制。已证实之所以发生这种现象是因为第435位的单个氨基酸差异,在该位置,IgG3具有精氨酸而不是所有其他IgG亚类中发现的组氨酸。因此,为了在体内增加血液循环中的L-ICON3蛋白的半衰期,能够通过定点诱变程序向L-ICON3的IgG3 Fc结构域引入R435H突变。(Kim等人,1999年;Stapleton等人,2011年)。

[0055] 重要的是要注意,L-ICON3的因子VII轻链与组织因子的结合不会引起弥散性血管内凝血。因此L-ICON3不会引发血液凝结(与L-ICON1中的fVII轻链类似;参见图7和表1)。

[0056] 能够向对其有需要的受试者施用所有第三(L-ICON3和ICON3)和第四(L-ICON4和ICON4)ICON。施用可为局部或全身的,具体取决于该疗法涉及到的病理状况的类型。施用能够经由本领域已知的任何方法进行,诸如例如静脉内、肌内、瘤内、皮下、滑膜内、眼内、斑块内或皮内注射纯化的重组免疫缀合物蛋白或复制缺陷型腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)或其他携带编码免疫缀合物分泌形式的cDNA的病毒载体。

[0057] 靶向TF的ICON能够用作独立的疗法并可与手术、放疗、化疗、其他治疗性抗体、抗体-药物缀合物、免疫检查点阻断、嵌合抗原受体 (CAR)-T和NK细胞、树突细胞、疫苗、溶瘤病毒、细胞因子和/或去除免疫抑制细胞如髓源性抑制细胞 (MDSC)、调节性T细胞 (Treg)、肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 等联用。组合免疫治疗能够靶向一些或所有主要肿瘤腔隙 (包括但不限于癌细胞、肿瘤新生血管、癌干细胞、MDSC、Treg和TAM) 上的不同分子,或在理想情况下靶向由这些主要肿瘤腔隙共同表达的相同分子。

[0058] 其他施用途径能够为流体的肠胃外施用等。能够通过以下方式治疗受试者:静脉内或瘤内注射或在其他位点注射一种或多种免疫缀合物蛋白,或者静脉内或瘤内注射或在其他位点注射携带编码一种或多种免疫缀合物蛋白的分泌形式的cDNA的一个或多个表达载体。在一些实施方案中,能够通过以下方式治疗受试者:静脉内或瘤内注射有效量的一个或多个复制缺陷型腺病毒载体、或携带编码一类或多类免疫缀合物蛋白的分泌形式的cDNA的一个或多个腺相关载体。许多典型实施方案涉及瘤内和/或肌肉内注射有效量的编码免疫缀合物分泌形式的载体。

[0059] 实现治疗性治疗所必需的L-ICON3的量本身不是固定的,并且必定取决于与药物载体联合施用的组合物中的成分的浓度、所施用的组合物中增强免疫系统反应的辅助性化合物(下文将更全面地说明)以及待治疗的患者的年龄、体重和临床状况。优选的组合物以有效量递送一种或多种免疫缀合物而不会对患者产生不可接受的毒性。

[0060] 本发明的药物组合物或制剂还可包含其他载体、辅助剂、稳定剂、防腐剂、分散剂以及与所述制剂类型有关的其他本领域常规试剂。

[0061] 当应用于癌时,本发明采用免疫缀合物,这些免疫缀合物具有特异性地靶向人肿瘤细胞、CSC或肿瘤血管内皮细胞或所有三种肿瘤腔隙的靶向结构域,以及激活针对靶细胞的细胞溶解性免疫反应或细胞毒作用的效应子结构域。

[0062] 在癌治疗中,抗肿瘤免疫缀合物用于治疗并预防多种癌(实体癌、白血病和淋巴瘤),特别是原发性或转移性实体瘤,包括黑色素瘤、肾、前列腺、乳腺、卵巢、脑、神经母细胞瘤、头颈部、胰腺、膀胱和肺癌。免疫缀合物可用于靶向肿瘤血管,特别是血管内皮细胞、CSC和/或肿瘤细胞。肿瘤血管为免疫治疗提供如下若干优点。(i) 一些血管靶标(包括组织因子)对于所有肿瘤应是相同的。(ii) 靶向血管的免疫缀合物不必浸润肿瘤团块就能到达其靶标。(iii) 靶向肿瘤血管应产生放大的治疗反应,因为每根血管滋养许多肿瘤细胞,这些肿瘤细胞的活力取决于血管的功能完整性。(iv) 血管不可能对免疫缀合物形成抗性,因为这将需要对血管内壁的整个内皮层进行修饰。与此前所述抑制新血管生长的抗血管生成方法不同,L-ICON3能够引发对新生血管的细胞溶解反应。应当注意,本文所公开的组合物能够特异性地治疗转移癌,或能够预防癌转移。

[0063] L-ICON3还能够有效地治疗患有类风湿性关节炎、渗出性(“湿性”)黄斑变性、子宫内膜异位、病毒感染、动脉粥样硬化、血栓形成以及与新生血管相关的其他疾病的患者。

[0064] 在一个实施方案中,光敏剂或药物能够偶联到L-ICON3以用于靶向TF的光动力学疗法(PDT)或抗体-药物缀合物(ADC)疗法。能够缀合到靶向分子的光敏剂包括光动力学染料。该染料在暴露于适当类型的放射(例如,一定波长(通常在约630nm和约750nm之间)的光)之后应能够引起靶组织损伤。能够使用多种可用光动力学染料中的任何一种,诸如美国专利号6,693,093和6,443,976所述的那些,这些光动力学染料包括血卟啉,包括其衍生物,

诸如二血卟啉醚以及血卟啉的二聚体和三聚体(其示例描述于美国专利号4,968,715和5,190,966中)及对其所作的改善,后者的示例描述于美国专利号5,028,621、4,866,168、4,649,151和5,438,071中;作为光动力学化合物来源的氨基酮戊酸(血卟啉的前体),如美国专利号5,079,262中描述和举例说明;卟啉,包括硼化卟啉、苯并卟啉及其衍生物,如由美国专利号4,883,790、4,920,143、5,095,030和5,171,749所述的绿卟啉进一步举例说明;卮花青;卟啉烯;卟吩姆钠;维替泊芬(Vysudine™,视康公司(CIBA Vision));Photofrin II™;PH-10™;二氢卟吩,如由内消旋-四(羟基苯基)-二氢卟吩和细菌二氢卟吩举例说明,后者在美国专利号5,171,741、5,173,504中举例说明;酞菁锌,如美国专利号5,166,197所述;红紫素,诸如锡乙基初红紫素(SnET2™,Miravant公司);脱镁叶绿酸盐,其示例描述于美国专利号5,198,460、5,002,962和5,093,349中;和上述每一者的单克隆抗体-染料缀合物,以及任选地上述任何一者或全部的混合物。

[0065] 虽然上文具体参照化合物进行了描述,但也能够利用活性化合物的对映异构体、立体异构体、代谢物、衍生物和盐。用于合成这些化合物的方法是本领域技术人员已知的。药学上可接受的盐的示例包括但不限于碱性残基(诸如胺)的无机或有机酸盐以及酸性残基(诸如羧酸)的碱式盐或有机盐。药学上可接受的盐包括例如由非毒性无机或有机酸形成的母体化合物的常规非毒性盐或季铵盐。常规非毒性盐包括衍生自无机酸诸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸和硝酸的那些;以及由有机酸诸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、双羟萘酸、马来酸、羟基马来酸、苯乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲磺酸、乙烷二磺酸、草酸和羟乙磺酸制备的盐。药学上可接受的盐能够通过常规化学方法由包含碱性或酸性部分的母体化合物来合成。一般来讲,此类盐能够通过使这些化合物的游离酸或碱形式与化学计量的适当碱或酸在水或有机溶剂中或这两者的混合物中反应来制备;一般来讲,非水介质如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈是优选的。合适盐的列表可见于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)第17版(麦克出版公司(Mack Publishing Company),宾夕法尼亚州伊斯顿,1985年,第1418页)。

[0066] 前药是在体内释放活性母体药物的共价键合的物质。前药通过以一定方式修饰化合物中存在的官能团来制备,使得修饰产物在常规操作中或在体内裂解而产生母体化合物。前药包括其中羟基或氨基基团键合到任何基团的化合物,当向哺乳动物受试者施用前药时,该羟基或氨基基团分别裂解形成游离羟基或游离氨基。前药的示例包括但不限于醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。

[0067] 还设想了可对如SEQ ID NO:2表示的L-ICON3进行额外修饰。例如,能够制备表现出与未经修饰的型式相当的至少一种功能活性的经修饰的L-ICON3,但是经修饰的蛋白或多肽具有优于未经修饰的型式的额外优点,诸如生产起来更便宜,引起更少副作用和/或具有更好或更长的功效或生物利用率。

[0068] 经修饰的L-ICON3能够具有氨基酸的缺失和/或置换;因此,具有缺失的蛋白、具有置换的蛋白以及具有缺失和置换的蛋白是经修饰的蛋白。在一些实施方案中,这些经修饰的蛋白还可包含插入或添加的氨基酸,例如诸如采用融合蛋白或具有接头的蛋白。

[0069] 置换或替换变体通常包含多肽内的一个或多个位点处一个氨基酸交换为另一个氨基酸,并且可被设计为调节多肽的一种或多种特性,特别是其效应子功能和/或生物利用

率。上文详述了这些实施方案的嵌合多肽中的某些特定氨基酸交换。另外的置换可能是或可能不是保守的,即,一个氨基酸被替换为类似形状和电荷的氨基酸。保守置换是本领域熟知的,并且包括例如以下变化:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸变为谷氨酸;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸变为天冬氨酸;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸。

[0070] 除了缺失或置换之外,经修饰的多肽还可具有残基插入,这通常涉及在多肽中添加至少一个残基。这可包括插入靶向多肽或简单地插入单个残基。下文将讨论末端添加(称为融合蛋白)。

[0071] 还应当理解,氨基酸和核酸序列可包含额外残基,诸如额外N端或C端氨基酸或者5'或3'序列,但仍基本上如本文所公开的序列之一中示出的那样,只要该序列满足上文所示出的标准即可,包括在涉及蛋白表达的地方保留生物蛋白活性。添加末端序列特别适用于这样的核酸序列,其可例如包括在编码区的5'或3'部分任一者的旁侧的各种非编码序列,或可包括已知会在基因内出现的各种内部序列,即,内含子。

[0072] 实施例

[0073] 实施例1:L-ICON3和ICON3

[0074] 如图1a所示,第三代(第3GEN) ICON(即L-ICON3和ICON3)由融合到人IgG3 Fc结构域的fVII轻链(1-152aa)或全长(含K341A突变的406aa)构成。L-ICON3(SEQ ID NO:1)和ICON3(SEQ ID NO:3)的mRNA序列已被保藏到基因库(分别为登记号KY223609和KY223610)。

[0075] L-ICON3和ICON3的分子量(MW)

[0076] L-ICON3肽的单体包含419个氨基酸残基(SEQ ID NO:2)。单体L-ICON3蛋白重量为47千道尔顿。二聚L-ICON3的估计的分子量为94kDa。SDS-PAGE中L-ICON3的实际分子量为约100kDa(图1b)。使用检测用抗人IgG抗体进行蛋白印迹,进一步验证L-ICON3中的Fc部分(图1c)。

[0077] ICON3肽的单体包含从“MVSQALRLLC”开始的673个残基(SEQ ID NO:4)。估计的单体ICON3蛋白重量为75kDa。

[0078] 亲和纯化L-ICON3和ICON3的方法

[0079] 为了建立亲和纯化L-ICON3和ICON3的方法,执行了免疫沉淀蛋白印迹(IP-WB)。图2中的结果表明,L-ICON3蛋白仅可由蛋白G亲和柱纯化,而L-ICON1可由蛋白A和蛋白G亲和柱纯化。类似地,ICON3能够由蛋白G亲和柱纯化。

[0080] L-ICON3蛋白对人和鼠癌细胞的结合活性

[0081] 在使用TF高表达的人三阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-231进行的癌细胞ELISA中,将L-ICON3的结合活性与L-ICON1的结合活性进行比较。图3a中的结果表明,L-ICON3和L-ICON1可等效地结合于MDA-MB-231细胞(ns,不显著)。癌细胞ELISA结果进一步表明,L-ICON3可结合人TNBC(图3a和图3b中的MDA-MB-231)、黑色素瘤(图3c中的SK-Mel-28)和卵巢癌(图3d中的OVCAR5)以及两种极强侵袭性的鼠癌细胞系,包括鼠TNBC(图3e中的4T1)和黑色素瘤(图3f中的B16F10)。

[0082] 杀伤癌细胞的L-ICON3依赖性ADCC和CDC作用

[0083] 图4a中的结果表明,L-ICON3蛋白可引发ADCC来杀伤靶癌细胞(人卵巢癌OVCAR5细胞)。实际上,L-ICON3依赖性ADCC相比于第2GEN ICON(L-ICON1)确实具有更强的作用(图4a)。图4b中的结果表明,L-ICON3能够引发补体依赖性细胞毒作用来杀伤靶癌细胞(MDA-MB-231细胞)并且该作用类似于L-ICON1(ns:不显著)。

[0084] 实施例2:具有治疗血管生成依赖性人疾病以及巨噬细胞相关人疾病的潜能的、抗组织因子的治疗性抗体样免疫缀合物

[0085] 组织因子(TF)是47-kDa膜结合细胞表面受体(1-3)。它也称为凝血活酶、凝血因子III或CD142。在生理状况下,循环外周血淋巴细胞(PBL)和静息态血管内皮细胞不会表达TF。TF表达仅限于不与血液直接接触的细胞,诸如定位在内皮下血管壁中的周细胞、成纤维细胞和平滑肌细胞,并且与循环凝血因子VII(fVII)隔离。在这些细胞中,大部分TF定位在细胞内池中(4)。在血管壁完整性被破坏后,周细胞和平滑肌细胞中的TF被释放并且能够与从血液循环中泄漏的fVII结合,从而引发凝血以便止血(5,6)。除了其作为主要凝血引发剂的作用之外,TF还是病理性血管生成的调节剂(7-9)。

[0086] 血管生成(即,从既有血管形成新毛细血管)涉及到这两种生理状况(诸如再生和组织修复)以及超过20种人疾病(10),包括但不限于癌(10,11)、年龄相关性黄斑变性(AMD)、子宫内膜异位和类风湿性关节炎(RA)(12-14)。在癌中,血管生成由Hanahan和Weinberg(15,16)确定为“癌的标志”之一,这是由于已公认的是该过程在良性增生性结节向恶性病灶转变期间至关重要(11)。鉴定对血管生成血管内皮细胞(即,病理性新生血管的内层)具有特异性的靶分子对于发现和开发这些血管生成依赖性常见人疾病的新生血管靶向疗法十分关键。

[0087] 癌、年龄相关性黄斑变性和子宫内膜异位的病理性新生血管中的组织因子

[0088] 血管内皮生长因子(VEGF)在血管生成依赖性癌和非恶性人疾病(17)诸如黄斑变性(18)、类风湿性关节炎(19)和子宫内膜异位(20)中起着中心作用。具体地讲,VEGF通过结合于这些血管生成依赖性疾病的病理性新生血管(通常为微血管或毛细血管)中VEC上的VEGR受体来刺激血管生成。此前已知VEGF能够诱导人脐静脉内皮细胞(HUVEC)(血管生成研究中的一种常用VEC模型)上的TF表达。应当注意,虽然VEGF受体以相对较高水平表达于肿瘤VEC上,但它们也由正常VEC表达(21),这表明VEGF受体对新生血管内皮细胞没有特异性。为了更好地模拟病理性血管生成,理想的血管生成VEC模型应得自微血管或毛细血管。通过使用血管内皮生长因子诱导的体外血管生成血管内皮模型,报道了与VEGFR不同,TF是血管生成特异性受体并且是使用fVII-IgG1Fc免疫缀合物(被命名为下文所讨论的ICON)的靶向因子VII(fVII)的免疫治疗以及使用fVII缀合的光敏剂的光动力学疗法的靶标(22)。另外,TF也是体内唯一病理性血管生成内皮细胞表面受体,这是因为其在体内选择性表达于从动物模型到患者的肿瘤血管(7,23-27)、眼部(12)和异位子宫内膜(14)新生血管中的血管生成VEC。

[0089] 癌的病理性新生血管中的组织因子

[0090] Contrino等人于1996年首次在7名乳腺癌患者的原发性肿瘤组织中报道了肿瘤血管内皮细胞上的TF表达(23)。重要的是,他们还报道了未在相邻乳腺组织的正常血管内皮细胞中检测到TF表达。Hu和Garen独立地报道了TF在体外和体内选择性地表达于人黑色素

瘤异种移植物的肿瘤新生血管中(24,28)。文献进一步显示,TF在人肺(26)和化疗耐药性乳腺(27)肿瘤异种移植物中的肿瘤血管内皮细胞上特异性地表达,但不在小鼠脑、肺和脾中的静息血管内皮细胞上表达(26)。

[0091] 年龄相关性黄斑变性的新生血管中的组织因子

[0092] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是导致发达国家和发展中国家中的老年人群(年龄为55及以上)失明的主要原因。中心视力严重丧失常常随渗出性(湿性)AMD发生,这是由于形成了会损伤视网膜黄斑区的病理性脉络膜新生血管(CNV)。在其在路易维尔大学(University of Louisville)任职期间与卡普兰实验室(Kaplan laboratory)合作下,Bora,Hu等人于2003年报道了猪模型中CNV膜的内皮细胞选择性地表达TF(12),而正常视网膜血管内皮不表达TF。正常脉络膜内皮也不表达TF(12)。在另一项研究中,Grossniklaus等人在取自年龄在27至84岁范围内的七名女性和三名男性的10份手术切除的中心凹下CNV标本中以及在取自年龄在74至99岁范围内的四名女性和六名男性的10只带中心凹下CNV的眼库眼中对VEGF和TF表达进行了免疫染色。他们发现,VEGF在巨噬细胞中程度不一地表达并且在视网膜色素上皮(RPE)中强表达,视网膜色素上皮是死后眼睛和手术标本两者中的CNV的主要组分。VEGF也在成纤维细胞和光感受器中表达。TF在巨噬细胞中强表达,并且在RPE中程度不一地表达。与炎症非活性的手术切除CNV相比,炎症活性的手术切除CNV中的VEGF和TF的染色更强(29)。

[0093] 子宫内膜异位的新生血管中的组织因子

[0094] 子宫内膜异位是以子宫内膜组织(即,子宫内层)存在于子宫外部为特征的妇科疾病。子宫内膜病灶主要位于盆腔腹膜和卵巢上,但也能够位于心包、胸膜、肺、甚至脑中。该疾病影响多达10%的所有育龄期妇女并且在不孕妇女中盛行率升高到20-50%。洛克伍德博士实验室(Dr.Lockwood laboratory)已广泛检查了子宫内膜异位中的TF表达(30-33)。在正常子宫内膜中,TF表达仅限于分泌期的基质细胞,腺上皮中的表达低得多。然而,在子宫内膜异位中,TF在腺上皮和基质细胞两者中大幅过表达。有趣的是,在异位子宫内膜组织中的巨噬细胞上观察到最强的TF免疫染色。2010年,在与洛克伍德团队合作下,Krikun,Hu等人报道了异位子宫内膜病灶中的内皮细胞高度表达TF(14),而在患者的在位增生期子宫内膜中的腺细胞、基质细胞、内皮细胞和血管壁上未检测到TF(14)。

[0095] 癌中的组织因子表达

[0096] 实体癌、白血病和肉瘤的癌细胞上的组织因子表达

[0097] 除了其在肿瘤新生血管上的表达之外,TF还在许多类型实体癌(34-36)和白血病(AML和ALL)(36)的癌细胞上高表达。例如,在80%-100%乳腺癌患者、40%-80%肺癌患者和84%卵巢癌患者的癌细胞上检测到TF表达(36)。与乳腺、肺和卵巢癌类似,TF也以高百分比表达于许多其他人实体癌中(36,37),例如原发性黑色素瘤中表达率为95%且转移性黑色素瘤中表达率为100%,胰腺癌中表达率为53%-90%,结肠直肠癌中表达率为57%-100%,肝细胞癌中表达率为63%-100%,原发性和转移性前列腺癌中表达率为60%-78%,并且神经胶质瘤中表达率为47%-75%。

[0098] 白血病是起源于骨髓并浸润外周血且通常还浸润脾、肝和淋巴结的造血组织的恶性肿瘤。急性白血病(包括AML和ALL)以未成熟细胞或原始细胞的增殖为特征。如果未经治疗,大多数情况下通常会在6个月内发生死亡。ALL是最常见的儿童恶性肿瘤和第二最常见

的成人白血病,并且AML是第二最常见的儿童恶性肿瘤。据报道,TF表达于人白血病HL-60 (38-42)、Molt-4 (43)、THP-1 (43) 细胞系上,并且表达于AML (38, 44-48) 和ALL (39, 49) 患者的白血病细胞上。除非受到内毒素或其他细胞因子刺激,TF不表达于正常外周单核细胞上 (41),也不表达于髓样前体细胞上 (45)。在白血病患者的血浆中 (39, 49) 以及在HL-60培养基中 (39) 也检测到TF。

