



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107428838 A

(43)申请公布日 2017.12.01

(21)申请号 201580078235.5

朴荣燮 丁俊弘 赵基俊

(22)申请日 2015.12.29

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 陈桢

(30)优先权数据

10-2015-0026555 2015.02.25 KR

10-2015-0135761 2015.09.24 KR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.09.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2015/014370 2015.12.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/137108 EN 2016.09.01

(71)申请人 财团法人牧岩生命科学研究所

地址 韩国京畿道

(72)发明人 金董植 李美祯 朴在灿 李秀珉

郭曦天 黄成虎 李滢权 金基洙

权利要求书2页 说明书64页

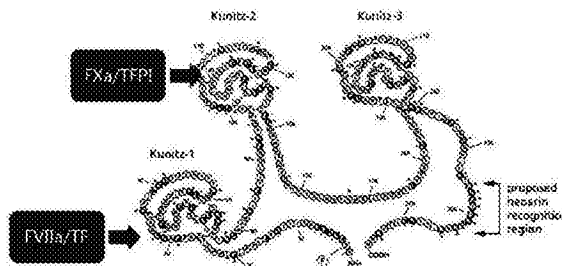
序列表73页 附图30页

(54)发明名称

结合TFPI的新型抗体以及包含所述抗体的组合物

(57)摘要

本发明涉及一种特异性结合组织因子通道抑制剂(TFPI)的抗体,一种编码所述抗体的核酸,一种包含所述核酸的载体,一种使用所述载体转化的宿主细胞,一种用于生产所述抗体的方法,以及一种用于治疗血友病的药物组合物,其包含所述抗体作为活性成分。本发明所述的特异性结合TFPI的抗体,可通过抑制TFPI激活外源性凝血途径。因此,本发明所述的抗体可以有效用于治疗抗体诱导的血友病患者和预防A型血友病或B型血友病患者的凝血疾病。



1. 特异性结合TFPI (组织因子通道抑制剂) 的抗体, 其中所述组织因子通道抑制剂由 SEQ ID NO:39表示。

2. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下重链CDR的重链可变区:

重链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NOs:149、157、163、172、181、182、183、188、201或203;

重链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:150、155、159、162、165、166、167、168、173、184、186、187或202; 以及

重链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:151、156、170、174、175或185。

3. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下轻链CDR的重链可变区:

轻链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:152、158、160、169、171、176、177或178;

轻链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:153, 以及

轻链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:154、161、164、179或180。

4. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%同源性的序列的重链可变区: SEQ ID NO:95、97、98、99、100、102、104、105、107、109、110、112、113、114、115、117、118、119、120、121、123、124、125、126、127、128、129、131、132、133、134、135、136、137、138、141、142、143、144、145、146、148、195、197、198、199或200。

5. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%同源性的序列的轻链可变区: SEQ ID NO:96、101、103、106、108、111、116、122、130、139、140、147或196。

6. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下氨基酸序列的重链可变区: 95、97、98、99、100、102、104、105、107、109、110、112、113、114、115、117、118、119、120、121、123、124、125、126、127、128、129、131、132、133、134、135、136、137、138、141、142、143、144、145、146、148、195、197、198、199或200, 和包含以下氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:96、101、103、106、108、111、116、122、130、139、140、147或196。

7. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下重链CDR的重链可变区:

重链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:5、11或23;

重链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:6、12、26或27; 以及

重链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:7或13。

8. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下轻链CDR的重链可变区:

轻链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:8或14;

轻链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:9或15; 以及

轻链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:10或16。

9. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%同源性的序列的重链可变区: SEQ ID NO:1、3、21、24或25。

10. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%同源性的序列的轻链可变区: SEQ ID NO:2、4或22。

11. 权利要求1的抗体, 其中, 所述抗体含有包含以下氨基酸序列的重链可变区: SEQ ID NO:1、3、21、24或25, 和包含以下氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:2、4或22。

12. 编码权利要求1至10中任一项的抗体的核酸。

13. 包含权利要求12的核酸的载体。
14. 包含权利要求13的载体的宿主细胞。
15. 用于生成权利要求1至10中任一项的抗体的方法,其包括培养权利要求14的宿主细胞以表达所述抗体。
16. 用于治疗血友病的药物组合物,其包含权利要求1至10中任一项的抗体作为活性成分。

结合TFPI的新型抗体以及包含所述抗体的组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种特异性结合组织因子通道抑制剂(TFPI)的抗体,编码所述抗体的核酸,包含所述核酸的载体,包含所述载体的宿主细胞,用于生产所述抗体的方法,以及用于治疗血友病的药物组合物,其包含所述抗体作为活性成分。

背景技术

[0002] 已知,在大约30%的A型和B型血友病患者中,对用于治疗FVIII(VIII因子)或FIX(IX因子)蛋白生成抗体,从而显著降低所述蛋白的治疗效果。作为蛋白质的替代物,已经施用活化的VIIa因子或aPCC(血浆来源的活化的凝血素复合物浓缩物(plasma-derived activated prothrombin complex concentrate))。

[0003] 将上述重组蛋白通过每周两次或多次静脉内注射施用于血友病患者,但是持续存在由重复施用重组蛋白引起的不便的问题。因此,积极地进行了对具有增加的半衰期的长效重组蛋白的研究。

[0004] 在血友病模型中,近来尝试了一种针对TFPI(组织因子通道抑制剂)的方法。TFPI牵涉在外源性凝血途径中,并且通过使用TF/FVIIa防止X因子激活来抑制凝血的功能(见图1)。因此,当TFPI被抗TFPI抗体抑制时,出血过程中的凝血可以通过外源性途径激活。

[0005] TFPI由三个KPI结构域(Kunitz型结构域或Kunitz结构域)组成,并且KPI-2(Kunitz结构域2)通过直接结合FXa来抑制FXa(见图2)。这意味着KPI-2形成TF/FVIIa/FXa/TFPI复合物,导致直接抑制FXa的生成。

[0006] 抗TFPI抗体可以用于已经生成了对抗FVIII或FIX蛋白的抗体的患者。此外,抗TFPI抗体具有极长的半衰期(大约2周),并且因此可以减少其施用次数。

[0007] 针对TFPI的血友病治疗剂主要处于研究阶段或初始开发阶段。例如,由Novo Nordisk开发的人源化单克隆抗体(mAb) mAb2021是人源化抗体(IgG4),其为抗TFPI单克隆抗体,并处于1期临床阶段。此外,由Baxter开发的ARC19499是靶向TFPI的聚乙二醇化适体(aptamer),并处于临床前阶段。此外,由Baxter和3B Pharmaceuticals开发的JBT2329是聚乙二醇化抗人TFPI20肽,并处于临床前阶段。

[0008] 不断提出对治疗血友病新药的需要,并且对开发不同于绕过剂(bypassing agent)如FVIIa方法的治疗剂存在迫切需要。尤其,优选抑制TFPI通道的药物的方法。在使用凝血因子给药的血友病患者中,存在对所述因子具有抗性的许多患者,并且因此需要一种新型药物。然而,应该考虑如抗原(Ag)-抗体(Ab)复合物清除率的医学问题。

[0009] 因此,本发明的发明人做出大量的努力,开发了特异性结合TFPI的新型抗体,并且因此,发现抗体的用途可通过抑制TFPI的抗凝机制来激活外源性凝血途径,从而完成本发明。

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明的目的是提供特异性结合TFPI的新抗体,编码所述抗体的核酸,包含所述核酸的载体,包含所述载体的宿主细胞,用于生产所述抗体的方法,以及用于治疗抗体诱导的血友病或预防A型血友病和B型血友病患者的凝血疾病的药物组合物,所述药物组合物包含所述抗体作为活性成分并且能够抑制TFPI从而激活外源性凝血途径。