[0099] 在肉瘤中,在小鼠Meth-A肉瘤细胞 (50)、大鼠骨肉瘤细胞 (51) 和血管源性卡波西肉瘤 (52) 上也检测到TF表达。仍然在研究TF是否表达于人肉瘤中。

[0100] 癌干细胞上的组织因子表达

[0101] 除了癌细胞和肿瘤新生血管之外,癌干细胞 (CSC) 也是肿瘤微环境中的重要肿瘤腔隙。CSC促成了肿瘤血管生成、对多种疗法的抗性 (53, 54) 以及转移 (53, 55, 56)。靶向CSC疗法能够从根源上治疗癌,并且可克服药物抗性、复发和转移。已证实,TF也表达于CD133+和CD24-CD44+癌起始干细胞上,并且TF能够用作从人癌细胞系 (诸如乳腺、肺、卵巢、头颈部癌)、肿瘤异种移植和乳腺癌患者分离的CSC的新型肿瘤靶标。此外,靶向TF的免疫治疗剂ICON能够根除CSC而不出现药物抗性 (37)。

[0102] 综合起来,似乎TF是癌细胞、肿瘤新生血管和癌干细胞的共同而又有选择性的癌治疗靶标,并且TF靶向疗法代表能够选择性且有效地靶向并消除这三种主要肿瘤腔隙的新型治疗方法。这些发现可解释ICON效果显著而不出现复发和药物抗性的观察结果,即完全根除人和鼠前列腺、黑色素瘤和头颈部癌小鼠模型中明确的原发性肿瘤 (多达600mm³) 和转移 (25, 28, 57)。

[0103] 类风湿性关节炎中的组织因子

[0104] 类风湿性关节炎 (RA) 是一种病因不明的慢性、通常进行性的全身性炎性病症。其特征向滑膜组织中的单核细胞浸润 (T细胞、B细胞、浆细胞和巨噬细胞) 以及外周关节的对称性、侵蚀性关节炎,但其也可引起全身表现。肿瘤坏死因子 α (TNF α) 在RA发病机制中起着重要作用 (58)。

[0105] 患关节炎的关节中的TF表达

[0106] Busso等人 (59) 对取自10名RA患者的滑膜组织标本进行了免疫组织化学染色,并且报道了在成纤维细胞、平滑肌细胞和巨噬细胞中检测到TF表达,但未在内皮细胞中检测到TF表达。Chen等人 (60) 观察到了Ki-67阳性滑膜细胞、B细胞和内皮细胞上的TF表达。与RA中的内皮细胞上的TF表达有关的有争议的结果可能是由于评估TF表达的时间点的原因。已证实,内皮细胞 (HMVEC和HUVEC) 上的TNF α 对TF的诱导是短暂的,峰值出现在与TNF α 一起温育后的4-6小时。因此,似乎在促炎细胞因子和生长因子受到刺激后,内皮细胞在RA早期 (急性期) 表达TF,并且然后内皮TF表达可在RA后期 (慢性期) 降低或甚至消失。因此,RA中的巨噬细胞、B细胞、Ki-67阳性滑膜细胞和血管生成VEC表达了TF。

[0107] RA中的血管生成和血管生成内皮TF。RA还与血管生成相关,血管生成实现了白细胞跨内皮迁移到发炎滑膜组织中 (10, 61-70)。RA滑膜中有许多血管生成介质 (诸如TNF α 和VEGF) 和内源性抑制剂,它们在关节炎中失衡而造成增加的毛细血管形成。具体地讲,血管内皮细胞 (VEC) 参与滑膜炎相关的多种机制 (71)。血管生成VEC在RA发生和进展期间负责增加血管通透性、白细胞血管渗出 (炎症的关键特征) 并分泌许多炎症介质。并且已测试了抗血管生成对治疗RA的效果 (61)。许多促炎细胞因子和生长因子 (诸如TNF α 、IL-1和VEGF)

是在VEC上诱导TF的已知刺激物(72)。因此血管生成VEC能够用作RA的TF靶向疗法的靶标。

[0108] RA中表达TF的巨噬细胞。研究已充分证实,巨噬细胞在RA发生和进展中起着若干作用。第一,巨噬细胞能够用作抗原递呈细胞之一以异常地递呈自身抗原,从而引起自身反应性T细胞的活化。第二,巨噬细胞产生并分泌促炎细胞因子、趋化因子、生长因子和酶,诸如TNF α 、IL-1、IL-6、IL-18、IL-15和IL-32,以进一步活化其他细胞,从而促成疾病进展。第三,巨噬细胞刺激滑膜细胞释放诸如胶原酶和蛋白酶的酶,这可引起软骨和骨损伤。靶向巨噬细胞代表治疗RA的新型治疗方法。研究已证实,类风湿性关节炎滑膜中的巨噬细胞表达了TF(59,60)。重要的是,未受刺激的单核细胞不能正常表达TF(73,74),但包括细菌LPS(75)、TNF α (76)和IL-1(77)在内的炎症介质能够在单核细胞上诱导TF。

[0109] RA中表达TF的成纤维细胞。研究证实,TF表达于人成纤维细胞系(78,79)和人胚胎成纤维细胞(80)上。滑膜成纤维细胞经由分泌多种多样的细胞因子、趋化因子、生长因子和酶(诸如MMP)来参与RA发病机制。研究已表明,抑制滑膜成纤维细胞的生长能够降低炎症性关节炎的严重性(81)。因此,经由结合于TF来靶向成纤维细胞能够促使治疗RA的新型治疗剂的开发。

[0110] RA中表达TF的B细胞。B细胞是RA中患关节炎的关节中的另一种浸润免疫细胞。B细胞在RA发病机制中起着重要作用,不仅用作产生自身抗体的浆细胞的前体,而且参与抗原呈递、T细胞活化和细胞因子产生(82)。因此,B细胞导向疗法在治疗RA方面可提供治疗效果(83-85)。最近的一项研究表明,人RA中的B细胞表达TF(60),而正常B细胞不表达TF(86)。RA相关B细胞表达TF的原因尚不得而知。其可能是由于炎症细胞因子和趋化因子中的一者或混合物起到诱导作用。作为证据,正常人B细胞的亚群(CD19+CD79b+CD38+CD40+CD5-) (代表所有B细胞的30%) 在吡啶波醇肉豆蔻酸酯乙酸酯(PMA)诱导之后表达了TF(86,87)。有趣的是,即使在经由LPS或PMA刺激之后,T细胞和NK细胞也不会表达TF(86)。已观察到,NK细胞是在体外和体内癌动物模型中介导靶向TF的ICD免疫治疗的ADCC作用的主要效应细胞(57)。NK细胞上的阴性TF表达的发现非常重要,这不仅能更好理解临床试验中靶向TF的免疫缀合物的功效,而且确保了靶向TF的免疫缀合物的安全性。

[0111] RA、子宫内膜异位和肿瘤微环境中的细胞因子和生长因子有助于TF和血管生成的诱导(《抗体》(Hu,Antibodies)),2018年,排印中)。类风湿性关节炎滑膜中(88)和/或RA患者的血浆中(89-91)存在许多细胞因子和趋化因子,包括促炎细胞因子(例如,IL-1、IL-6、TNF1996</Year><RecNum>88</RecNum><IFN γ 、GM-CSF等)、抗炎性细胞因子(IL-10、IL-1R α 、TGF β 、IL-11、IL-13等)、趋化因子(例如,IL-8、MIP-1L-8、MIP-1P-1P-110等)和生长因子(例如,VEGF、PDGF、FGF)。这些刺激物中的一些能够有助于血管生成和增加VEC的血管通透性(例如,VEGF)(19)和/或在VEC上(例如,TNF</A(92)或在单核细胞上诱导TF(LPS)(75)、TNF α (76)和IL-1(77)。其中的一些(例如,VEGF,一种强效生长因子)在血管生成依赖性癌和非恶性疾病(17)诸如AMD(18)、RA(19)和子宫内膜异位(20)中起着中心和共同作用。

[0112] 巨噬细胞相关人疾病中的组织因子

[0113] 动脉粥样硬化中的组织因子

[0114] 动脉粥样硬化是以中等至大型动脉(诸如冠状动脉)中脂质积累为特征的进行性疾病。在动脉粥样硬化期间,血管壁中形成动脉粥样硬化斑块会导致动脉管腔狭窄。动脉粥样硬化和继发性动脉粥样硬化血栓形成是导致世界上的主要死因。动脉粥样硬化斑块是高

度促凝的,这主要是由于斑块中的巨噬细胞和血管平滑肌细胞上以及微泡(也称为微粒或胞外囊泡)和坏死核心内的泡沫细胞来源碎片上表达了高水平的TF。有趣的是,斑块内90%以上微泡是CD14阳性的(93),这表明它们起源于单核细胞/巨噬细胞。包括Mackman团队在内的若干团队已简练地综述了动脉粥样硬化血栓形成(atherombosis)和动脉粥样硬化中的TF(94-99)。已在小鼠、兔、猪和非人灵长类中建立了动脉粥样硬化的动物模型,其中小鼠和兔是最常用的模型。重要的是,与人中的动脉粥样硬化类似,兔模型和Apoe^{-/-}小鼠模型的动脉粥样硬化病灶中也存在高水平的TF(参见Tatsumi和Mackman的综述)(95)。这些动物模型中的TF表达的发现非常重要。这是因为其不仅为基础科学研究提供了模拟人动脉粥样硬化的进展的动物模型,而且为测试人动脉粥样硬化治疗用TF靶向治疗剂提供了动物模型。另外,患有高脂血症和II型家族性高胆固醇血症的患者具有升高水平的表达TF的单核细胞和TF阳性微泡。重要的是,未受刺激的单核细胞不能正常表达TF(73,74),但包括细菌脂多糖(LPS,也称为内毒素)(75)、TNF α (76)和IL-1(77)在内的炎症介质能够在单核细胞上诱导TF。

[0115] HIV感染的巨噬细胞上的组织因子表达

[0116] 在发现人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)之后不久,发现了HIV-1在体内具有外周血中的两种主要靶细胞,即,T淋巴细胞(其已经过广泛研究)以及巨噬细胞(100,101)(其已被忽略,但基于下述观察结果,这值得广泛研究)。虽然病毒复制周期在T细胞中通常是迅速且致细胞病变的,但被感染的巨噬细胞在体外和体内存活数月并且积累包含感染性病毒颗粒的大空泡。因此,HIV感染的巨噬细胞中活跃地表达HIV基因并且组装病毒颗粒(100)。因此,巨噬细胞在HIV感染的发病机制中起着关键作用以用于宿主内的早期病毒传播和弥散以及更重要地作为病毒持续存在的贮主。另外,慢性HIV感染中的巨噬细胞选择性地表达细胞膜受体组织因子(TF)(102)。然而,未受刺激的单核细胞(73)以及血管壁中的其他静息态血细胞和血管内皮细胞(24,25,103-105)不能正常表达TF。巨噬细胞上升高的TF会促成体内凝血增加的风险,即,动脉和静脉血栓形成,这是高效抗逆转录病毒疗法(HAART)后HIV患者的常见不良反应(102)。另外,巨噬细胞TF的水平与血浆中的HIV水平相关(102)。细菌脂多糖(LPS)可在单核细胞上诱导TF表达(102),该细菌脂多糖是可能来源于胃肠道的细菌产物并且在HIV慢性感染个体中具有高循环水平(106)。因此,HIV感染的巨噬细胞被认为是传播病毒的贮主,并且由于因组织因子表达而促成血管内血栓形成增加的风险。

[0117] 博拉感染的巨噬细胞中的组织因子表达

[0118] 埃博拉病毒能够由于严重出血热而引起急性死亡率,在人疫情中死亡率为约80%,并且在猴模型中死亡率几乎为100%。埃博拉出血热的凝血异常的潜在机制是埃博拉病毒能够在病毒复制期间诱导灵长类单核细胞和巨噬细胞中的TF表达(107)。在埃博拉出血热的恒河猴模型中,重组线虫抗凝蛋白c2(rNAPc2)对fVIIa/TF的阻断降低了TF活性的水平,并且显著增加了经治疗的非人灵长类的存活(108)。

[0119] T和自然杀伤(NK)细胞不表达组织因子

[0120] 有趣的是,即使在经由LPS或PMA刺激之后,T细胞和NK细胞也不会表达TF(86)。我们此前已观察到,NK细胞是在体外和体内癌动物模型中介导靶向TF的ICD免疫治疗的抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)的主要效应细胞(57)。NK细胞上的阴性TF表达的发现非常重要,这不仅能更好理解临床试验中靶向TF的免疫缀合物的功效,而且确保了靶向TF

的免疫缀合物的安全性。如上所讨论,未受刺激的单核细胞(73,74)和B细胞(86)不能正常表达TF,但包括LPS(75)、TNF α (76)和IL-1(77)在内的炎症介质能够在单核细胞上诱导TF,并且PMA可在B细胞上诱导TF(86,87)。

[0121] 临床前研究中的靶向TF抗体和抗体样免疫缀合物

[0122] 第二代和第三代靶向TF的抗体样免疫缀合物(L-ICON代表较轻ICON)

[0123] 为了使L-ICON1更有效,生成了第三代ICON,其被命名为L-ICON3(基因库登记号KY223609)和ICON3(基因库登记号KY223610)。L-ICON3和ICON3由融合到IgG3 Fc的fVII轻链(最开始152aa)或全长(含或不合K341A)构成(第3GEN,图1a和图1b)。研究已充分证实,IgG3抗体相比于IgG1抗体能够引发更有效的ADCC和/或CDC作用。第3GEN L-ICON3和第2GEN L-ICON1对癌细胞具有类似的结合活性,并且L-ICON3相比于第2GEN ICON(L-ICON1)在体外实际上能够引发更强的对癌细胞的ADCC细胞毒作用。在癌动物模型中,L-ICON3也相比于L-ICON1更有效。

[0124] 第四代靶向TF的抗体样免疫缀合物

[0125] 为了结合IgG1抗体(更长血清半衰期)和IgG3抗体(更强ADCC和/或CDC)的有益效果,IgG1和IgG3 Fc的杂合体融合到因子VII轻链或因子VII全长(含或不合K341A)的C端作为第四代ICON,分别被命名为L-ICON4和ICON4。此前已证实,IgG1/IgG3混合同种型的基因工程抗体中增强了ADCC和CDC活性(109)。

[0126] 靶向TF的抗体和抗体-药物缀合物(ADC)

[0127] 正在临床前和临床研究中研究若干人源化单克隆抗体(TF-HuMab)和/或抗体-药物缀合物(TF-ADC)(110,111)。荷兰的一个团队使用TF胞外结构域的纯化肽和表达TF的NSO细胞在人源化小鼠中生成了抗TF的人源化IgG1抗体(组织因子HuMab)(110)。其中三种抗体(被命名为TF-011、-098和-111)能够诱导TF:fVII依赖性细胞内信号传导、ADCC和快速受体内化的有效抑制,但在体外对TF促凝活性具有最小影响。他们将这些TF HuMab克隆与细胞毒剂MMAE或MMAF缀合在一起,并且证实TF-011-MMAE(HuMax-TF-ADC)是最强效的ADC且体内主导作用机制是澳瑞他汀介导的肿瘤细胞杀伤。在TF表达水平不同的患者源性异种移植植物(PDX)模型中,TF-011-MMAE诱导了完全肿瘤消退。有趣的是,在其25%至50%肿瘤细胞中有TF表达的PDX模型中,靶向TF的ADC也有效。ADC在TF低表达肿瘤细胞模型中有功效的原因是靶向TF的ADC也可能靶向其他TF阳性肿瘤腔隙,诸如肿瘤新生血管和/或癌干细胞,它们可由靶向TF的ICON在体外(22,37)和在体内(24,28)单独地靶向和根除。ADC的结果独立地表明,使用ADC进行的靶向TF的免疫治疗可具有治疗多种实体癌的治疗潜能,即使其肿瘤细胞上的TF表达水平较低。

[0128] 这一团队进一步将靶向TF的ADC的功效与靶向其他癌细胞受体诸如EGFR和HER2的那些进行了比较(112)。他们将TF、EGFR和HER2特异性抗体与多司他汀-3(duostatin-3,一种在抗体介导的内化后诱导强效细胞毒作用的毒素)缀合在一起。他们证实,在异种移植小鼠模型中,TF-ADC在降低肿瘤生长方面比EGFR-和HER2-ADC相对强效。

[0129] 结论

[0130] 总之,TF在血管生成依赖性人疾病(尤其是实体癌、AMD、子宫内膜异位和RA)的新生血管中的血管生成血管内皮细胞上选择性地表达。在癌中,癌细胞(包括实体癌细胞、AML和ALL白血病细胞、肉瘤细胞以及癌干细胞)也会过表达TF。另外,肿瘤微环境中的TAM和

MDSC (Hu等人, 未发表数据) 也可能会表达TF。在RA中, 患关节炎的关节中的巨噬细胞、B细胞、成纤维细胞和Ki-67阳性滑膜细胞也会在局部表达TF。在巨噬细胞相关人疾病中, 动脉粥样硬化中的单核细胞源巨噬细胞和泡沫细胞以及HIV和埃博拉感染的巨噬细胞会异常地表达TF。这些表达TF的细胞(新生血管性VEC、癌细胞、CSC、巨噬细胞/泡沫细胞、成纤维细胞、B细胞)全都参与疾病进展, 而正常VEC、单核细胞、T和NK细胞不表达TF。因此, 靶向TF代表能够广泛地治疗这些临床显著的疾病的新型治疗方法。

[0131] 如上所讨论, 有两种制备抗TF的治疗性抗体的方法。一种方法是将fVII (TF的天然配体) 融合到IgG1或IgG3 Fc, 另一种方法是制备人抗体。含fVII的抗体样免疫缀合物 (ICON和L-ICON) 具有优于抗TF人源化抗体和抗体-药物缀合物 (ADC) 的优点, 因为其对TF的亲合力更强并且不需要人源化。ICON和L-ICON分子被设计为通过使用TF的天然配体fVII (分别是含促凝活性位点突变 (K341A) 的全长肽, 或完全去除促凝活性的轻链肽) 来结合于TF, 其亲和力和特异性远高于使用抗TF抗体时能够实现的亲和力和特异性。与抗TF Ab和TF-ADC相比, ICON和L-ICON具有若干重要优点: (i) fVII结合于TF的解离常数 (K_d) 高达 10^{-12} M (113), 相比之下, 抗TF抗体对于TF具有在 10^{-8} 至 10^{-9} M范围内的 K_d (114)。 (ii) ICON和L-ICON由重组DNA技术产生, 从而允许这些靶向TF的蛋白试剂由临床试验用人来源制备, 而不需要单克隆抗体所需的人源化过程 (110)。 (iii) 由于事实上ADC是通过将强效药物共价缀合到抗体而制备的, 因此大多数ADC以非均相混合物的形式存在并且需要复杂的位点特异性缀合技术 (115)。此外, ADC中这些抗TF的抗体所起作用更像抗体/抗原结合后经由内化将细胞毒剂递送到癌细胞中的靶向分子, 而非经由ADCC和CDC起效的治疗性抗体。ADC方法类似于靶向fVII的光动力学疗法 (36), 在光动力学疗法中, fVII用作靶向分子以经由内化 (在fVII结合于TF后30分钟达到峰值内化) 将光敏剂选择性地递送到表达TF的癌细胞 (26, 27, 104, 105)、肿瘤VEC (22, 26, 27, 104, 105) 和CSC (22) (104)。

[0132] 在三代靶向TF的ICON之中, 数据显示, 在体外介导ADCC治疗癌细胞方面 (图4a) 以及在体内治疗原位小鼠模型中的鼠乳腺癌4T1 (动物IV期人乳腺癌) 方面 (图6b), 第2GEN L-ICON1相比于第1GEN ICON更有效 (图5) 并且第3GEN L-ICON3相比于第2GEN L-ICON1更有效。任何靶向TF的抗体样免疫缀合物或抗体的理想特征是它们只是结合TF而不具有促凝活性, 因此它们不会在这些人疾病中引起弥散性血管内凝血障碍。就这一点而言, L-ICON3是理想的, 这是由于其促凝活性已被完全去除。

[0133] 实施例2的参考文献:

[0134] 1. J.H. Morrissey, H. Fakhrai, T.S. Edgington, Molecular cloning of the cDNA for tissue factor, the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade, 《细胞》(Cell), 第50卷, 第129-135页 (1987年)。

[0135] 2. E.K. Spicer等人, Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor: primary structure of the protein and cDNA, 《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America), 第84卷, 第5148-5152页 (1987年)。

[0136] 3. W.H. Konigsberg, Y. Nemerson, Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor, 《细胞》(Cell), 第52卷, 第639-640页 (1988年)。

[0137] 4. A.D. Schecter等人, Tissue factor expression in human arterial smooth

muscle cells.TF is present in three cellular pools after growth factor stimulation,《临床研究杂志》(J Clin Invest),第100卷,第2276-2285页(1997年)。

[0138] 5.Y.Nemerson,Tissue factor and the initiation of blood coagulation,《实验医学与生物学进展》(Advances in experimental medicine and biology),第214卷,第83-94页(1987年)。

[0139] 6.Y.Nemerson,Tissue factor and hemostasis,《血液》(Blood),第71卷,第1-8页(1988年)。

[0140] 7.J.Folkman,Tumor angiogenesis and tissue factor,《自然医学》(Nature medicine),第2卷,第167-168页(1996年)。