[0012] 技术方案

[0013] 为了实现上述目的,本发明提供了特异性结合由SEQ ID NO:165表示的TFPI(组织因子通道抑制剂)的抗体。

[0014] 本发明还提供了:编码抗TFPI抗体的核酸;含有所述核酸的载体;和具有其中引入所述载体的细胞。

[0015] 本发明还提供了用于治疗血友病的药物组合物,其包含抗TFPI抗体作为活性成分。

附图说明

[0016] 图1显示凝血和TFPI的外源性途径。

[0017] 图2显示TFPI的蛋白质结构示意图和KPI结构域的功能。

[0018] 图3显示纯化的抗TFPI抗体中T417和T308克隆抗体蛋白质电泳(SDS-PAGE)的结果。

[0019] 图4显示抗TFPI抗体中克隆T417和人源化抗体克隆308的氨基酸序列。

[0020] 图5显示抗TFPI抗体中作为克隆308抗体突变体的308-2和302-4克隆抗体的氨基酸序列。

[0021] 图6显示抗TFPI抗体中作为克隆308抗体突变体的308-2和302-4克隆抗体IgG的蛋白质电泳(SDS-PAGE)结果。

[0022] 图7显示根据动物的种类TFPI KPI-2(Kunitz结构域2)蛋白的蛋白质电泳(SDS-PAGE)结果。

[0023] 图8图示了抗TFPI抗体的亲和力。

[0024] 图9图示了通过FXa活性测定评估抗TFPI抗体中嵌合抗体作用的结果。

[0025] 图10图示了通过FXa活性测定评估抗TFPI抗体中人源化抗体作用的结果。

[0026] 图11图示了通过FXa活性测定评估抗TFPI抗体中回复突变抗体作用的结果。

[0027] 图12图示了通过TF/FVIIa/Fxa复合物测定评估抗TFPI抗体中嵌合抗体作用的结果。

[0028] 图13图示了通过TF/FVIIa/Fxa复合物测定评估抗TFPI抗体中人源化抗体作用的结果。

[0029] 图14图示了通过TF/FVIIa/Fxa复合物测定评估抗TFPI抗体中回复突变抗体(back-mutated antibodies)作用的结果。

[0030] 图15图示了通过凝血酶生成测定评估抗TFPI抗体中人源化抗体作用的结果。

[0031] 图16图示了通过凝血酶生成测定评估抗TFPI抗体中回复突变抗体作用的结果。

[0032] 图17显示抗TFPI抗体中的克隆308和人TFPI K2结构域之间的预期结合。由红色表示的分子表示人TFPI K2结构域,和由绿色表示的分子表示克隆308抗体。

[0033] 图18显示抗TFPI抗体中的克隆308的重链可变区和人TFPI抗原之间的预期结合。

- [0034] 图19显示抗TFPI抗体中的克隆308的轻链可变区和人TFPI抗原之间的预期结合。
- [0035] 图20至28显示通过Fxa活性测定评估亲和力成熟的抗TFPI抗体作用的结果。
- [0036] 图29至33显示通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI抗体作用的结果。
- [0037] 图34显示通过凝血酶生成测定评估亲和力成熟的抗TFPI抗体作用的结果。

具体实施方式

[0038] 据报道TFPI (组织因子通道抑制剂) 牵涉在外源性凝血途径中, 并通过使用TF/FVIIa防止X因子激活来抑制凝血。因此, 本发明的发明人已经尝试构建用于治疗或预防血友病的抗体。具体地, 本发明的主题是通过抑制TFPI的KPI-2的抗体来激活外源性凝血途径。通过抗体靶向的抗原区是TFPI的KPI-2结构域, 其在人、兔和猴之间具有90%以上相同的氨基酸序列。因此, 当使用TFPI的KPI-2结构域时, 容易设计动物研究, 并且可以引入用于测量凝血速率的简单模型。

[0039] 如本文所使用的术语“组织因子通道抑制剂”或“TFPI”指通过细胞自然表达地人TFPI的变体、同种型和物种同源物。在本发明的优选实施方式中, 本发明的抗体与TFPI的结合减少凝血时间。

[0040] 在本发明的实例中, 制备了“克隆308”、“克隆308-2”和“克隆308-4”, 其是分离人单克隆抗体, 具有特异性结合由SEQ ID NO:39表示的TFPI (组织因子通道抑制剂) 的结构特征。各抗体的重链CDR和轻链CDR的氨基酸序列示于下表5和7。如下表4和6所示, 抗TFPI抗体可包含重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列以及与其同源的序列。