[0141] 8.C.Lopez-Pedrerera,N.Barbarroja,G.Dorado,E.Siendones,F.Velasco,Tissue factor as an effector of angiogenesis and tumor progression in hematological malignancies,《白血病》(Leukemia),第20卷,第1331-1340页(2006年)。

[0142] 9.J.Rak,C.Milsom,L.May,P.Klement,J.Yu,Tissue factor in cancer and angiogenesis:the molecular link between genetic tumor progression,tumor neovascularization,and cancer coagulopathy,《血栓形成与止血法论文集》(Seminars in thrombosis and hemostasis),第32卷,第54-70页(2006年)。

[0143] 10.J.Folkman,Angiogenesis in cancer,vascular,rheumatoid and other disease,《自然医学》(Nature medicine),第1卷,第27-31页(1995年)。

[0144] 11.J.Folkman,Tumor angiogenesis:therapeutic implications,《新英格兰医学杂志》(The New England journal of medicine),第285卷,第1182-1186页(1971年)。

[0145] 12.P.S.Bora等人,Immunotherapy for choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model simulating exudative(wet)macular degeneration(,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第100卷,第2679-2684页(2003年)。

[0146] 13.T.H.Teziel等人,Targeting tissue factor for immunotherapy of choroidal neovascularization by intravitreal delivery of factor VII-Fc chimeric antibody,《眼部免疫学和炎症》(Ocul Immunol Inflamm),第15卷,第3-10页(2007年)。

[0147] 14.G.Krikun等人,The immunoconjugate“icon”targets aberrantly expressed endothelial tissue factor causing regression of endometriosis,《美国病理学杂志》(Am J Pathol),第176卷,第1050-1056页(2010年)。

[0148] 15.D.Hanahan,R.A.Weinberg,The hallmarks of cancer,Cell(《细胞》),第100卷,第57-70页(2000年)。

[0149] 16.D.Hanahan,R.A.Weinberg,Hallmarks of cancer:the next generation,Cell(《细胞》),第144卷,第646-674页(2011年)。

[0150] 17.N.Ferrara,VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors《自然综述:癌症》(Nature reviews.Cancer),第2卷,第795-803页(2002年)。

[0151] 18.M.Klagsbrun,R.Sullivan,S.Smith,R.Rybka,Y.E.Shing,Purification of endothelial cell growth factors by heparin affinity chromatography,《酶学方法》

(Methods in enzymology),第147卷,第95-105页(1987年)。

[0152] 19.A.O.Afuwape、S.Kiriakidis、E.M.Paleolog,The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,《组织学和组织病理学》(Histology and histopathology),第17卷,第961-972页(2002年)。

[0153] 20.J.Fujimoto、H.Sakaguchi、R.Hirose、H.Wen、T.Tamaya,Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors,《妇产科研究》(Gynecologic and obstetric investigation),第48卷增刊1,第14-20页(1999年)。

[0154] 21.Z.Hu等人,Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment:focus on the cancer hallmark of tumor angiogenesis,《致癌作用》(Carcinogenesis),第36卷增刊1,第S184-202页(2015年)。

[0155] 22.Z.Hu、J.Cheng、J.Xu、W.Ruf、C.J.Lockwood,Tissue factor is an angiogenic-specific receptor for factor VII-targeted immunotherapy and photodynamic therapy,《血管生成》(Angiogenesis),第20卷,第85-96页(2017年)。

[0156] 23.J.Contrino、G.Hair、D.L.Kreutzer、F.R.Rickles,In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells:correlation with the malignant phenotype of human breast disease,《自然医学》(Nature medicine),第2卷,第209-215页(1996年)。

[0157] 24.Z.Hu、Y.Sun、A.Garen,Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第96卷,第8161-8166页(1999年)。

[0158] 25.Z.Hu、A.Garen,Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第98卷,第12180-12185页(2001年)。

[0159] 26.J.Cheng等人,Effective treatment of human lung cancer by targeting tissue factor with a factor VII-targeted photodynamic therapy,《当今癌症药靶》(Current cancer drug targets),第11卷,第1069-1081页(2011年)。

[0160] 27.J.Duanmu、J.Cheng、J.Xu、C.J.Booth、Z.Hu,Effective treatment of chemoresistant breast cancer in vitro and in vivo by a factor VII-targeted photodynamic therapy,《英国癌症杂志》(British journal of cancer),第104卷,第1401-1409页(2011年)。

[0161] 28.Z.Hu、A.Garen,Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第97卷,第9221-9225页(2000年)。

[0162] 29.H.E.Grossniklaus等人,Macrophage and retinal pigment epithelium expression of angiogenic cytokines in choroidal neovascularization,《分子视觉》

(Mol Vis),第8卷,第119-126页(2002年)。

[0163] 30.G.Krikun、F.Schatz、H.Taylor、C.J.Lockwood,Endometriosis and tissue factor,《纽约科学院年报》(Ann N Y Acad Sci),第1127卷,第101-105页(2008年)。

[0164] 31.C.J.Lockwood等人,The role of tissue factor in regulating endometrial haemostasis:implications for progestin-only contraception,《人类生殖》(Hum Reprod),第15卷增刊3,第144-151页(2000年)。

[0165] 32.F.Schatz、G.Krikun、R.Caze、M.Rahman、C.J.Lockwood,Progestin-regulated expression of tissue factor in decidual cells:implications in endometrial hemostasis,menstruation and angiogenesis,《类固醇》(Steroids),第68卷,第849-860页(2003年)。

[0166] 33.G.Krikun,Endometriosis,angiogenesis and tissue factor,Scientifica (开罗),第2012卷,306830(2012年)。

[0167] 34.J.Contrino、G.A.Hair、M.A.Schmeizl、F.R.Rickles、D.L.Kreutzer,In situ characterization of antigenic and functional tissue factor expression in human tumors utilizing monoclonal antibodies and recombinant factor VIIa as probes,《美国病理学杂志》(Am J Pathol),第145卷,第1315-1322页(1994年)。

[0168] 35.N.S.Callander、N.Varki、L.V.Rao,Immunohistochemical identification of tissue factor in solid tumor,《癌症》(Cancer),第70卷,第1194-1201页(1992年)。

[0169] 36.Z.Hu,Factor VII-Targeted Photodynamic Therapy for Breast Cancer and Its Therapeutic Potential for Other Solid Cancers and Leukemia,《乳腺癌-当前和替代治疗方式》(Breast Cancer-Current and Alternative Therapeutic Modalities),Esra Gunduz和Mehmet Gunduz编辑,ISBN:978-953-307-776-5,InTech,可从以下网址获取:<http://www.intechopen.com/articles/show/title/factor-vii-targeted-photodynamic-therapy-for-breast-cancer-and-its-therapeutic-potential-for-other-s>.E.Gunduz、Gunduz,M.编辑,《乳腺癌-当前和替代治疗方式》(Breast Cancer-Current and Alternative Therapeutic Modalities)(InTech,2011年),第175-196页。

[0170] 37.Z.Hu等人,Targeting tissue factor as a novel therapeutic oncotarget for eradication of cancer stem cells isolated from tumor cell lines,tumor xenografts and patients of breast,lung and ovarian cancer,《肿瘤靶标》(Oncotarget),第8卷,第1481-1494页(2017年)。

[0171] 38.H.Tanaka等人,Studies on leukemic cell tissue factor,《血栓形成研究》(Thromb Res),第53卷,第535-549页(1989年)。

[0172] 39.T.Kubota、K.Andoh、H.Sadakata、H.Tanaka、N.Kobayashi,Tissue factor released from leukemic cells,《血栓形成和止血》(Thromb Haemost),第65卷,第59-63页(1991年)。

[0173] 40.J.C.Freeburn、W.S.Gilmore、J.J.Strain,The effect of cytokines on tissue factor expression in HL-60and U937 cell lines,《生物化学学会学报》(Biochem Soc Trans),第23卷,第286S页(1995年)。

- [0174] 41.F.R.Rickles、G.A.Hair、R.A.Zeff、E.Lee、R.D.Bona,Tissue factor expression in human leukocytes and tumor cells,《血栓形成和止血》(Thromb Haemost),第74卷,第391-395页(1995年)。
- [0175] 42.G.A.Hair等人,Tissue factor expression in human leukemic cells,《白血病研究》(Leuk Res),第20卷,第1-11页(1996年)。
- [0176] 43.M.Tanaka,Induction of tissue factor-like activity of human monoblastic leukemia cell line by tumor necrosis factor-alpha,《血栓形成研究》(Thromb Res),第56卷,第201-211页(1989年)。
- [0177] 44.K.Andoh等人,Tissue factor activity in leukemia cells.Special reference to disseminated intravascular coagulation,《癌症》(Cancer),第59卷,第748-754页(1987年)。
- [0178] 45.K.A.Bauer等人,Tissue factor gene expression in acute myeloblastic leukemia,《血栓形成研究》(Thromb Res),第56卷,第425-430页(1989年)。
- [0179] 46.M.Tanaka、T.Kishi,Induction of tissue factor by interleukin-2in acute myelogenous leukemia (AML) cells,《生长因子》(Growth Factors),第4卷,第1-8页(1990年)。
- [0180] 47.M.Tanaka、H.Yamanishi,The expression of tissue factor antigen and activity on the surface of leukemic cells,《白血病研究》(Leuk Res),第17卷,第103-111页(1993年)。
- [0181] 48.T.Nakasaki等人,Elevated tissue factor levels in leukemic cell homogenate,《临床与应用血栓症/止血研究》(Clin Appl Thromb Hemost),第6卷,第14-17页(2000年)。
- [0182] 49.T.Nakasaki等人,Decreased tissue factor and tissue-plasminogen activator antigen in relapsed acute promyelocytic leukemia,《美国血液学杂志》(Am J Hematol),第64卷,第145-150页(2000年)。
- [0183] 50.Y.Zhang等人,Intravenous somatic gene transfer with antisense tissue factor restores blood flow by reducing tumor necrosis factor-induced tissue factor expression and fibrin deposition in mouse meth-A sarcoma,《临床研究杂志》(J Clin Invest),第97卷,第2213-2224页(1996年)。
- [0184] 51.J.G.Bledsoe、S.M.Slack,Tissue factor expression by rat osteosarcoma cells adherent to tissue culture polystyrene and selected orthopedic biomaterials,《生物材料科学-聚合物版》(J Biomater Sci Polym Ed),第9卷,第1305-1312页(1998年)。
- [0185] 52.Y.M.Zhang等人,Vascular origin of Kaposi's sarcoma.Expression of leukocyte adhesion molecule-1,thrombomodulin,and tissue factor,《美国病理学杂志》(Am J Pathol),第144卷,第51-59页(1994年)。
- [0186] 53.T.M.Phillips、W.H.McBride、F.Pajonk,The response of CD24(-/low)/CD44+breast cancer-initiating cells to radiation,《国立癌症研究所杂志》(Journal of the National Cancer Institute),第98卷,第1777-1785页(2006年)。

- [0187] 54.G.Ferrandina、M.Petrillo、G.Bonanno、G.Scambia,Targeting CD133 antigen in cancer(,《治疗靶标专家评论》(Expert Opin Ther Targets),第13卷,第823-837页(2009年)。
- [0188] 55.C.Sheridan等人,CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties:an early step necessary for metastasis,《乳腺癌研究》(Breast Cancer Res),第8卷,第R59页(2006年)。
- [0189] 56.V.Adorno-Cruz等人,Cancer stem cells:targeting the roots of cancer, seeds of metastasis,and sources of therapy resistance,《癌症研究》(Cancer research),第75卷,第924-929页(2015年)。
- [0190] 57.Z.Hu、J.Li,Natural killer cells are crucial for the efficacy of Icon(factor VII/human IgG1 Fc)immunotherapy in human tongue cancer,《BMC免疫学》(BMC immunology),第11卷,第49页(2010年)。
- [0191] 58.R.O.Williams、M.Feldmann、R.N.Maini,Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第89卷,第9784-9788页(1992年)。
- [0192] 59.N.Busso、C.Morard、R.Salvi、V.Peclat、A.So,Role of the tissue factor pathway in synovial inflammation,《关节炎与风湿病学》(Arthritis Rheum),第48卷,第651-659页(2003年)。
- [0193] 60.L.Chen等人,Tissue factor expression in rheumatoid synovium:a potential role in pannus invasion of rheumatoid arthritis,《组织化学学报》(Acta histochemica), (2013年)。
- [0194] 61.Z.Szekanecz、A.E.Koch,Angiogenesis and its targeting in rheumatoid arthritis(,《血管药理学》(Vascul Pharmacol),第51卷,第1-7页(2009年)。
- [0195] 62.P.R.Colville-Nash、D.L.Scott,Angiogenesis and rheumatoid arthritis: pathogenic and therapeutic implications,《风湿病年鉴》(Ann Rheum Dis),第51卷,第919-925页(1992年)。
- [0196] 63.E.M.Paleolog、R.A.Fava,Angiogenesis in rheumatoid arthritis: implications for future therapeutic strategies,《施普林格免疫病理学论文集》(Springer Semin Immunopathol),第20卷,第73-94页(1998年)。
- [0197] 64.Z.Szekanecz、G.Szegedi、A.E.Koch,Angiogenesis in rheumatoid arthritis:pathogenic and clinical significance,《调查医学杂志》(J Investig Med),第46卷,第27-41页(1998年)。
- [0198] 65.D.G.Stupack、C.M.Storgard、D.A.Chersesh,A role for angiogenesis in rheumatoid arthritis,《巴西医学与生物研究杂志》(Braz J Med Biol Res),第32卷,第573-581页(1999年)。
- [0199] 66.E.M.Paleolog,Angiogenesis in rheumatoid arthritis,《关节炎研究》(Arthritis Res),第4卷增刊3,第S81-90页(2002年)。
- [0200] 67.Z.Szekanecz、L.Gaspar、A.E.Koch,Angiogenesis in rheumatoid

arthritis,《生物科学前沿》Front Biosci),第10卷,第1739-1753页(2005年)。

[0201] 68.N.Maruotti、F.P.Cantatore、E.Crivellato、A.Vacca、D.Ribatti, Angiogenesis in rheumatoid arthritis,《组织学和组织病理学》(Histology and histopathology),第21卷,第557-566页(2006年)。

[0202] 69.Z.Szekanecz、T.Besenyey、G.Paragh、A.E.Koch,Angiogenesis in rheumatoid arthritis,《自身免疫》(Autoimmunity),第42卷,第563-573页(2009年)。

[0203] 70.A.Marrelli等人,Angiogenesis in rheumatoid arthritis:A disease specific process or a common response to chronic inflammation?《自身免疫评论》(Autoimmun Rev), (2011年)。

[0204] 71.Z.Szekanecz、A.E.Koch,Endothelial cells in inflammation and angiogenesis,《药靶研究最新进展:炎症与过敏症》(Current drug targets.Inflammation and allergy),第4卷,第319-323页(2005年)。

[0205] 72.H.Wada、Y.Wakita、H.Shiku,Tissue factor expression in endothelial cells in health and disease,《血凝固与纤维蛋白溶解:止血和血栓形成方面的国际性杂志》(Blood coagulation&fibrinolysis:an international journal in haemostasis and thrombosis),第6卷增刊1,第S26-31页(1995年)。

[0206] 73.B.Osterud、E.Bjorklid,The production and availability of tissue thromboplastin in cellular populations of whole blood exposed to various concentrations of endotoxin.An assay for detection of endotoxin,《斯堪的纳维亚血液学杂志》(Scand J Haematol),第29卷,第175-184页(1982年)。

[0207] 74.J.C.Lewis等人,Tissue factor expression during coculture of endothelial cells and monocytes,《实验与分子病理学》(Experimental and molecular pathology),第62卷,第207-218页(1995年)。

[0208] 75.T.Luther、C.Flossel、V.Hietschhold、R.Koslowski、M.Muller,Flow cytometric analysis of tissue factor (TF) expression on stimulated monocytes--comparison to procoagulant activity of mononuclear blood cells,《血液》(Blut),第61卷,第375-378页(1990年)。

[0209] 76.J.M.Herbert、P.Savi、M.C.Laplace、A.Lale,IL-4inhibits LPS-,IL-1beta- and TNF alpha-induced expression of tissue factor in endothelial cells and monocytes,《欧洲生化学会联合会快报》(FEBS letters),第310卷,第31-33页(1992年)。

[0210] 77.J.M.Herbert等人,Malformin-A1 inhibits the binding of interleukin-1beta (IL1 beta) and suppresses the expression of tissue factor in human endothelial cells and monocytes,《生化药理学》(Biochemical pharmacology),第48卷,第1211-1217页(1994年)。

[0211] 78.E.Camerer、A.B.Kolsto、H.Prydz,Cell biology of tissue factor,the principal initiator of blood coagulation,《血栓形成研究》(Thromb Res),第81卷,第1-41页(1996年)。

[0212] 79.U.R.Pendurthi、D.Alok、L.V.Rao,Binding of factor VIIa to tissue factor induces alterations in gene expression in human fibroblast cells:up-

regulation of poly (A) polymerase,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),第94卷,第12598-12603页(1997年)。

[0213] 80.E.F.Grabowski、D.B.Zuckerman、Y.Nemerson,The functional expression of tissue factor by fibroblasts and endothelial cells under flow conditions,《血液》(Blood),第81卷,第3265-3270页(1993年)。

[0214] 81.M.Juarez、A.Filer、C.D.Buckley,Fibroblasts as therapeutic targets in rheumatoid arthritis and cancer,《瑞士医学周刊》(Swiss medical weekly),第142卷,第w13529页(2012年)。

[0215] 82.T.Dorner、G.R.Burmester,The role of B cells in rheumatoid arthritis:mechanisms and therapeutic targets,《风湿病学近期评述》(Current opinion in rheumatology),第15卷,第246-252页(2003年)。

[0216] 83.T.Dorner、P.E.Lipsky,B-cell targeting:a novel approach to immune intervention today and tomorrow,《生物治疗专家意见》(Expert opinion on biological therapy),第7卷,第1287-1299页(2007年)。

[0217] 84.T.Dorner等人,Current status on B-cell depletion therapy in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis,《自身免疫评论》(Autoimmun Rev),第9卷,第82-89页(2009年)。

[0218] 85.T.Dorner、N.Kinnman、P.P.Tak,Targeting B cells in immune-mediated inflammatory disease:a comprehensive review of mechanisms of action and identification of biomarkers,《药理学与治疗学》(Pharmacology&therapeutics),第125卷,第464-475页(2010年)。

[0219] 86.H.Mechiche、P.Cornillet-Lefebvre、P.Nguyen,A subpopulation of human B lymphocytes can express a functional Tissue Factor in response to phorbol myristate acetate,《血栓形成和止血》(Thromb Haemost),第94卷,第146-154页(2005年)。

[0220] 87.H.Mechiche、P.Nguyen,IL-4modulates tissue factor expression by human B lymphocytes in response to phorbol myristate acetate,《血栓形成和止血》(Thromb Haemost),第97卷,第158-159页(2007年)。

[0221] 88.R.Badolato、J.J.Oppenheim,Role of cytokines,acute-phase proteins, and chemokines in the progression of rheumatoid arthritis,《关节炎与风湿病论文集》(Semin Arthritis Rheum),第26卷,第526-538页(1996年)。

[0222] 89.Z.Szekanecz、A.Pakozdi、A.Szentpetery、T.Besenyeyi、A.E.Koch,Chemokines and angiogenesis in rheumatoid arthritis,《生物科学前沿(精英版)》(Front Biosci (Elite Ed)),第1卷,第44-51页(2009年)。

[0223] 90.K.D.Deane等人,The number of elevated cytokines and chemokines in preclinical seropositive rheumatoid arthritis predicts time to diagnosis in an age-dependent manner,《关节炎与风湿病学》(Arthritis Rheum),第62卷,第3161-3172页(2010年)。