[0041] 在本发明的另一个实例中, 纯化的抗体克隆T417、克隆T308、克隆308、克隆308-2或克隆308-4对重组人TFPI的定量亲和力使用Biacore T-200生物传感器 (美国GE HEALTHCARE制造) 测量 (实施例6)。因此, 如表13和图8所示, 所有制备的克隆抗体亲和力彼此有些不同。尤其, 显示出克隆308-2和克隆308-4的亲和力远高于克隆308。

[0042] 因此, 一方面, 本发明涉及特异性结合由SEQ ID NO:39表示的TFPI (组织因子通道抑制剂) 的抗体。

[0043] 在本发明中, 抗体可含有包含以下的重链可变区: 重链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:5、11或23; 重链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:6、12、26或27; 以及重链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:7或13。

[0044] 在本发明中, 抗体可含有包含以下的重链可变区: 轻链CDR1, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:8或14; 轻链CDR2, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:9或15; 以及轻链CDR3, 其包含以下氨基酸序列: SEQ ID NO:10或16。

[0045] 在本发明中, 抗体可含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%, 优选至少90%, 更优选100%同源性的序列的重链可变区: SEQ ID NO:1、3、21、24或25, 并且抗体可含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%, 优选至少90%, 更优选100%同源性的序列的轻链可变区: SEQ ID NO:2、4或22。

[0046] 在本发明中, 抗体可含有包含以下氨基酸序列的重链可变区: SEQ ID NO:1、3、21、24或25, 和含有以下氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:2、4或22。抗体可以是人单克隆抗体, 但不限于此。

[0047] 在本发明的实例中,制备了“克隆1001”、“克隆1015”、“克隆1021”、“克隆1023”、“克隆1024”、“克隆1104”、“克隆1123”、“克隆1202”、“克隆1208”、“克隆1214”、“克隆1216”、“克隆1223”、“克隆1224”、“克隆1232”、“克隆1234”、“克隆1238”、“克隆1243”、“克隆1248”、“克隆3007”、“克隆3016”、“克隆3024”、“克隆3115”、“克隆3120”、“克隆3131”、“克隆3203”、“克隆3241”、“克隆4011”、“克隆4017”、“克隆4034”、“克隆4041”、“克隆4141”、“克隆4146”、“克隆4206”、“克隆4208”、“克隆4278”、“克隆4287”、“克隆1”、“克隆2”、“克隆3”、“克隆4”、“克隆5”、“克隆6”、“克隆7”、“克隆8”、“克隆9”、“克隆10”、“克隆11”、“克隆12”、“克隆13”、“克隆14”、“克隆15”、“克隆16”、“克隆17”、“克隆18”、“克隆19”、“克隆20”、“克隆21”、“克隆22”、“克隆23”、“克隆A24”、“克隆A25”、“克隆A52”、“克隆A63”、“克隆A67”、“克隆A71”和“克隆A74”,其为分离的单克隆抗体,具有特异性结合由SEQ ID NO:39表示的TFPI(组织因子通道抑制剂)的结构特征。各抗体的重链CDR和轻链CDR的氨基酸序列示于下表20和23。如表下19和22所示,抗TFPI抗体可包含重链可变区和轻链可变区的序列以及与其同源的序列。

[0048] 在本发明的另一个实例中,作为纯化的抗体的克隆12、克隆1023、克隆1202和克隆3241对重组人TFPI的定量结合亲和力使用Biacore T-200生物传感器(美国GE HEALTHCARE)测量(实施例13)。因此,如下表24所示,所有制备的克隆抗体显示彼此有些不同的亲和力。

[0049] 因此,一方面,本发明涉及特异性结合由SEQ ID NO:39表示的TFPI(组织因子通道抑制剂)的抗体。

[0050] 在本发明中,抗体可含有包含以下的重链可变区:重链CDR1,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NOs:149、157、163、172、181、182、183、188、201或203;重链CDR2,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:150、155、159、162、165、166、167、168、173、184、186、187或202;以及重链CDR3,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:151、156、170、174、175或185。

[0051] 在本发明中,抗体可含有包含以下的重链可变区:轻链CDR1,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:152、158、160、169、171、176、177或178;轻链CDR2,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:153,以及轻链CDR3,其包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:154、161、164、179或180。