- [0224] 91.H.Kokkonen等人,Up-regulation of cytokines and chemokines predates the onset of rheumatoid arthritis,《关节炎与风湿病学》(Arthritis Rheum),第62卷,第383-391页(2010年)。
- [0225] 92.J.Friedl等人,Induction of permeability across endothelial cell monolayers by tumor necrosis factor (TNF) occurs via a tissue factor-dependent mechanism:relationship between the procoagulant and permeability effects of TNF,《血液》(Blood),第100卷,第1334-1339页(2002年)。
- [0226] 93.M.Mayr等人,Proteomics,metabolomics,and immunomics on microparticles derived from human atherosclerotic plaques,《循环:心血管遗传学》(Circ Cardiovasc Genet),第2卷,第379-388页(2009年)。
- [0227] 94.M.Camera等人,The Role of Tissue Factor in Atherothrombosis and Coronary Artery Disease:Insights into Platelet Tissue Factor,《血栓形成与止血法论文集》(Seminars in thrombosis and hemostasis),第41卷,第737-746页(2015年)。
- [0228] 95.K.Tatsumi、N.Mackman,Tissue Factor and Atherothrombosis,《动脉粥样硬化和血栓形成杂志》(J Atheroscler Thromb),第22卷,第543-549页(2015年)。
- [0229] 96.D.Saha、S.S.E.G.Sergeeva、Z.I.Ionova、A.V.Gorbach,Tissue factor and atherothrombosis,《当今药物设计》(Curr Pharm Des),第21卷,第1152-1157页(2015年)。
- [0230] 97.A.P.Owens,3rd、N.Mackman,Role of tissue factor in atherothrombosis,《最新动脉硬化报告》(Curr Atheroscler Rep),第14卷,第394-401页(2012年)。
- [0231] 98.P.Meerarani、P.R.Moreno、G.Cimmino、J.J.Badimon,Atherothrombosis:role of tissue factor;link between diabetes,obesity and inflammation,《印度实验生物学杂志》(Indian J Exp Biol),第45卷,第103-110页(2007年)。
- [0232] 99.J.F.Viles-Gonzalez、J.J.Badimon,Atherothrombosis:the role of tissue factor,《国际生物化学与细胞生物学杂志》(Int J Biochem Cell Biol),第36卷,第25-30页(2004年)。
- [0233] 100.P.Benaroch、E.Billard、R.Gaudin、M.Schindler、M.Jouve,HIV-1-assembly in macrophages,《逆转录病毒学》(Retrovirology),第7卷,第29页(2010年)。
- [0234] 101.Z.F.Rosenberg、A.S.Fauci,Immunopathogenesis of HIV infection,《美国实验生物学会联合会会志》(FASEB J),第5卷,第2382-2390页(1991年)。
- [0235] 102.N.T.Funderburg等人,Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection:relationship to in vivo coagulation and immune activation,《血液》(Blood),第115卷,第161-167页(2010年)。
- [0236] 103.Y.Tang等人,Mapping of angiogenic markers for targeting of vectors to tumor vascular endothelial cells,《癌症基因治疗》(Cancer Gene Ther),第14卷,第346-353页(2007年)。
- [0237] 104.Z.Hu、B.Rao、S.Chen、J.Duanmu,Selective and effective killing of angiogenic vascular endothelial cells and cancer cells by targeting tissue factor using a factor VII-targeted photodynamic therapy for breast cancer,《乳腺癌研究与治疗》(Breast Cancer Res Treat),第14卷,第103-110页(2010年)。

[0238] 105.Z.Hu、B.Rao、S.Chen、J.Duanmu,Targeting tissue factor on tumour cells and angiogenic vascular endothelial cells by factor VII-targeted verteporfin photodynamic therapy for breast cancer in vitro and in vivo in mice,《BMC癌症》(BMC Cancer),第10卷,第235页(2010年)。

[0239] 106.J.M.Brenchley等人,Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection,《自然医学》(Nature medicine),第12卷,第1365-1371页(2006年)。

[0240] 107.T.W.Geisbert等人,Mechanisms underlying coagulation abnormalities in ebola hemorrhagic fever:overexpression of tissue factor in primate monocytes/macrophages is a key event,《传染病杂志》(J Infect Dis),第188卷,第1618-1629页(2003年)。

[0241] 108.T.W.Geisbert等人,Treatment of Ebola virus infection with a recombinant inhibitor of factor VIIa/tissue factor:a study in rhesus monkeys,《柳叶刀》(Lancet),第362卷,第1953-1958页(2003年)。

[0242] 109.A.Natsume等人,Engineered antibodies of IgG1/IgG3 mixed isotype with enhanced cytotoxic activities,《癌症研究》(Cancer research),第68卷,第3863-3872页(2008年)。

[0243] 110.E.C.Breij等人,An antibody-drug conjugate that targets tissue factor exhibits potent therapeutic activity against a broad range of solid tumors,《癌症研究》(Cancer research),第74卷,第1214-1226页(2014年)。

[0244] 111.X.Zhang等人,Pathological expression of tissue factor confers promising antitumor response to a novel therapeutic antibody SC1 in triple negative breast cancer and pancreatic adenocarcinoma,《肿瘤靶标》(Oncotarget),第8卷,第59086-59102页(2017年)。

[0245] 112.B.E.de Goeij等人,High turnover of tissue factor enables efficient intracellular delivery of antibody-drug conjugates,《分子癌症治疗学》(Mol Cancer Ther),第14卷,第1130-1140页(2015年)。

[0246] 113.E.Waxman等人,Tissue factor and its extracellular soluble domain: the relationship between intermolecular association with factor VIIa and enzymatic activity of the complex,《生物化学》(Biochemistry),第31卷,第3998-4003页(1992年)。

[0247] 114.L.Presta等人,Generation of a humanized,high affinity anti-tissue factor antibody for use as a novel antithrombotic therapeutic,《血栓形成和止血》(Thromb Haemost),第85卷,第379-389页(2001年)。

[0248] 115.V.Chudasama、A.Marvani、S.Caddick,Recent advances in the construction of antibody-drug conjugates,《自然-化学》(Nat Chem),第8卷,第114-119页(2016年)。

[0249] 116.Zhiwei Hu*、Rulong Shen、Amanda Campbell、Elizabeth McMichael、Lianbo Yu、Bhuvaneswari Ramaswamy、Cheryl A.London、Tian Xu和William E.Carson III,

Targeting Tissue Factor for Immunotherapy of Triple-Negative Breast Cancer using a Second-Generation ICON,《癌症免疫学研究》(Cancer Immunology Research), 2018年3月7日录用。

[0250] 117.Hu等人, Therapeutic antibody-like immunoconjugates against tissue factor with the potential to treat angiogenesis-dependent as well as macrophage-associated human diseases,《抗体》(Antibodies), 2018年,第7卷,第1期,第8页;doi:10.3390/antib7010008。

[0251] 实施例3:第四代ICON

[0252] 1.L-ICON4:L-ICON1与L-ICON3的组合

[0253] 如上所讨论,存在三种L-ICON1蛋白,它们被命名为L-ICON1 (SEQ ID NO 5)、L-ICON1 (WT) (SEQ ID NO 6) 和L-ICON1 (E333A) (SEQ ID NO7)。它们的cDNA序列已分别以登记号KX760097、KX760098和KX760099保藏到基因库。

[0254] 还存在两种L-ICON3蛋白,它们被命名为L-ICON3 (WT) (SEQ ID NO1) 或L-ICON3 (基因库登记号KY223609) 和L-ICON3 (R435H) (SEQ ID NO 8)。

[0255] L-ICON4能够由三种L-ICON1蛋白中的每一者与两种L-ICON3蛋白中的每一者的组合衍生而来。这些蛋白列于表2中。

[0256] 2.ICON4:ICON1与ICON3的组合

[0257] 还存在两种ICON1蛋白,它们被命名为ICON1 (WT) (SEQ ID NO 9) 和ICON1 (E333A) (SEQ ID NO 9)。这些新ICON1蛋白中的IgG1 Fc序列不同于初始ICON序列(人ICON基因库AF272774)。这些新ICON1的主要差异是与初始ICON(或称为ICON1, AF272774)相比,它们具有短6个氨基酸残基的铰链区。

[0258] 存在两种ICON3蛋白,它们被命名为ICON3 (WT) (基因库登记号KY223610) (以上SEQ ID NO 3) 和ICON3 (R435H) (SEQ ID NO 11)。

[0259] 因此,ICON4能够由两种L-ICON1中的每一者与两种ICON3中的每一者的组合衍生而来(表3)。

[0260] 除非另有定义,否则本文所用的所有技术和科学术语的含义与所公开的发明所属领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中引述的出版物及其中引述的材料明确地以引用方式并入。

[0261] 本领域的技术人员将认识到或能够使用不超过常规实验来探知本文所述发明的具体实施方案的许多等同物。此类等同物旨在由以下权利要求书涵盖。

[0262] 序列

[0263] SEQ ID NO:1人因子VII轻链-人IgG3 Fc (L-ICON3) mRNA,完整编码序列(基因库登记号KY223609)。

[0264]

1 aagcttgaat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg
61 cttcagggct gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagccacgg cgctctgcac
121 cggcgccggc gcgccaacgc gttcctggag gagctgcggc cgggctccct ggagagggag
181 tgcaaggagg agcagtgtct cttcgaggag gcccgggaga tcttcaagga cgcggagagg
241 acgaagctgt tctggatttc ttacagtgat ggtgaccagt gtgcctcaag tccatgccag
301 aatgggggct cctgcaagga ccagctccag tcctatatct gcttctgcct ccctgccttc
361 gagggccgga actgtgagac gcacaaggat gaccagctga tctgtgtgaa cgagaacggc
421 ggctgtgagc agtactgcag tgaccacacg ggcaccaagc gctcctgtcg gtgccacgag
481 gggtagcttc tgctggcaga cggggtgtcc tgcacacca cagttgaata tccatgtgga
541 aaaataccta ttctagaaaa aagaaatgcc agcaagcccc aaggcgagg atccgacaca
601 cctcccccggt gcccaagggtg ccagcacct gaactcctgg gaggaccgtc agtcttcttc
661 ttccccccaa aaccaagga tacccttatg atttcccgga cccctgaggt cacgtgcgtg
721 gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca agtggtacgt ggacggcgtg
781 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gttccgtgtg
841 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag
901 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaac caaaggacag
961 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatccggg aggagatgac caagaaccag
1021 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag
1081 agcagcgggc agccggagaa caactacaac accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc
1141 tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacatc
1201 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccgct tcacgcagaa gagcctctcc
1261 ctgtctccgg gtaaagtagc ggccgc

[0265] (HindIII-EcoRI-Kozak-ATG-hfVIIIL-BamHI-hIgG3Fc-Stop-NotI)

[0266] SEQ ID NO:2:L-ICON3肽的单体

[0267]

MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFK
DAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYC
SDHTGTRKSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRGSDTPPCPRCPAPELLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNI FSCSVMHEALHNRF TQKSLSLSPGK

[0268] SEQ ID NO:3:人因子VII (K341A)-人IgG3 Fc (ICON3) mRNA,完整编码序列 (基因库登记号KY223610)。

[0269]

```
1   aagctttgca gagatttcat catggtctcc caggccctca ggctcctctg ctttctgctt
61  gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc gtaaccacagg aggaagccca cggcgtcctg
121 caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttcctg gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg
181 gagtgcgaagg aggagcagtg ctcttctgag gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag
241 aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt gatggtgacc agtgtgcctc aagtccatgc
301 cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc cagtcctata tctgcttctg cctccctgcc
361 ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac
421 ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac acgggcacca agcgtcctg tcggtgccac
481 gaggggtact ctctgctggc agacggggtg tcctgcacac ccacagttga atatccatgt
541 ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat gccagcaagc cccaagggcg aattgtgggg
601 ggcaagggtg gccccaaagg ggagtgtcca tggcagggtc tgttgttggt gaatggagct
661 cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc atctgggtgg tctccgcggc ccactgtttc
721 gacaaaatca agaactggag gaacctgatc gcggtgctcg gggagcacga cctcagcgag
781 cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg gcgcagggtc tcatccccag cacgtacgtc
841 ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg ctccgcctgc accagcccggt ggtcctcact
901 gaccatgtgg tgccctctg cctgcccgaa cggacgttct ctgagaggac gctggccttc
961 gtgcgcttct cattggtcag cggctggggc cagctgctgg accgtggcgc cacggccctg
1021 gagctcatgg tcctcaacgt gccccggctg atgaccacagg actgcctgca gcagtcacgg
1081 aaggtgggag actccccaaa tatcacggag tacatgttct gtgccggcta ctcggatggc
1141 agcaaggact cctgcgcggg ggacagtgga ggcccacatg ccaccacta ccggggcacg
1201 tggtagctga cgggcatcgt cagctggggc cagggtgctg caaccgtggg ccactttggg
1261 gtgtacacca ggggtctcca gtacatcgag tggctgcaaa agctcatgct ctcagagcca
1321 cgcccaggag tcctcctgct agccccattt cccggatccg acacacctcc cccgtgccca
1381 aggtgcccag cacctgaact cctgggagga ccgtcagttc tcctcttccc cccaaaaccc
1441 aaggataccc ttatgatttc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgtgagc
1501 cacgaagacc ccgaggtcca gttcaagtgg tacgtggacg gcgtggagggt gcataatgcc
1561 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgttcc gtgtgggtcag cgtcctcacc
1621 gtctctgacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaagggtct caacaaagcc
1681 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag
1741 gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
1801 ctggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg
1861 gagaacaact acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt ctctctctac
1921 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg
1981 atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
2041 tgagcggccg c
```

[0270] SEQ ID NO:4:ICON3肽的单体

[0271]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFK
DAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYC
SDHTGTRKSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLV
NGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLI AVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHD
IALRLHQPVVLT DHVVPCLCPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQ
QSRKVGDSPNITEYMF CAGYSDGSKDSCAGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPGSDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVV
DVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK
TISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSF
FLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNRF TQKSLSLSPGK

[0272] SEQ ID NO:5:L-ICON3 (R435H)

[0273]

AAGCTTGAATTCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTG
GGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTC
CTGCACCGGCGCCGGCGGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCT
GGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGAGATCTTCA
AGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAGTGT
GCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATC
TGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAG
CTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGG
CACCAAGCGCTCCTGTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTG
CTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGA AAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA
ATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAGGATCCGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAG
GATACCTTATGATTTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
CACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAAGTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGACA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGAGAAACA AACTACAACACCACGCCTCCCATGCTG

[0274]

GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTC
ACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAGCGGCCGC

[0275] SEQ ID NO:6L-ICON3 (R435H) 的单体

[0276]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTGRSCRHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRGSDTPPPCPRCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESS
GQPENNYNTTPPMLDSDSGFFLYSKLTVDKSRWQ QGNIFSCSVM HEALHNRFQ
KSLSLSPGK

[0277] SEQ ID NO:7:ICON3 (R435H)

[0278]

AAGCTTTGCAGAGATTTTCATCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGC
TTGGGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGC
GTCCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTC
CCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCT
TCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAG
TGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGAC
CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACAC
GGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGG
TGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAATAATACCTATTCTAGAAAAAA
GAAATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGG
GGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAA
CTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTCGGGGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGC
ACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGAC
CATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC

[0279]

GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCC
CTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAG
TCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTA
CTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCGCGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCC
ACTACCGGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
ACCGTGGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAA
AAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCGGA
TCCGACACACCTCCCCCGTGCCCAAGGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGAGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGATACCCTTATGATTTCCCGGACCCCT
GAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAA
GTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAG
CAGTACAACAGCACGTTCCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG
CTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCAT
CGAGAAAACCATCTCCAAAACCAAAGGACAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAGCGGGCAGCCGGA
GAACA ACTACAACACCACGCCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACATCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCGCTTCACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAATGAGCGGCCGC

[0280] SEQ ID NO:8:ICON3 (R435H) 的单体

MVSQALRLLC LLLGLQGCLA AVFVTQEEAH GVLHRRRRAN AFLEELRPGS
LERECKEEQC SFEEAREIFK DAERTKLFWI SYSDGDQCAS SPCQNGGSCK
DQLQSYICFC LPAFEGRNCE THKDDQLICV NENGGCEQYC SDHTGTRKSC
RCHEGYSLLA DGVSCTPTVE YPCGKIPILE KRNASKPQGR IVGGKVCPKG
ECPWQVLLL NVGAQLCGGTL INTIWVVSAA HCFDKIKNWR NLI AVLGEHD

[0281]

LSEHDGDEQS RRVAQVIIPS TYVP GTTNHD IALLRLHQPV VLT DHV VPLC
LPERTFSERT LAFVRFSLVS GWGQLLDRGA TALELMVLNV PRLMTQDCLQ
QSRKVGDSPN ITEYMF CAGY SDGSKDSCAG DSGGPHATHY RGTWYLTGIV
SWGQGCATVG HFGVYTRVSQ YIEWLQKLMR SEPRPGVLLR APFPGSDTPP
PCPRCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ
FKWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTFRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS

NKALPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP

[0282] SDIAVEWESS GQPENNYNTT PPMLDSGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNIFS
CSVMHEALHN RFTQKSLSLS PGK

[0283] SEQ ID NO.9:ICON1 (WT) :

[0284]

AAGCTTTGCAGAGATTTTCATCAT**T**GGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTG
CTTGGGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGC
GTCCTGCACCGGCGCCGGCGGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTC
CCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCT
TCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAG
TGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT
ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACCTGTGAGACGCACAAGGATGAC
CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACAC
GGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGG
TGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAA
GAAATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGG
GGAGTGTCCATGGCAGGTCTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAA
CTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTCGGGGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGC
ACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGAC
CATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCC
CTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAG
TCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTA
CTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGC**GCG**GGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCC
ACTACCGGGGCACGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
ACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAA
AAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCGGGA
TCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC
GTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA

[0285]

GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TC**GAG**AAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACGCC
CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTC
AAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA
GAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCT
CCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTC
CGGGTAAATGATAAGCGGCCGC

[0286] SEQ ID NO:10:ICON1 (WT) 的单体:

[0287]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLLADGV SCTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLD RGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR
KVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCAGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYALPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0288] SEQ ID NO.11:ICON1 (E333A)

[0289]

AAGCTTTGCAGAGATTT CATCAT**TGGT**CTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTG
CTTGGGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGC
GTCCTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTC
CCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCT
TCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAG
TGTGCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTAT

[0290]

ATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGAC
CAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACAC
GGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGG
TGTCCTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAA
GAAATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAATTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGG
GGAGTGTCCATGGCAGGTCCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTGTGGGGGGAC
CCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAA
CTGGAGGAACCTGATCGCGGTGCTCGGGGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGG
ATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCATCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGC
ACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCCTCACTGAC
CATGTGGTGCCCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTC
GTGCGCTTCTCATTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCC
CTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGCTGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAG
TCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGCCGGCTA
CTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCGCGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCC
ACTACCGGGGACAGTGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCA
ACCGTGGGGCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCTCCCAGTACATCGAGTGGCTGCAA
AAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCCCGGA
TCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACC
GTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCC
TGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGA
GCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTG
GCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCA
TCGCGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT
CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG
AGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCT
ACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC
TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCT
CCGGGTAAATGATAAGCGGCCGC

[0291] SEQ ID NO:12:ICON1 (E333A) 的单体

[0292]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGEC PWQVLLL VNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFDKI
KNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLTDH
VVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSR
KVGDSPNITEYMF CAGYSDGSKDSCAGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVG
HFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP
PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS PGK

[0293] SEQ ID NO.13:L-ICON1 (基因库KX760097)

[0294]

AAGCTTGAATTCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTG
GGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTC
CTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCT
GGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCA
AGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAGTGT
GCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATC
TGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACCTGTGAGACGCACAAGGATGACCAG
CTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGG
CACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTC
CTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA
ATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAGGATCCGCAGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCT
CACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGA
CGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC
ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG
GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT

[0295]

CTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC
GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCA
CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT
GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG
ATAAGCGGCCGC

[0296] SEQ ID NO:14:L-ICON1的单体

[0297]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLA AVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHTGTRSCRCHEGYSLADGV SCTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRGSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHN
HYTQKSLSLSPGK

[0298] SEQ ID NO.15:L-ICON 1 (WT) (基因库KX760098)

[0299]

AAGCTTGAATTCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTG
GGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTC
CTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCT
GGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCA
AGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAGTGT
GCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATC
TGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGA ACTGTGAGACGCACAAGGATGACCAG
CTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGG
CACCAAGCGCTCCTGTTCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTC
CTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA
ATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAGGATCCGACAAA ACTCACACATGCCACCGTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAA AACC AAG
GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC

[0300]

CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
GCCCCGAGAACCACAGGTGTACGCCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA
ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTG
GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAAGCGGCCGC

[0301] SEQ ID NO:16:L-ICON1 (WT) 的单体

[0302]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRN
CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRSCRHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIP
ILEKRNASKPQGRGSDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYALPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEV
ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVM HEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0303] SEQ ID NO.17:L-ICON1 (E333A) (基因库KX760099)

[0304]

AAGCTTGGATTGCGCCACCATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTG
GGCTTCAGGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCCACGGCGTC
CTGCACCGGCGCCGGCGCGCCAACGCGTTCCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCT
GGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGAGGCCCGGGAGATCTTCA
AGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGTGACCAGTGT
GCCTCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCCTATATC
TGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCGAGGGCCGGAACGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAG
CTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTGCAGTGACCACACGGG
CACCAAGCGCTCCTGTGCGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGGTGTC
CTGCACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAA

[0305]

ATGCCAGCAAGCCCCAAGGGCGAGGATCCGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGC
 CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG
 GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGC
 CACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAA
 TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG
 TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTC
 TCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGCGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA
 GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGA
 ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGG
 AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG
 GACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGG
 CAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
 ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAAGCGGCCGC

[0306] SEQ ID NO:18:L-ICON1 (E333A) 的单体

[0307]

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEE
 QCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRN
 CETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHTGTRSCRCHEGYSLLAGVSCTPTVEYPCGKIPIL
 EKRNASKPQGRGSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKALPAPIAKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES
 NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

[0308] 表格

[0309] 表1.L-ICON1、ICON (WT) 和ICON (K341A) 的凝血活性 (IU/ml, 平均值±SD)

[0310]

浓度(nM)	L-ICON1	ICON(K341A)	ICON(WT)	FVIIa-FFR	FVIIa
10.00 (凝血活性)*	-0.013 ± 0.000 (-6.061 ± 0.000%)	0.012 ± 0.003 (5.405 ± 1.177%)	0.124 ± 0.019 (57.748 ± 8.654%)	0.009 ± 0.001 (4.041 ± 0.521%)	0.215 ± 0.001 (100.00 ± 0.437%)*
5.00	-0.013 ± 0.001	0.003 ± 0.002	0.083 ± 0.012	0.001 ± 0.001	不适用

[0311]

2.50	-0.014 ± 0.000	-0.004 ± 0.003	0.056 ± 0.022	-0.005 ± 0.001	不适用
1.25	-0.013 ± 0.001	-0.007 ± 0.001	0.014 ± 0.007	-0.009 ± 0.000	0.131 ± 0.006**

[0312] *为了与L-ICON1和ICON进行比较,10nM FVIIa的凝血活性被指定为100%。

[0313] **FVIIa的浓度为1.00nM,而其他蛋白被稀释到1.25nM。

[0314] 表2.以因子VII轻链作为靶向结构域的第四代靶向组织因子的ICON (L-ICON4)

[0315]

L-ICON4 亚型	来自 L-ICON1 的一条肽链 (基因库登记号)	来自 L-ICON3 的一条肽链 (基因库登记号)
L-ICON4-1	L-ICON1 (KX760097): SEQ ID NO 13	L-ICON3(WT) (KY223609) SEQ ID NO 1
L-ICON4-2	L-ICON1(KX760097) SEQ ID NO 13	L-ICON3(R435) SEQ ID NO 5
L-ICON4-3	L-ICON1(WT) (KX760098) SEQ ID NO 15	L-ICON3(WT) (KY223609) SEQ ID NO 1
L-ICON4-4	L-ICON1(WT) (KX760098) SEQ ID NO 15	L-ICON3(R435) SEQ ID NO 8
L-ICON4-5	L-ICON1(E333A) (KX760099) SEQ ID NO 17	L-ICON3(WT) (KY223609) SEQ ID NO 1
L-ICON4-6	L-ICON1(E333A) (KX760099) SEQ ID NO 17	L-ICON3(R435) SEQ ID NO 5

[0316] 表3.以因子VII K341A作为靶向结构域的第四代靶向组织因子的ICON (ICON4)

[0317]

ICON4 亚型	来自 L-ICON1 的一条肽链 (待提交到基因库)	来自 L-ICON3 的一条肽链 (基因库登记号)
ICON4-1	ICON1 (WT) SEQ ID NO. 9	ICON3(WT) (KY223610) SEQ ID NO. 2
ICON4-2	ICON1 (WT) SEQ ID NO. 9	ICON3(R435) SEQ ID NO. 11
ICON4-3	ICON1(E333A) SEQ ID NO. 11	ICON3(WT) (KY223610) SEQ ID NO. 2
ICON4-4	ICON1(E333A) SEQ ID NO. 11	ICON3(R435) SEQ ID NO. 11

[0318] 参考文献

[0319] 1.Morrissey JH、Fakhrai H和Edgington TS,Molecular cloning of the cDNA for tissue factor,the cellular receptor for the initiation of the coagulation protease cascade,《细胞》(Cell),1987年;第50卷,第1期,第129-135页。

[0320] 2.Spicer EK、Horton R、Bloem L、Bach R、Williams KR、Guha A、Kraus J、Lin TC、Nemerson Y和Konigsberg WH,Isolation of cDNA clones coding for human tissue factor:primary structure of the protein and cDNA,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),1987年;第84卷,第15期,第5148-5152页。

[0321] 3.Konigsberg WH和Nemerson Y,Molecular cloning of the cDNA for human tissue factor,《细胞》(Cell),1988年;第52卷,第5期,第639-640页。

- [0322] 4.Nemerson Y,Tissue factor and the initiation of blood coagulation,《实验医学与生物学进展》(Advances in experimental medicine and biology),1987年;第214卷,第83-94页。
- [0323] 5.Nemerson Y,Tissue factor and hemostasis,《血液》(Blood),1988年;第71卷,第1期,第1-8页。
- [0324] 6.Contrino J,Hair G,Kreutzer DL和Rickles FR,In situ detection of tissue factor in vascular endothelial cells:correlation with the malignant phenotype of human breast disease,《自然医学》(Nature medicine),1996年;第2卷,第2期,第209-215页。
- [0325] 7.Folkman J,Tumor angiogenesis and tissue factor,《自然医学》(Nature medicine),1996年;第2卷,第2期,第167-168页。
- [0326] 8.Hu Z,Sun Y和Garen A,Targeting tumor vasculature endothelial cells and tumor cells for immunotherapy of human melanoma in a mouse xenograft model,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),1999年;第96卷,第14期,第8161-8166页。
- [0327] 9.Hu Z和Garen A,Targeting tissue factor on tumor vascular endothelial cells and tumor cells for immunotherapy in mouse models of prostatic cancer,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),2001年;第98卷,第21期,第12180-12185页。
- [0328] 10.Cheng J,Xu J,Duanmu J,Zhou H,Booth CJ和Hu Z,Effective treatment of human lung cancer by targeting tissue factor with a factor VII-targeted photodynamic therapy,《当今癌症药靶》(Current cancer drug targets),2011年;第11卷,第9期,第1069-1081页。
- [0329] 11.Duanmu J,Cheng J,Xu J,Booth CJ和Hu Z,Effective treatment of chemoresistant breast cancer in vitro and in vivo by a factor VII-targeted photodynamic therapy,《英国癌症杂志》(British journal of cancer),2011年;第104卷,第9期,第1401-1409页。
- [0330] 12.Bora PS,Hu Z,Tezel TH,Sohn JH,Kang SG,Cruz JM,Bora NS,Garen A和Kaplan HJ,Immunotherapy for choroidal neovascularization in a laser-induced mouse model simulating exudative(wet)macular degeneration,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),2003年;第100卷,第5期,第2679-2684页。
- [0331] 13.Krikun G,Hu Z,Osteen K,Bruner-Tran KL,Schatz F,Taylor HS,Toti P,Arcuri F,Konigsberg W,Garen A,Booth CJ和Lockwood CJ,The immunoconjugate“icon” targets aberrantly expressed endothelial tissue factor causing regression of endometriosis,《美国病理学杂志》(The American journal of pathology),2010年;第176卷,第2期,第1050-1056页。
- [0332] 14.Ferrara N,VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors,《自然评论:癌症》(Nature reviews Cancer),2002年;第2卷,第10期,第795-803页。

- [0333] 15.Klagsbrun M,Sullivan R,Smith S,Rybka R和Shing YE,Purification of endothelial cell growth factors by heparin affinity chromatography,《酶学方法》(Methods in enzymology),1987年;第147卷,第95-105页。
- [0334] 16.Afuwape AO,Kiriakidis S和Paleolog EM,The role of the angiogenic molecule VEGF in the pathogenesis of rheumatoid arthritis,《组织学和组织病理学》(Histology and histopathology),2002年;第17卷,第3期,第961-972页。
- [0335] 17.Fujimoto J,Sakaguchi H,Hirose R,Wen H和Tamaya T,Angiogenesis in endometriosis and angiogenic factors,《妇产科研究》(Gynecologic and obstetric investigation),1999年;第48卷增刊1,第14-20页。
- [0336] 18.Hu Z,Cheng J,Xu J,Ruf W和Lockwood CJ,Tissue factor is an angiogenic-specific receptor for factor VII-targeted immunotherapy and photodynamic therapy,《血管生成》(Angiogenesis),2016年。
- [0337] 19.Hu Z,Xu J,Cheng J,McMichael E,Yu L和Carson Iii WE,Targeting tissue factor as a novel therapeutic oncotarget for eradication of cancer stem cells isolated from tumor cell lines,tumor xenografts and patients of breast,lung and ovarian cancer,《肿瘤靶标》(Oncotarget),2016年。
- [0338] 20.Vidal SJ,Rodriguez-Bravo V,Galsky M,Cordon-Cardo C和Domingo-Domenech J,Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance,《癌基因》(Oncogene),2014年,第33卷,第36期,第4451-4463页。
- [0339] 21.Moncharmont C,Levy A,Gilormini M,Bertrand G,Chargari C,Alphonse G,Ardail D,Rodriguez-Lafrasse C和Magne N,Targeting a cornerstone of radiation resistance:cancer stem cell,《癌症通讯》(Cancer letters),2012年;第322卷,第2期,第139-147页。
- [0340] 22.Koch U,Krause M和Baumann M,Cancer stem cells at the crossroads of current cancer therapy failures--radiation oncology perspective,《癌生物学研究文辑》(Seminars in cancer biology),2010年;第20卷,第2期,第116-124页。
- [0341] 23.Tezel TH,Bodek E,Sonmez K,Kaliappan S,Kaplan HJ,Hu Z和Garen A,Targeting tissue factor for immunotherapy of choroidal neovascularization by intravitreal delivery of factor VII-Fc chimeric antibody,《眼部免疫学和炎症》(Ocul Immunol Inflamm),2007年;第15卷,第1期,第3-10页。
- [0342] 24.Hu Z和Garen A,Intratumoral injection of adenoviral vectors encoding tumor-targeted immunoconjugates for cancer immunotherapy,《美国国家科学院院刊》(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America),2000年;第97卷,第16期,第9221-9225页。
- [0343] 25.Hu Z和Li J,Natural killer cells are crucial for the efficacy of Icon (factor VII/human IgG1 Fc) immunotherapy in human tongue cancer(自然杀伤细胞对于Icon,《BMC免疫学》(BMC immunology),2010年;第11卷,第49页。
- [0344] 26.Hu Z,Rao B,Chen S和Duanmu J,Targeting tissue factor on tumour cells and angiogenic vascular endothelial cells by factor VII-targeted

verteporfin photodynamic therapy for breast cancer in vitro and in vivo in mice,《BMC癌症》(BMC cancer),2010年;第10卷,第235页。

[0345] 27.Hu Z、Rao B、Chen S和Duanmu J,Selective and effective killing of angiogenic vascular endothelial cells and cancer cells by targeting tissue factor using a factor VII-targeted photodynamic therapy for breast cancer,《乳腺癌研究与治疗》(Breast cancer research and treatment),2011年;第126卷,第3期,第589-600页。

[0346] 28.Kim,J.K.等人,Mapping the site on human IgG for binding of the MHC class I-related receptor,FcRn,《欧洲免疫学杂志》(European journal of immunology),第29卷,第2819-2825页,doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199909)29:09<60;2819::AID-IMMU2819>3.0.CO;2-6(1999年)。

[0347] 28.Stapleton,N.M.等人,Competition for FcRn-mediated transport gives rise to short half-life of human IgG3 and offers therapeutic potential,《自然通讯》(Nature communications),第2卷,第599页,doi:10.1038/ncomms1608(2011年)。

序列表

<110> 俄亥俄州创新基金会

<120> 与靶向组织因子的IgG3免疫缀合物有关的方法和组合物

<130> 10336-305W01

<160> 18

<170> PatentIn 3.5版本

<210> 1

<211> 1285

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

```

aagcttgaat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg 60
cttcagggct gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagcccacgg cgtcctgcac 120
ggcgccggcg cgccaacgcg ttcctggagg agctgcggcc gggctccctg gagagggagt 180
gcaaggagga gcagtgtctc ttcgaggagg cccgggagat cttcaaggac gcggagagga 240
cgaagctgtt ctggatttct tacagtgatg gtgaccagtg tgcctcaagt ccatgccaga 300
atgggggctc ctgcaaggac cagctccagt cctatatctg cttctgcctc cctgccttcg 360
agggccggaa ctgtgagacg cacaaggatg accagctgat ctgtgtgaac gagaacggcg 420
gctgtgagca gtactgcagt gaccacacgg gcaccaagcg ctctgttcgg tgccacgagg 480
ggtactctct gctggcagac ggggtgtcct gcacaccac agttgaatat ccatgtggaa 540
aaatacctat tctagaaaaa agaaatgcc aagagcccca agggcgagga tccgacacac 600
ctcccccgctg cccaaggtgc ccagcacctg aactcctggg aggaccgtca gtcttcctct 660
tcccccaaaa acccaaggat acccttatga tttcccgga ccctgaggtc acgtgcgtgg 720
tggtggacgt gagccacgaa gaccccgagg tccagttcaa gtggtacgtg gacggcgtgg 780
aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg ttccgtgtgg 840
tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac aagtgaagg 900
tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaaacc aaaggacagc 960
cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg 1020
tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg gagggggaga 1080
gcagcgggca gccggagaa aactacaaca ccacgcctcc catgctggac tccgacggct 1140
ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacatct 1200
tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccgctt cacgcagaag agcctctccc 1260
tgtctccggg taaatgagcg gccgc 1285

```

<210> 2

<211> 419

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

```

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

```

275	280	285
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
290	295	300
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
305	310	315
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
325	330	335
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
340	345	350
Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro		
355	360	365
Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
370	375	380
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met		
385	390	395
His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
405	410	415

Pro Gly Lys

<210> 3

<211> 2051

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

```

aagctttgca gagatttcat catggtctcc caggccctca ggctcctctg ctttctgctt 60
gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc gtaaccagg aggaagccca cggcgctcctg 120
caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttcctg gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg 180
gagtgcgaagg aggagcagtg ctcttcgag gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag 240
aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt gatggtgacc agtgtgcctc aagtccatgc 300
cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc cagtctata tctgcttctg cctccctgcc 360
ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac 420
ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac acgggcacca agcgtcctg tcggtgccac 480
gaggggtact ctctgctggc agacggggtg tctgcacac ccacagttga atatccatgt 540
ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat gccagcaagc cccaagggcg aattgtgggg 600
ggcaaggtgt gccccaaagg ggagtgtcca tggcaggtcc tgttggttgt gaatggagct 660
cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc atctgggtgg tctccgcggc cactgttttc 720
gacaaaatca agaactggag gaacctgatc gcggtgctcg gggagcacga cctcagcgag 780
cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc 840

```

ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg ctccgcctgc accagcccgt ggtcctcact 900
 gaccatgtgg tgccctctg cctgcccga cggacgttct ctgagaggac gctggccttc 960
 gtgcgcttct cattgggtcag cggctggggc cagctgctgg accgtggcgc cacggccctg 1020
 gagtcatgg tcctcaacgt gccccggctg atgaccagg actgcctgca gcagtcacgg 1080
 aaggtgggag actccccaaa tatcacggag tacatgttct gtgccggcta ctcgatggc 1140
 agcaaggact cctgcgcggg ggacagtgga ggcccacatg ccaccacta ccggggcacg 1200
 tggtagctga cgggcatcgt cagctggggc cagggtgctg caaccgtggg ccactttggg 1260
 gtgtacacca ggggtctcca gtacatcgag tggctgcaaa agtcatgctg ctgagagcca 1320
 cgcccaggag tcctcctgctg agccccattt cccggatccg acacacctcc cccgtgcccc 1380
 aggtgcccag cacctgaact cctggggagga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacct 1440
 aaggataccc ttatgatttc ccggaccctt gaggtcacgt gcgtgggtgg ggacgtgagc 1500
 cacgaagacc ccgaggtcca gttcaagtgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1560
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgttcc gtgtgggtcag cgtcctcacc 1620
 gtctgcacc aggactggct gaacggcaag gactacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1680
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag 1740
 gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1800
 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg 1860
 gagaacaact acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg 1980
 atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2040
 tgagcggccg c 2051

<210> 4

<211> 673

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

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

					85					90					95				
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro				
					100					105					110				
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile				
					115					120					125				
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr				
					130					135					140				
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala				
145					150					155					160				
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile				
					165					170					175				
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val				
					180					185					190				
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu				
					195					200					205				
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile				
					210					215					220				
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg				
225					230					235					240				
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly				
					245					250					255				
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr				
					260					265					270				
Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln				
					275					280					285				
Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg				
290					295					300									
Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser				
305					310					315					320				
Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met				
					325					330					335				
Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser				
					340					345					350				
Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala				
					355					360					365				
Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly				
370					375					380									
Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val				
385					390					395					400				

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
	405	410 415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
	420	425 430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Ser Asp Thr		
	435	440 445
Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
	450	455 460
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
465	470	475 480
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
	485	490 495
Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
	500	505 510
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val		
	515	520 525
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
	530	535 540
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
545	550	555 560
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	565	570 575
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	580	585 590
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	595	600 605
Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu		
	610	615 620
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
625	630	635 640
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	645	650 655
Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	660	665 670

Lys

<210> 5

<211> 1286

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

```

aagcttgaat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg 60
cttcagggct gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagcccacgg cgtcctgcac 120
cggcgccggc gcgccaacgc gttcctggag gagctgcggc cgggctccct ggagagggag 180
tgcaaggagg agcagtgtct cttcgaggag gcccgggaga tcttcaagga cgcggagagg 240
acgaagctgt tctggatttc ttacagtgat ggtgaccagt gtgcctcaag tccatgccag 300
aatgggggct cctgcaagga ccagctccag tcctatatct gcttctgcct ccctgccttc 360
gagggccgga actgtgagac gcacaaggat gaccagctga tctgtgtgaa cgagaacggc 420
ggctgtgagc agtactgcag tgaccacacg ggcaccaagc gctcctgtcg gtgccacgag 480
gggtactctc tgctggcaga cggggtgtcc tgcacacca cagttgaata tccatgtgga 540
aaaataccta ttctagaaaa aagaaatgcc agcaagcccc aagggcgagg atccgacaca 600
cctcccccggt gcccaggtg cccagcacct gaactcctgg gaggaccgtc agtcttcttc 660
ttcccccaa aaccaagga tacccttatg atttcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 720
gtggtggacg tgagccacga agaccccgag gtccagttca agtggtacgt ggacggcgtg 780
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gttccgtgtg 840
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaacg gcaaggagta caagtgaag 900
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaaac caaaggacag 960
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1020
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt ggagtgggag 1080
agcagcgggc agccggagaa caactacaac accacgcctc ccatgctgga ctccgacggc 1140
tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacatc 1200
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccgct tcacacagaa gaggctctcc 1260
ctgtctccgg gtaaattgagc ggccgc 1286

```

<210> 6

<211> 419

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

```

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

```

50	55	60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile		
65	70	75
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly		
85	90	95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro		
100	105	110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile		
115	120	125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr		
130	135	140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala		
145	150	155
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile		
165	170	175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Gly Ser		
180	185	190
Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
195	200	205
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
210	215	220
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
225	230	235
Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
245	250	255
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe		
260	265	270
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
275	280	285
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
290	295	300
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
305	310	315
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser		
325	330	335
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
340	345	350
Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro		
355	360	365

Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 370 375 380
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met
 385 390 395 400
 His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 405 410 415

Pro Gly Lys

<210> 7

<211> 2051

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

```

aagctttgca gagatttcat catggtctcc caggccctca ggctcctctg ctttctgctt 60
gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc gtaaccagg aggaagccca cggcgtcctg 120
caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttctctg gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg 180
gagtgcgaagg aggagcagtg ctcttctgag gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag 240
aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt gatggtgacc agtgtgcctc aagtccatgc 300
cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc cagtctata tctgcttctg cctccctgcc 360
ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac 420
ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac acgggcacca agcgtcctg tcggtgccac 480
gaggggtact ctctgctggc agacggggtg tcctgcacac ccacagttga atatccatgt 540
ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat gccagcaagc cccaaggcg aattgtgggg 600
ggcaagggtg gccccaaagg ggagtgtcca tggcaggtcc tgttggttgt gaatggagct 660
cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc atctgggtgg tctccgcggc cactgtttc 720
gacaaaatca agaactggag gaacctgatc gcggtgctcg gggagcacga cctcagcgag 780
cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc 840
ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg ctccgcctgc accagcccgt ggtcctcact 900
gaccatgtgg tgccccctctg cctgcccga cggacgttct ctgagaggac gctggccttc 960
gtgcgcttct cattggtcag cggctggggc cagctgctgg accgtggcg caggccctg 1020
gagctcatgg tcctcaacgt gccccggtg atgaccagg actgcctgca gcagtcacgg 1080
aaggtgggag actccccaaa taccacggag tacatgttct gtgccggcta ctcgatggc 1140
agcaaggact cctgcgcggg ggacagtgga ggccacatg ccaccacta ccggggcacg 1200
tggtacctga cgggcatcgt cagctggggc cagggtgctg caaccgtggg ccactttggg 1260
gtgtacacca gggctctcca gtacatcgag tggtgcaaa agctcatgcg ctgagagcca 1320
cgcccaggag tcctcctgcg agccccattt cccgatccg acacacctc cccgtgcca 1380
aggtgcccag cacctgaact cctgggagga ccgtcagttt tcctcttccc cccaaaacc 1440
aaggataccc ttatgatttc ccggaccct gaggtcacgt gcgtggttgt ggacgtgagc 1500

```

cacgaagacc ccgaggtcca gttcaagtgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1560
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgttcc gtgtggtcag cgtcctcacc 1620
 gtcctgcacc aggactggct gaacggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1680
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gacagccccg agaaccacag 1740
 gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1800
 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcag cgggcagccg 1860
 gagaacaact acaacaccac gcctcccatg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acatcttctc atgctccgtg 1980
 atgcatgagg ctctgcacaa ccgcttcaca cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2040
 tgagcggccg c 2051

<210> 8

<211> 673

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

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

Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	180	185	190
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	195	200	205
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	210	215	220
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	225	230	235
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	245	250	255
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	260	265	270
Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	275	280	285
Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	290	295	300
Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	305	310	315
Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	325	330	335
Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	340	345	350
Arg	Lys	Val	Gly	Asp	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Glu	Tyr	Met	Phe	Cys	Ala	355	360	365
Gly	Tyr	Ser	Asp	Gly	Ser	Lys	Asp	Ser	Cys	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	370	375	380
Pro	His	Ala	Thr	His	Tyr	Arg	Gly	Thr	Trp	Tyr	Leu	Thr	Gly	Ile	Val	385	390	395
Ser	Trp	Gly	Gln	Gly	Cys	Ala	Thr	Val	Gly	His	Phe	Gly	Val	Tyr	Thr	405	410	415
Arg	Val	Ser	Gln	Tyr	Ile	Glu	Trp	Leu	Gln	Lys	Leu	Met	Arg	Ser	Glu	420	425	430
Pro	Arg	Pro	Gly	Val	Leu	Leu	Arg	Ala	Pro	Phe	Pro	Gly	Ser	Asp	Thr	435	440	445
Pro	Pro	Pro	Cys	Pro	Arg	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	450	455	460
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	465	470	475
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp			

485	490	495
Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
500	505	510
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Phe Arg Val		
515	520	525
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
530	535	540
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
545	550	555
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
565	570	575
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
580	585	590
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
595	600	605
Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro Pro Met Leu		
610	615	620
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
625	630	635
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
645	650	655
Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
660	665	670

Lys

<210> 9

<211> 2054

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

```

aagctttgca gagatttcat catggtctec caggccctca ggctcctctg ctttctgctt 60
gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc gtaaccagg aggaagccca cggcgtcctg 120
caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttctctg gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg 180
gagtgcaagg aggagcagtg ctctttcgag gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag 240
aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt gatggtgacc agtgtgcctc aagtccatgc 300
cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc cagtcctata tctgcttctg cctccctgcc 360
ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac 420
ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac acgggcacca agcgtcctg tcggtgccac 480

```

gaggggtact ctctgctggc agacgggggtg tcctgcacac ccacagttga atatccatgt 540
 ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat gccagcaagc cccaagggcg aattgtgggg 600
 ggcaaggtgt gccccaaagg ggagtgtcca tggcaggtcc tgttggttgg gaatggagct 660
 cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc atctgggtgg tctccgcggc ccactgtttc 720
 gacaaaatca agaactggag gaacctgatc gcggtgctcg gggagcacga cctcagcgag 780
 cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc 840
 ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg ctccgcctgc accagcccgt ggtcctcact 900
 gaccatgtgg tgcccctctg cctgcccga cggacgttct ctgagaggac gctggccttc 960
 gtgcgcttct cattggtcag cggctggggc cagctgctgg accgtggcg cagggccctg 1020
 gagctcatgg tcctcaacgt gccccggtg atgaccagg actgcctgca gcagtcacgg 1080
 aaggtgggag actccccaaa tatcacggag tacatgttct gtccggcta ctcgatggc 1140
 agcaaggact cctgcgcggg ggacagtga ggcccacatg ccaccacta ccggggcacg 1200
 tggtaacctga cgggcatcgt cagctggggc cagggtctgc caaccgtggg ccactttggg 1260
 gtgtacacca gggctctcca gtacatcgag tggctgcaa agctcatgcg ctcagagcca 1320
 cgcccaggag tcctcctgcg agccccattt cccgatccg acaaaactca cacatgcca 1380
 ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc 1440
 aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc 1500
 cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc 1560
 aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc 1620
 gtctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc 1680
 ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1740
 gtgtacgccc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1800
 ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1860
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1980
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2040
 tgataagcgg ccgc 2054

<210> 10

<211> 673

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 10

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln

1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val

20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro

35					40					45						
Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	
50					55					60						
Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly	
85					90					95						
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro	
100					105					110						
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile	
115					120					125						
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr	
130					135					140						
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala	
145					150					155					160	
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	
165					170					175						
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val	
180					185					190						
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu	
195					200					205						
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile	
210					215					220						
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg	
225					230					235					240	
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly	
245					250					255						
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr	
260					265					270						
Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln	
275					280					285						
Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg	
290					295					300						
Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser	
305					310					315					320	
Gly	Trp	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Arg	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Glu	Leu	Met	
325					330					335						
Val	Leu	Asn	Val	Pro	Arg	Leu	Met	Thr	Gln	Asp	Cys	Leu	Gln	Gln	Ser	
340					345					350						

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Ala Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Ser Asp Lys		
435	440	445
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
450	455	460
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
465	470	475
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		
485	490	495
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
500	505	510
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
515	520	525
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
530	535	540
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
545	550	555
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Ala		
565	570	575
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
580	585	590
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
595	600	605
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
610	615	620
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
625	630	635
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
645	650	655
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		

660	665	670
Lys		
<210> 11		
<211> 2054		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 11		
aagcttttgca gagatttcat catggtctcc caggccctca ggctcctctg ctttctgctt	60	
gggcttcagg gctgcctggc tgcagtcttc gtaaccagg aggaagccca cggcgctcctg	120	
caccggcgcc ggcgcgccaa cgcgttctctg gaggagctgc ggccgggctc cctggagagg	180	
gagtgcgaagg aggagcagtg ctctctcgag gaggcccggg agatcttcaa ggacgcggag	240	
aggacgaagc tgttctggat ttcttacagt gatggtgacc agtgtgcctc aagtccatgc	300	
cagaatgggg gctcctgcaa ggaccagctc cagtctata tctgcttctg cctccctgcc	360	
ttcgagggcc ggaactgtga gacgcacaag gatgaccagc tgatctgtgt gaacgagaac	420	
ggcggctgtg agcagtactg cagtgaccac acgggcacca agcgtcctg tcggtgccac	480	
gaggggtact ctctgctggc agacggggtg tcctgcacac ccacagttga atatccatgt	540	
ggaaaaatac ctattctaga aaaaagaaat gccagcaagc cccaaggcg aattgtgggg	600	
ggcaagggtg gccccaaagg ggagtgtcca tggcaggtcc tgttggttgt gaatggagct	660	
cagttgtgtg gggggaccct gatcaacacc atctgggtgg tctccgcggc ccactgtttc	720	
gacaaaatca agaactggag gaacctgac gcggtgctcg gggagcacga cctcagcgag	780	
cacgacgggg atgagcagag ccggcgggtg gcgcaggtca tcatccccag cacgtacgtc	840	
ccgggcacca ccaaccacga catcgcgctg ctccgcctgc accagcccgt ggtcctcact	900	
gaccatgtgg tgccccctg cctgcccga cggacgttct ctgagaggac gctggccttc	960	
gtgcgcttct cattggtcag cggctggggc cagctgctgg accgtggcgc cacggccctg	1020	
gagctcatgg tcctcaacgt gccccggtg atgaccagg actgcctgca gcagtcacgg	1080	
aaggtgggag actccccaaa taccacggag tacatgttct gtgccggcta ctcgatggc	1140	
agcaaggact cctgcgcggg ggacagtgga ggcccacatg ccaccacta ccggggcacg	1200	
tggtacctga cgggcatcgt cagctggggc cagggtgctg caaccgtggg ccactttggg	1260	
gtgtacacca gggctctcca gtacatcgag tggctgcaaa agctcatgcg ctcagagcca	1320	
cgcccaggag tcctcctgag agccccattt cccggatccg aaaaaactca cacatgcca	1380	
ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaacc	1440	
aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct gaggtcacat gcgtggttgt ggacgtgagc	1500	
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc	1560	
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc	1620	
gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc	1680	
ctcccagccc ccatcgcaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag	1740	
gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc	1800	

ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1860
 gagaacaact acaagaccac gcctcccgctg ctggactccg acggctcctt cttcctctac 1920
 agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg 1980
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 2040
 tgataagcgg ccgc 2054

<210> 12

<211> 673

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

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

210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		240
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		320
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Ala Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		400
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Ser Asp Lys		
435	440	445
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro		
450	455	460
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser		
465	470	475
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp		480
485	490	495
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn		
500	505	510
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
515	520	525

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
530	535	540
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Ala Lys		
545	550	555 560
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
	565	570 575
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
	580	585 590
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
	595	600 605
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
	610	615 620
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
625	630	635 640
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
	645	650 655
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
	660	665 670

Lys

<210> 13

<211> 1307

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

```

aagcttgaat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg 60
cttcagggct gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagcccacgg cgtcctgcac 120
cggcgccggc gcgccaacgc gttcctggag gagctgcggc cgggctccct ggagagggag 180
tgcaaggagg agcagtgtct cttcgaggag gcccgggaga tcttcaagga cgcgagagg 240
acgaagctgt tctggatttc ttacagtgat ggtgaccagt gtgcctcaag tccatgccag 300
aatgggggct cctgcaagga ccagctccag tectatatct gcttctgcct ccctgccttc 360
gagggccgga actgtgagac gcacaaggat gaccagctga tctgtgtgaa cgagaacggc 420
ggctgtgagc agtactgcag tgaccacacg ggcaccaagc gctcctgtcg gtgccacgag 480
gggtactctc tgctggcaga cggggtgtcc tgcacacca cagttgaata tccatgtgga 540
aaaataccta ttctagaaaa aagaaatgcc agcaagcccc aagggcgagg atccgcagag 600
cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg 660
ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccgacc 720
cctgagggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 780

```

tgggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagacaa agccgcggga ggagcagtag 840
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 900
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 960
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 1020
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctgggtca aaggcttcta tcccagcgac 1080
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc 1140
 gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 1200
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcattctcc gtgatgatg aggctctgca caaccactac 1260
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aatgataag cggccgc 1307

<210> 14

<211> 425

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

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

180	185	190
Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp	Lys Thr His Thr Cys Pro	Pro Cys Pro
195	200	205
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	Pro Ser Val Phe Leu Phe	Pro Pro Lys
210	215	220
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	Ser Arg Thr Pro Glu Val	Thr Cys Val
225	230	235
Val Val Asp Val Ser His Glu	Asp Pro Glu Val Lys Phe	Asn Trp Tyr
245	250	255
Val Asp Gly Val Glu Val His	Asn Ala Lys Thr Lys Pro	Arg Glu Glu
260	265	270
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg	Val Val Ser Val Leu Thr	Val Leu His
275	280	285
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	Glu Tyr Lys Cys Lys Val	Ser Asn Lys
290	295	300
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu	Lys Thr Ile Ser Lys Ala	Lys Gly Gln
305	310	315
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr	Thr Leu Pro Pro Ser Arg	Asp Glu Leu
325	330	335
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu	Thr Cys Leu Val Lys Gly	Phe Tyr Pro
340	345	350
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro	Glu Asn Asn
355	360	365
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val	Leu Asp Ser Asp Gly Ser	Phe Phe Leu
370	375	380
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp	Lys Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val
385	390	395
Phe Ser Cys Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn His	Tyr Thr Gln
405	410	415
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro	Gly Lys	
420	425	

<210> 15

<211> 1289

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

aagcttgaat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg 60

cttcagggct gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagcccacgg cgtcctgcac 120
 cggcgccggc gcgccaacgc gttcctggag gagctgcggc cgggctccct ggagagggag 180
 tgcaaggagg agcagtgtc cttcaggagg gcccgggaga tcttcaagga cgcggagagg 240
 acgaagctgt tctggatttc ttacagtgat ggtgaccagt gtgcctcaag tccatgccag 300
 aatgggggct cctgcaagga ccagctccag tcctatatct gcttctgcct ccctgccttc 360
 gagggccgga actgtgagac gcacaaggat gaccagctga tctgtgtgaa cgagaacggc 420
 ggctgtgagc agtactgcag tgaccacacg ggcaccaagc gctcctgtcg gtgccacgag 480
 gggctactctc tgctggcaga cggggtgtcc tgcacacca cagttgaata tccatgtgga 540
 aaaataccta ttctagaaaa aagaaatgcc agcaagcccc aaggcgagg atccgacaaa 600
 actcacacat gcccaccgtg ccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 660
 ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga ccctgaggt cacatgcgtg 720
 gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagtcca actggtacgt ggacggcgtg 780
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 840
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 900
 gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 960
 ccccgagaac cacaggtgta cgccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1020
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1080
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc ccgtgctgga ctccgacggc 1140
 tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1200
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1260
 ctgtctccgg gtaaatagata agcggccgc 1289

<210> 16

<211> 419

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

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

					85					90					95				
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro				
					100					105					110				
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile				
					115					120					125				
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr				
					130					135					140				
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala				
145					150					155					160				
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile				
					165					170					175				
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Gly	Ser				
					180					185					190				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly				
					195					200					205				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met				
210					215					220									
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His				
225					230					235					240				
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val				
					245					250					255				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr				
					260					265					270				
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly				
					275					280					285				
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile				
290					295					300									
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val				
305					310					315					320				
Tyr	Ala	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser				
					325					330					335				
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu				
					340					345					350				
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro				
					355					360					365				
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val				
370					375					380									
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met				
385					390					395					400				

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 405 410 415

Pro Gly Lys

<210> 17

<211> 1289

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 17

```

aagcttggat tcgccaccat ggtctcccag gccctcaggc tcctctgcct tctgcttggg 60
cttcagggtc gcctggctgc agtcttcgta acccaggagg aagcccacgg cgtcctgcac 120
cggcgccggc gcgccaacgc gttcctggag gagctgcggc cgggctccct ggagagggag 180
tgcaaggagg agcagtgtc cttcgaggag gcccgggaga tcttcaagga cgcggagagg 240
acgaagctgt tctggatttc ttacagtgat ggtgaccagt gtgcctcaag tccatgccag 300
aatgggggct cctgcaagga ccagctccag tcctatatct gcttctgcct ccctgccttc 360
gagggccgga actgtgagac gcacaaggat gaccagctga tctgtgtgaa cgagaacggc 420
ggctgtgagc agtactgcag tgaccacacg ggcaccaagc gtcctgtcg gtgccacgag 480
gggtactctc tgctggcaga cggggtgtcc tgcacacca cagttgaata tccatgtgga 540
aaaataccta ttctagaaaa aagaaatgcc agcaagcccc aagggcgagg atccgacaaa 600
actcacacat gccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 660
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 720
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 780
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 840
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 900
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gcgaaaacca tctccaaagc caaagggcag 960
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg aggagatgac caagaaccag 1020
gtcagcctga cctgcctggt caaaggttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1080
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgctc cctgtctgga ctccgacggc 1140
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1200
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1260
ctgtctccgg gtaaatgata agcggccgc 1289

```

<210> 18

<211> 418

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Val	Phe	Val	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val
			20					25					30		
Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro
		35					40						45		
Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu
		50				55					60				
Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile
65					70					75					80
Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro
			100					105					110		
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile
			115					120					125		
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr
			130				135					140			
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala
145					150					155					160
Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile	Pro
				165					170					175	
Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Gly	Ser	Asp
			180					185						190	
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly
			195					200					205		
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile
			210				215					220			
Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu
225					230					235					240
Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His
				245						250				255	
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg
			260					265						270	
Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys
			275					280						285	
Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Ala
			290				295					300			
Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr

305					310					315					320
Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu
					325					330					335
Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp
					340					345					350
Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val
					355					360					365
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp
					370					375					380
Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His
385					390					395					400
Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro
					405					410					415
Gly	Lys														

a. 示意图

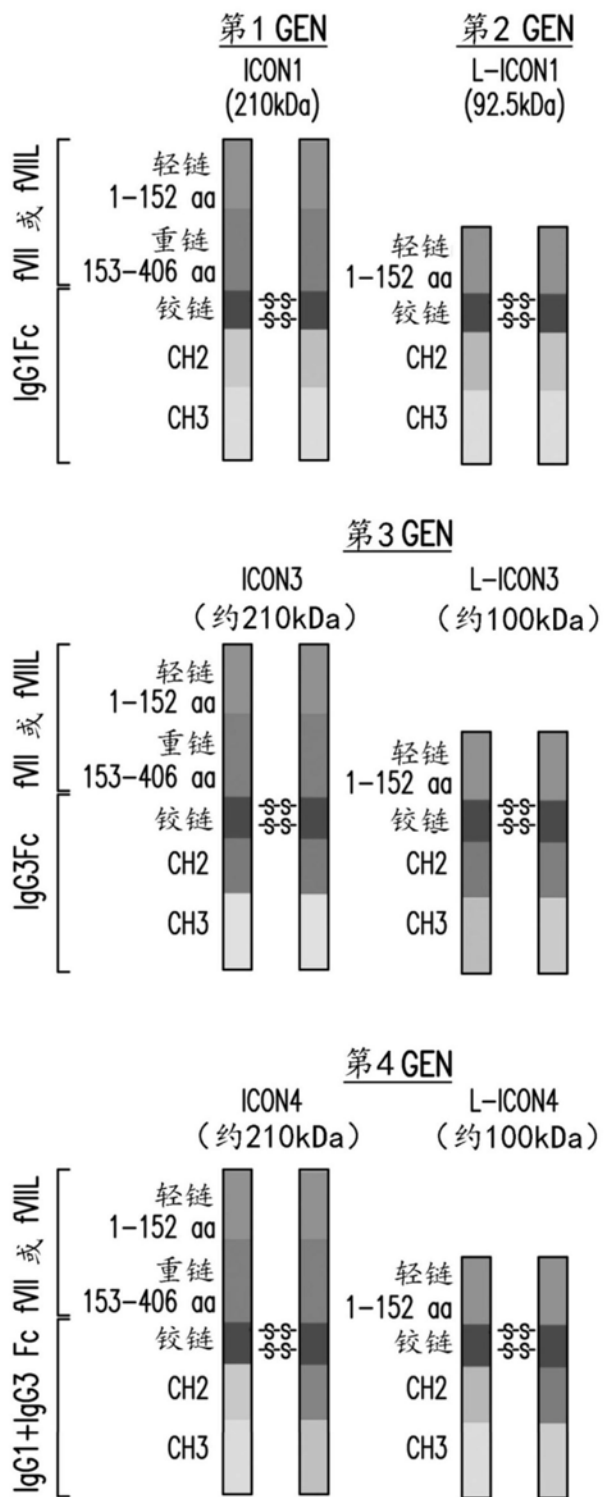
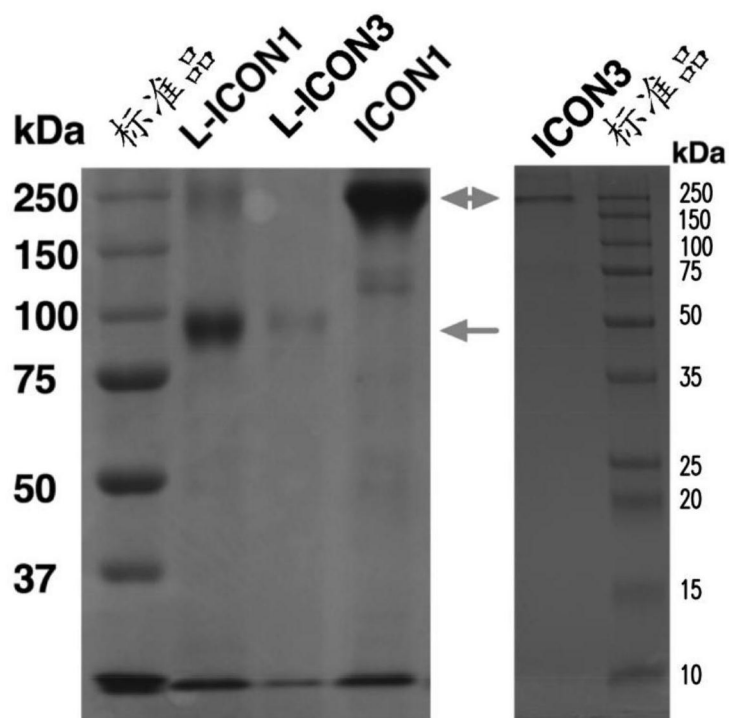


图1A

b. SDS-PAGE



c. 荧光-WB

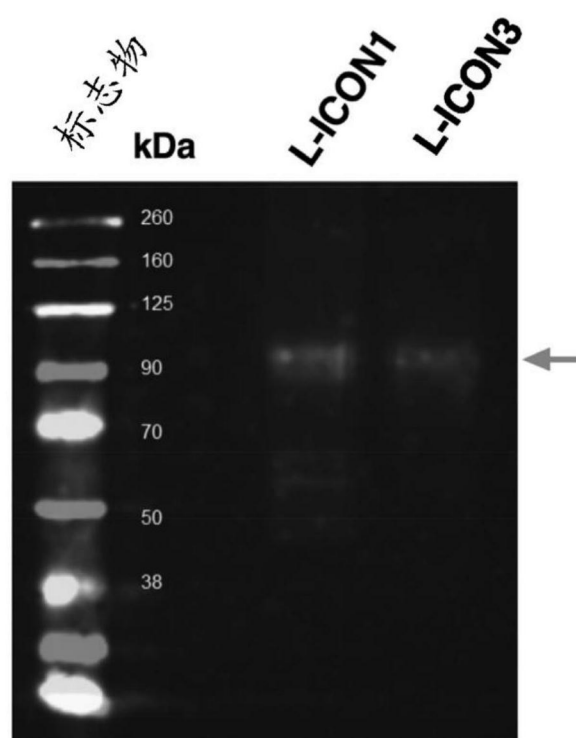


图1B-C

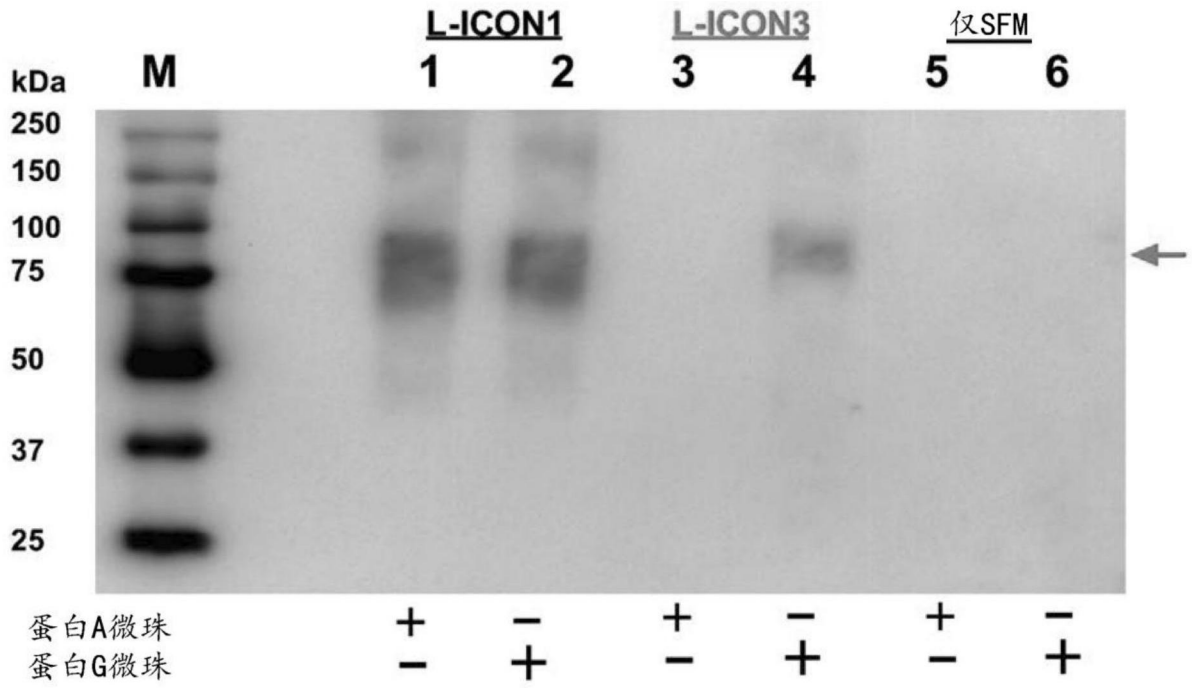


图2

L-ICON3 相比于 L-ICON1

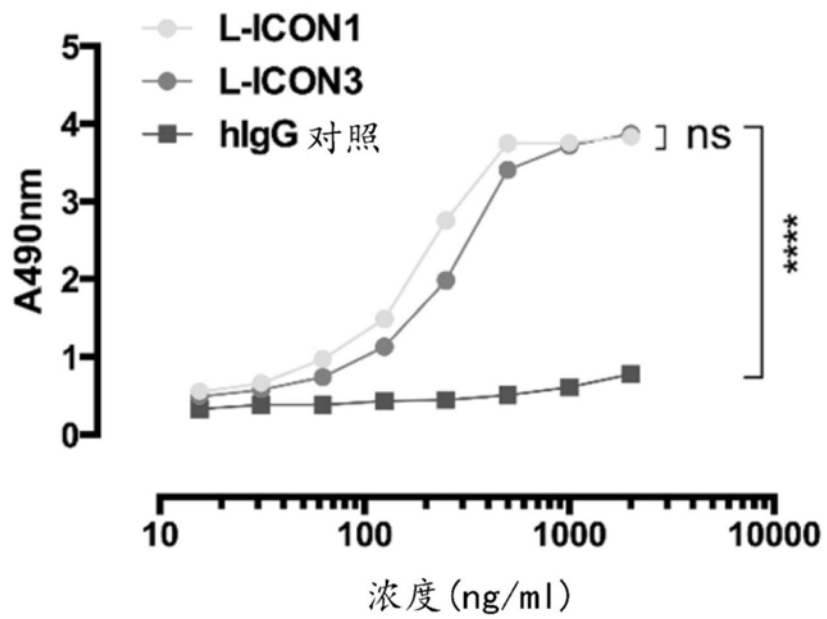


图3A

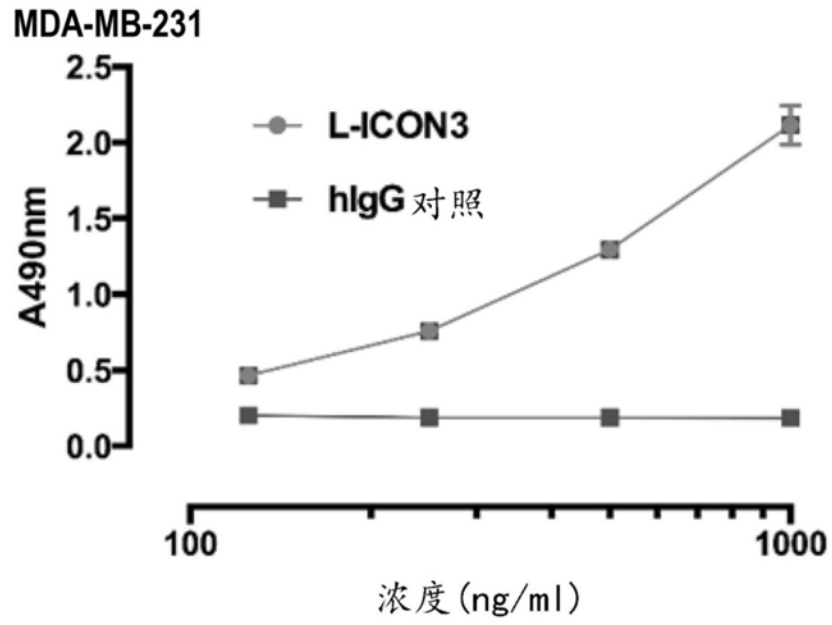


图3B

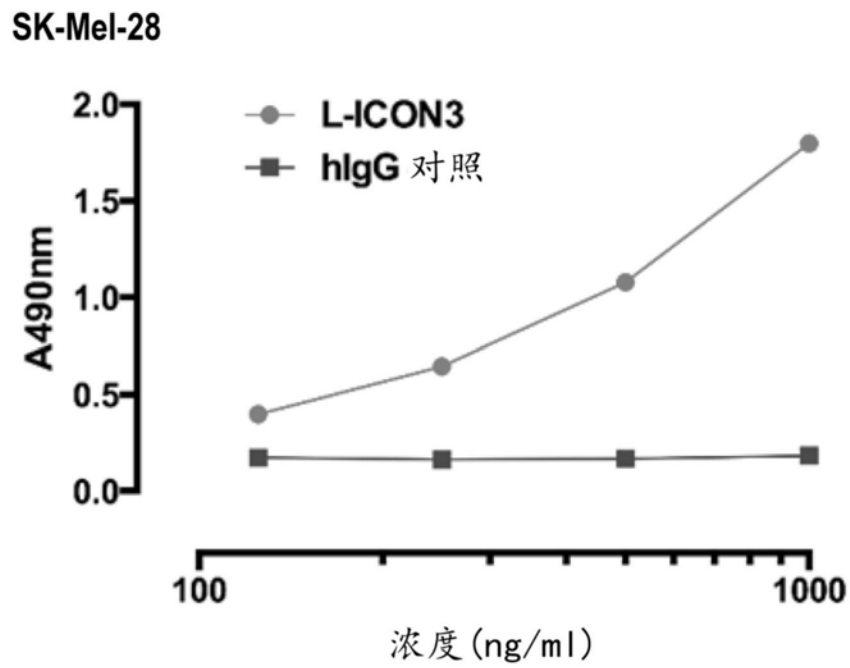


图3C

OVCAR5

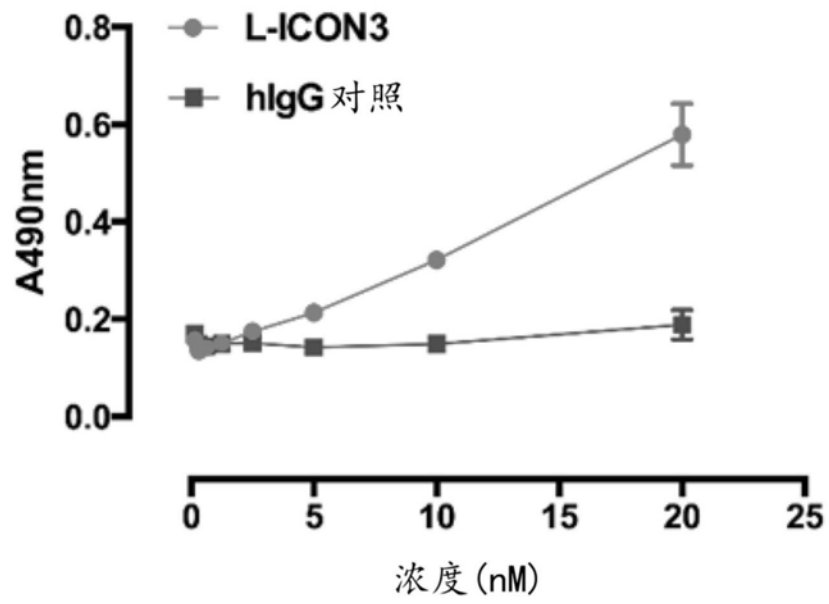


图3D

4T1

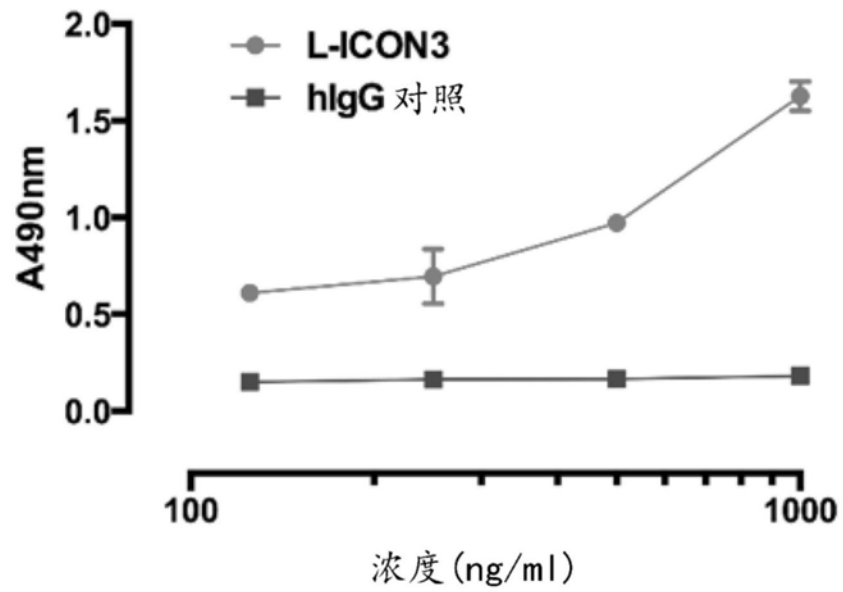


图3E

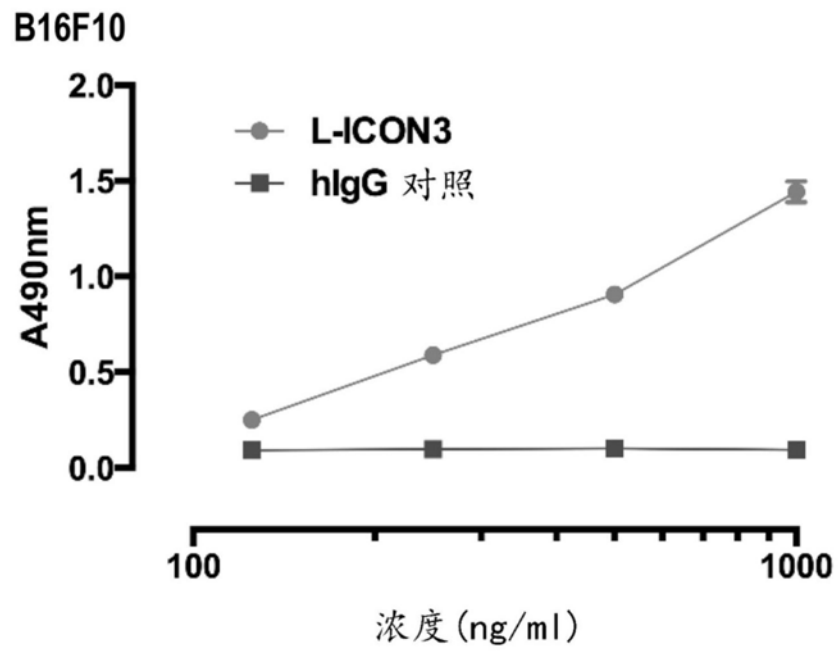


图3F

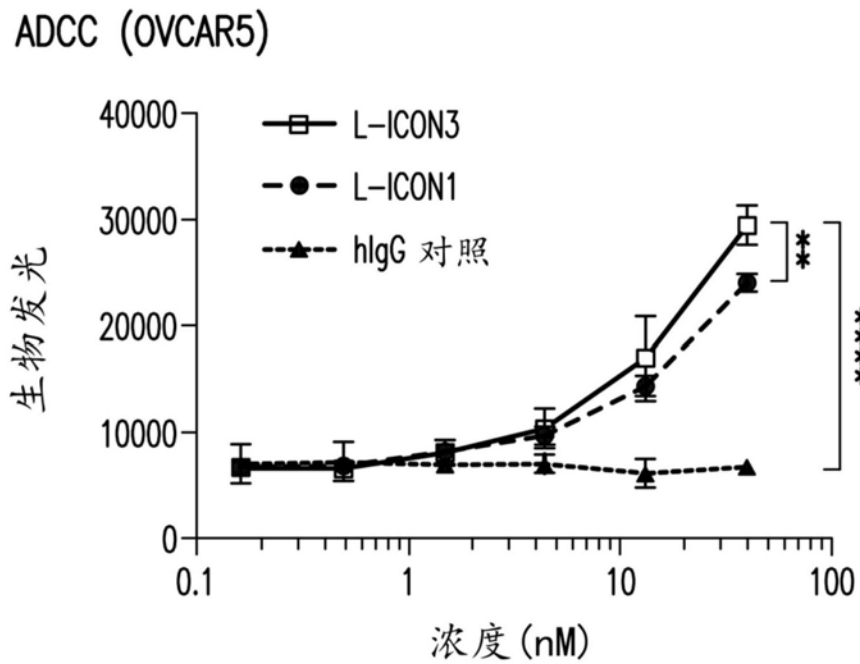


图4A

CDC (MDA-MB-231)

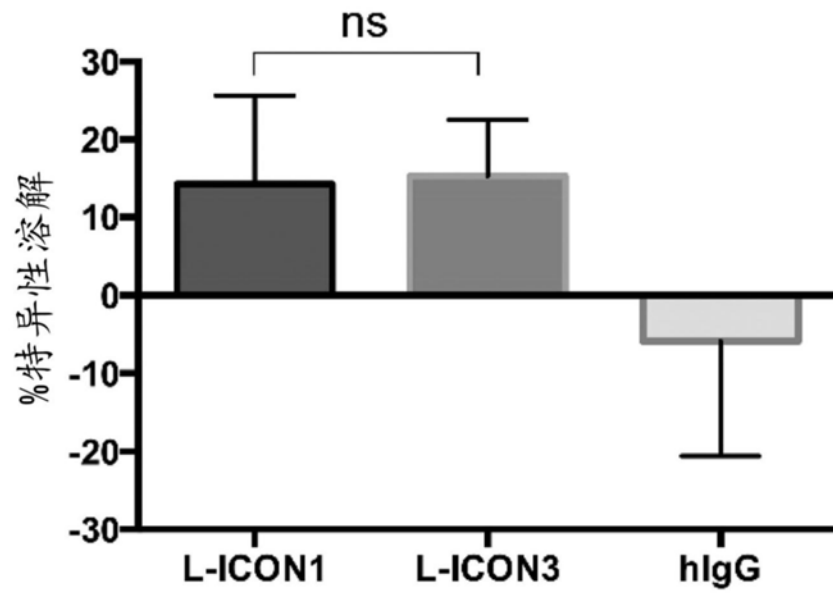


图4B

L-ICON1相比于ICON在体外对癌细胞具有更强的结合力

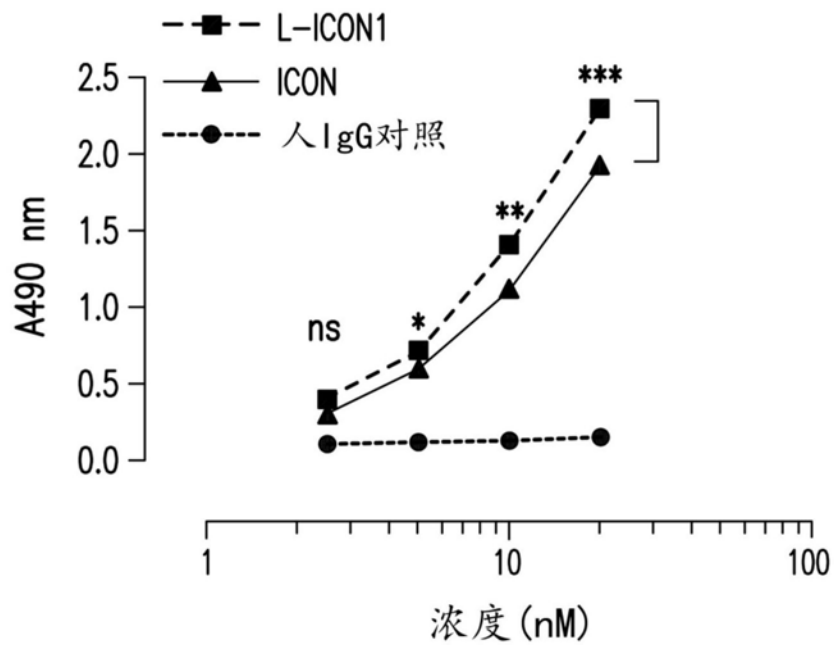


图5A

L-ICON1相比于ICON在体内更有效

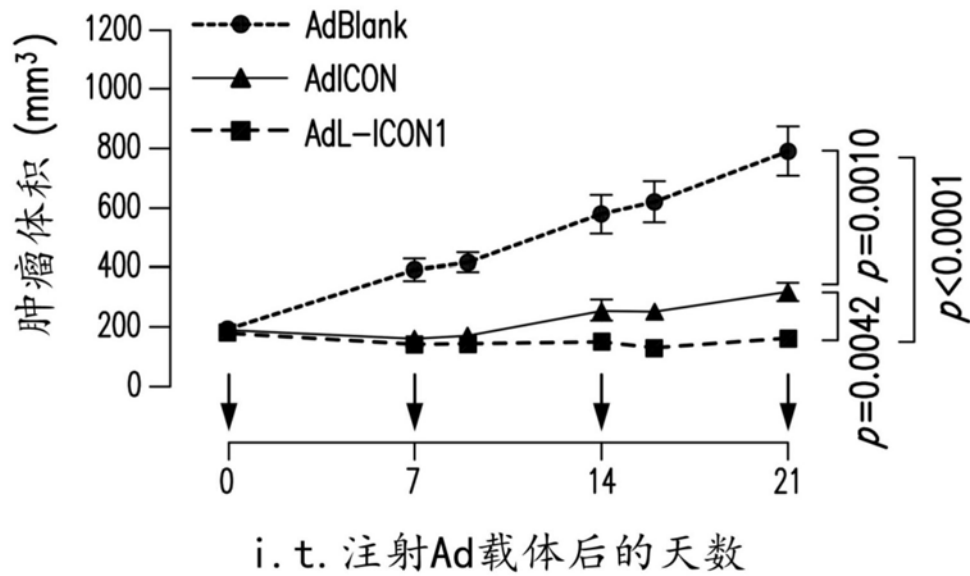


图5B

L-ICON3结合于鼠TNBC 4T1

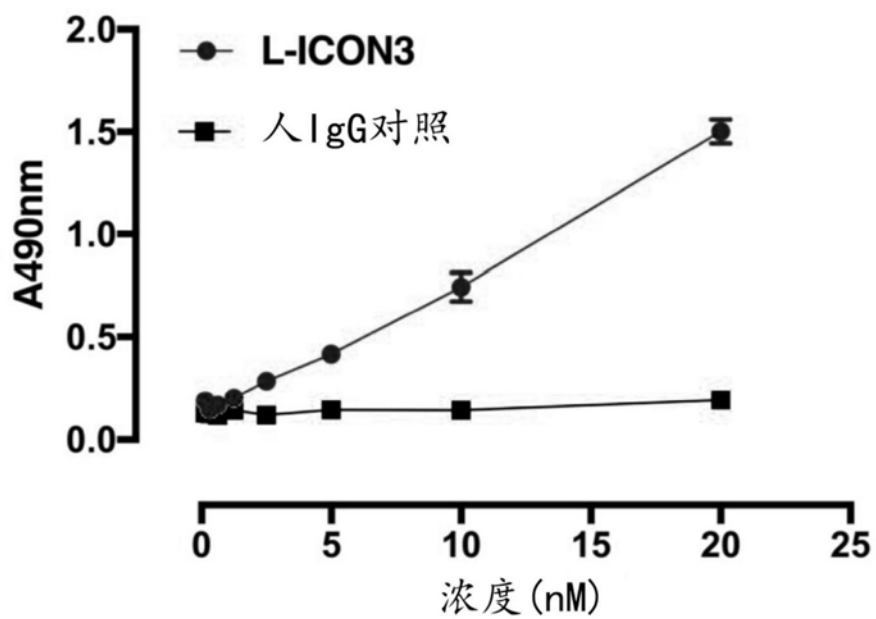


图6A

治疗功效

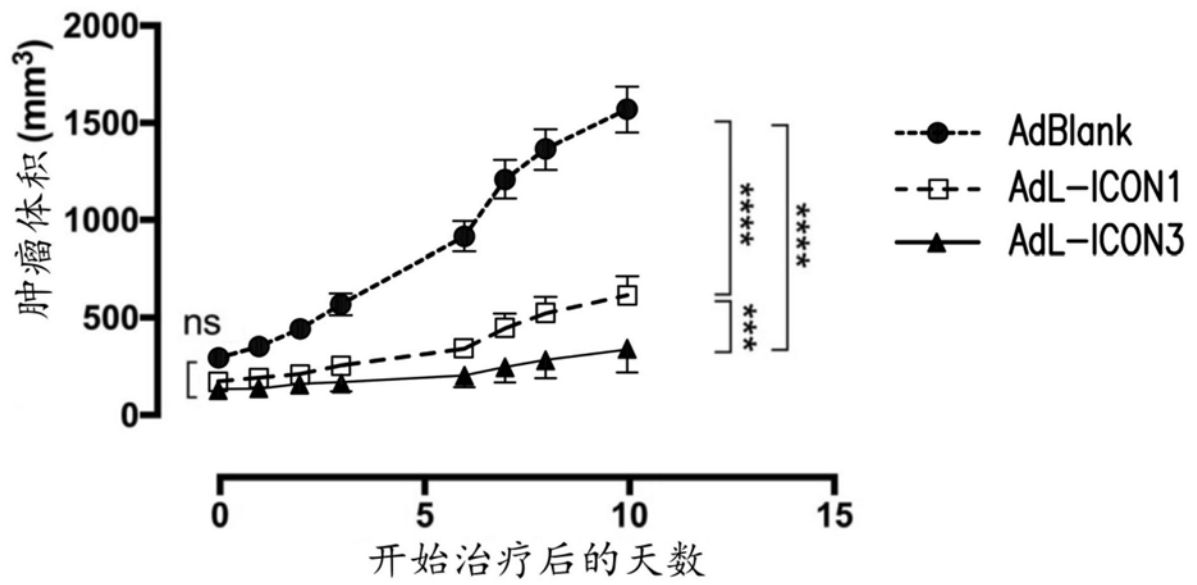


图6B

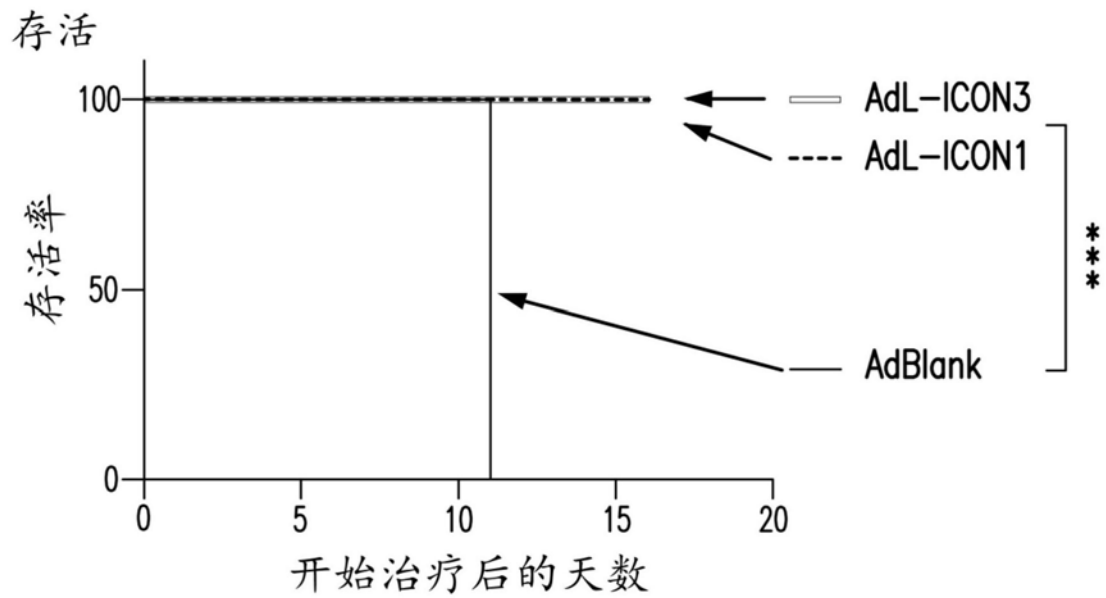


图6C

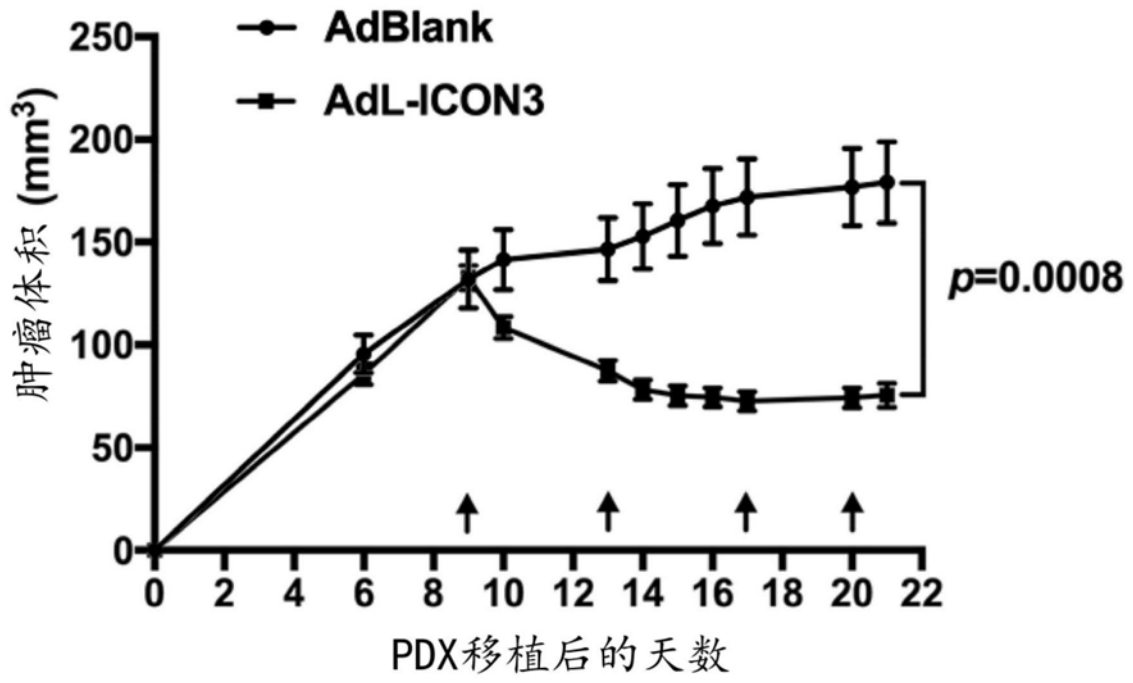


图7

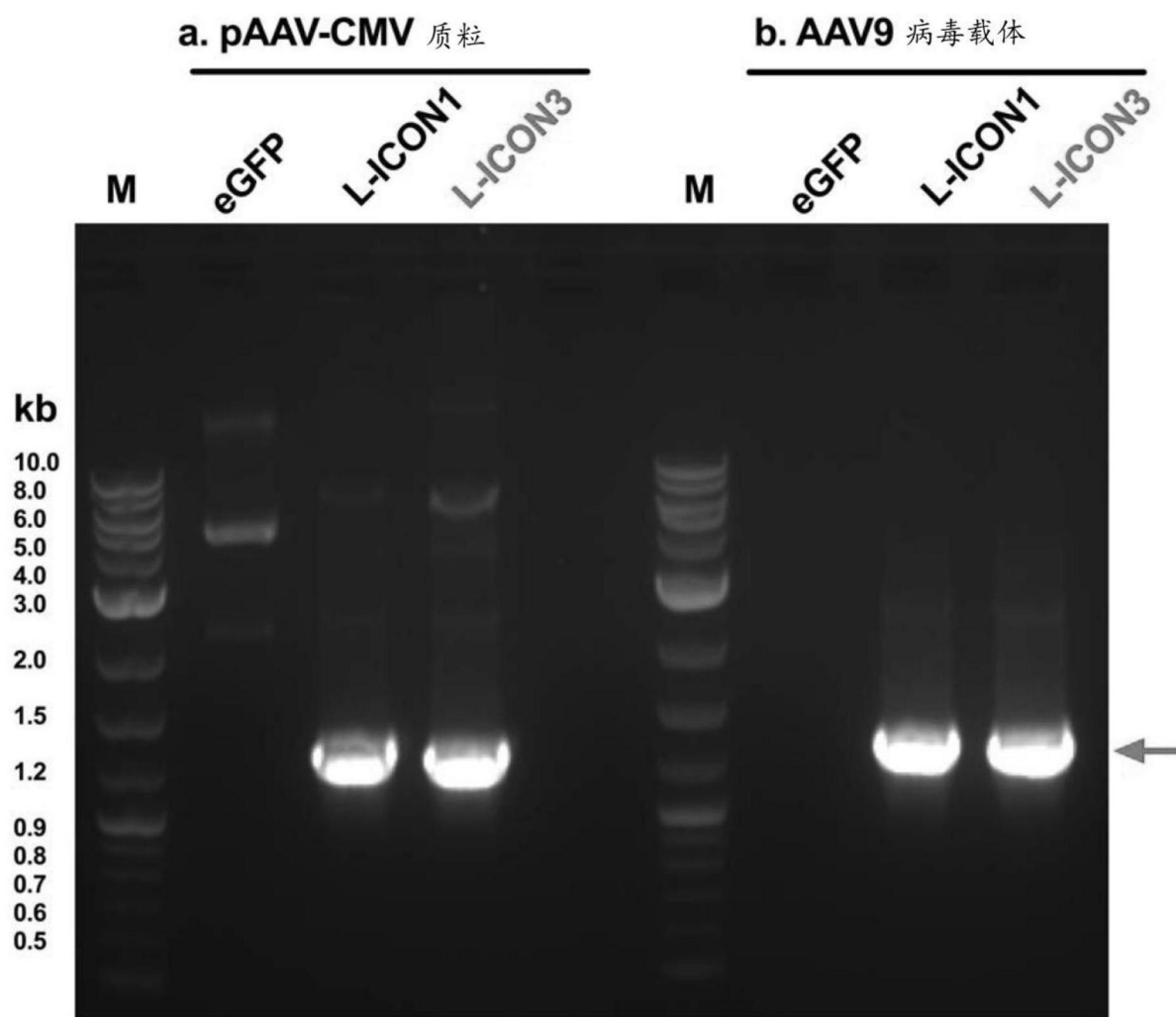


图8A-8B

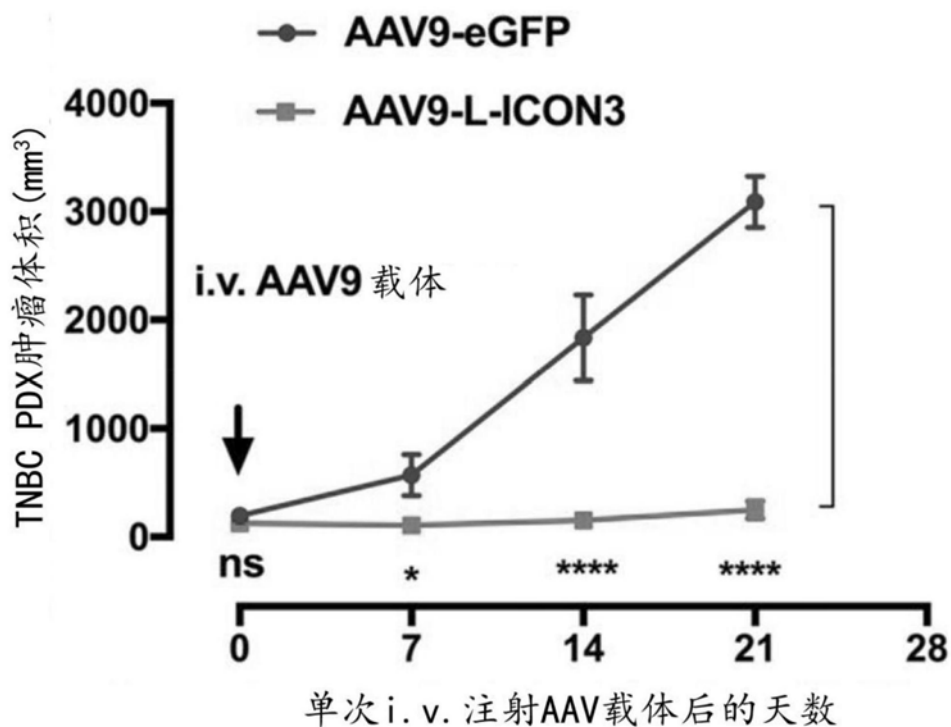


图9

促凝活性（占FVIIa的%）

平均值 ± SD (%)

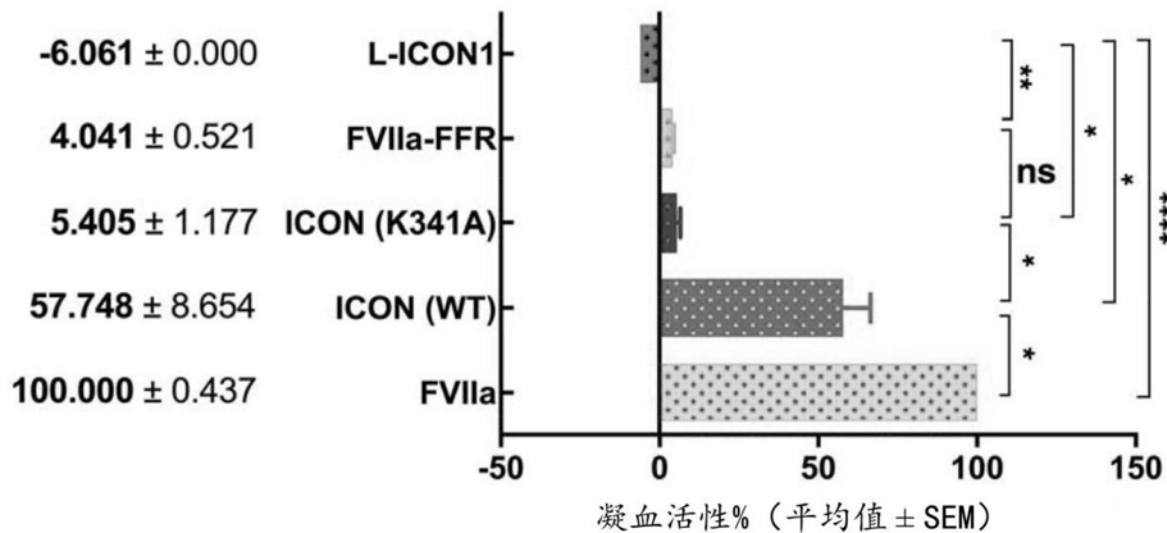


图10A

促凝活性 (IU/ml)

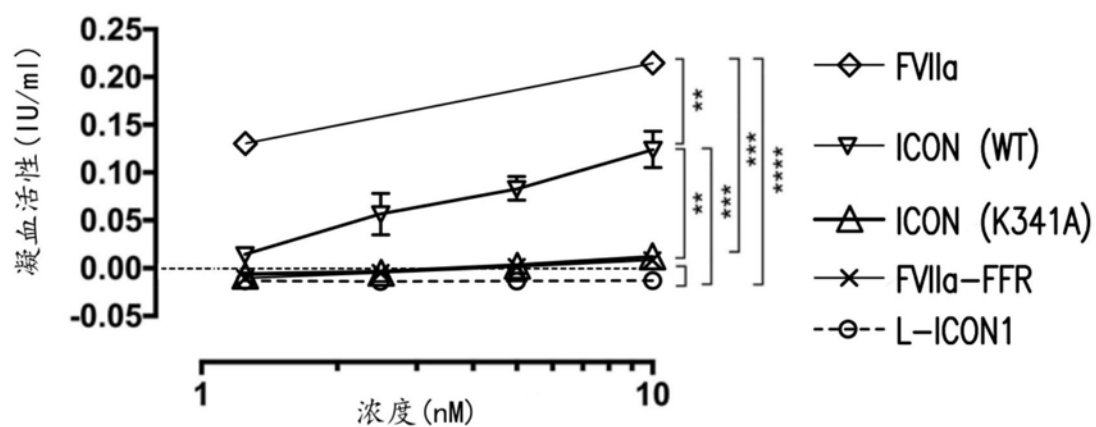


图10B

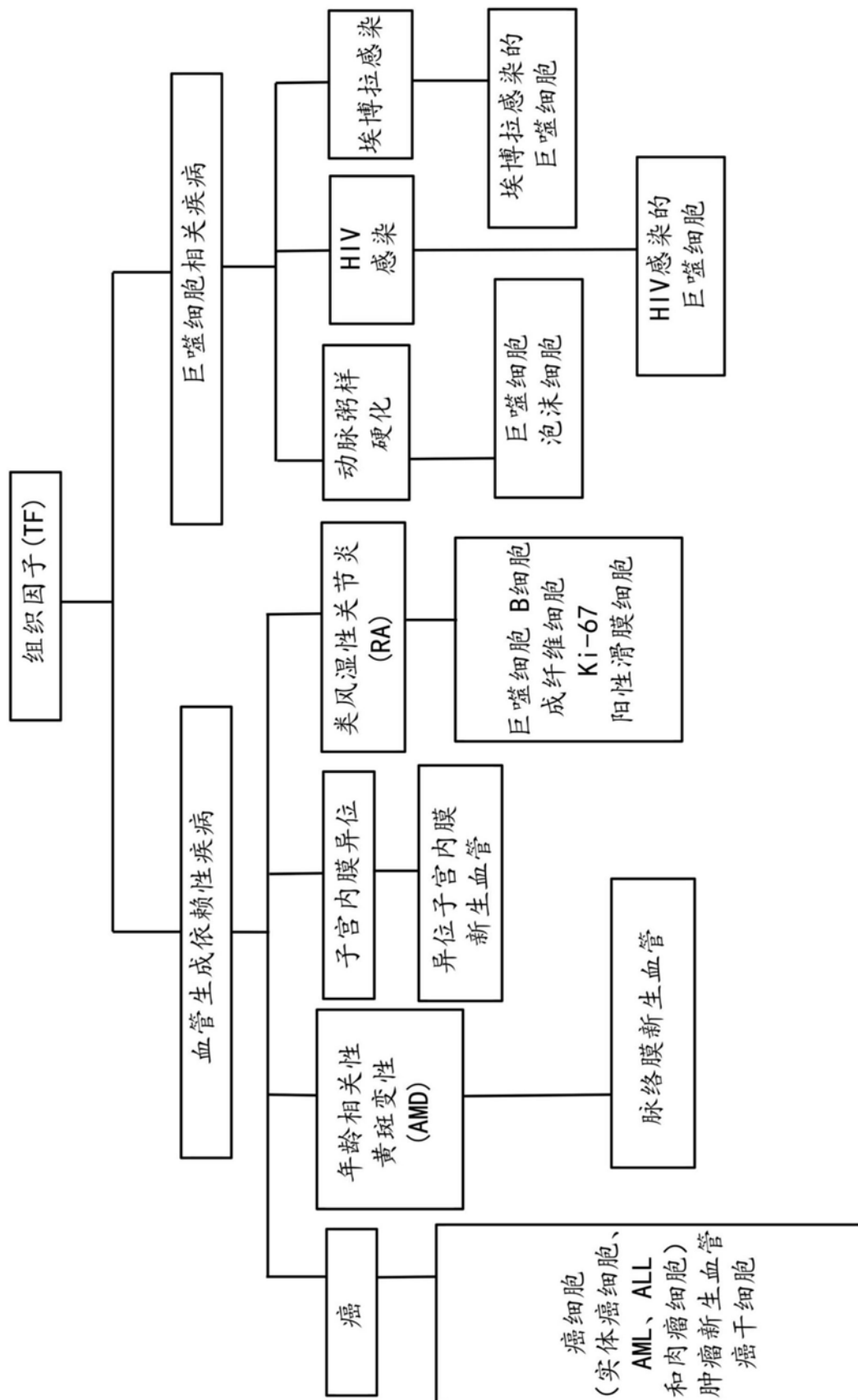


图11