[0052] 在本发明中,抗体可含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%,优选至少90%,更优选100%同源性的序列的重链可变区:SEQ ID NO:95、97、98、99、100、102、104、105、107、109、110、112、113、114、115、117、118、119、120、121、123、124、125、126、127、128、129、131、132、133、134、135、136、137、138、141、142、143、144、145、146、148、195、197、198、199或200,并且抗体可含有包含与以下氨基酸序列具有至少80%,优选至少90%,更优选100%同源性的序列的轻链可变区:SEQ ID NO:96、101、103、106、108、111、116、122、130、139、140、147或196。

[0053] 在本发明中,抗体可含有包含以下序列的重链可变区:SEQ ID NO:95、97、98、99、100、102、104、105、107、109、110、112、113、114、115、117、118、119、120、121、123、124、125、126、127、128、129、131、132、133、134、135、136、137、138、141、142、143、144、145、146、148、195、197、198、199或200,和含有以下氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:96、101、103、106、108、111、116、122、130、139、140、147或196。

[0054] 抗体的氨基酸序列可以由保守置换替代。如本文所使用的术语“保守置换

(conservative substitution)”是指修饰涉及一个或多个氨基酸被具有类似生物化学性质的氨基酸置换的多肽,这不会导致多肽的生物或生物化学功能丧失。“保守氨基酸置换”是用具有类似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基。本发明所属领域已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸和谷氨酸)、具有不带电的极性侧链的氨基酸(例如,甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸和半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸和色氨酸)、具有 β -分支侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸和异亮氨酸),以及具有芳香侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和组氨酸)。可以设想本发明的抗体可具有保守氨基酸置换并且仍然保持活性。

[0055] 对于核酸和多肽,术语“基本同源(substantial homology)”表示两种核酸或两种多肽,或它们的指定序列,当与适当的核苷酸或氨基酸插入或缺失进行最佳比对和比较时,核苷酸或氨基酸的至少约80%,通常至少约85%,优选至少约90%、91%、92%、93%、94%或95%,更优选核苷酸或氨基酸的至少约96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%是相同的。或者,当片段将在选择性杂交条件下,与链的互补物杂交时,存在核酸的基本同源。还包括的是与本文所述的具体核酸序列和氨基酸序列具有基本同源性的核酸序列和多肽序列。

[0056] 如下表2、5和7所示,在根据本发明的抗体中,重链(V_H) CDR1、CDR2和CDR3序列和轻链(V_L) CDR1、CDR2和CDR3序列可由形成CDR1、CDR2和CDR3的结构类似的重链(V_H)和轻链(V_L)序列的混合物构成,其各自由重链(V_H)/轻链(V_L)对组成。

[0057] 如下表5和8所示,在本发明的抗体中,重链(V_H) CDR1、CDR2和CDR3序列和轻链(V_L) CDR1、CDR2和CDR3序列可以由形成CDR1、CDR2和CDR3的结构类似的重链(V_H)和轻链(V_L)序列的混合物构成,其各自由重链(V_H)/轻链(V_L)对组成。

[0058] 如本文所使用的术语“抗体”或“抗体组成”指制备单一分子组成的抗体分子。单克隆抗体组成显示对具体表位(epitope)的结合特异性和亲和力。因此,术语“人单克隆抗体”指显示具有源自人胚系免疫球蛋白序列可变区和恒定区的单一结合特异性的抗体。本发明的人抗体可包括没有通过人胚系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。

[0059] 如本文所使用的术语“抗体”指蛋白质分子,其包含与具体抗原具有免疫反应的免疫球蛋白分子,并且其用作特异性识别抗原的受体。该术语可包括所有多克隆抗体,单克隆抗体、全长抗体和抗体片段。此外,该术语可包括嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)、二价或双特异性分子(例如,双特异性抗体)、双抗体、三抗体和四抗体。

[0060] 全长抗体具有两个全长轻链和两个全长重链,其中,各轻链通过二硫键连接重链。全长抗体包括IgA、IgD、IgE、IgM和IgG,并且IgG的亚类包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。术语“抗体片段”指具有抗原结合功能的片段,并且意欲包括Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 、scFv和Fv。

[0061] Fab包含轻链可变区和重链可变区、轻链恒定区和重链第一恒定区(CH1),并且具有抗原结合位点。Fab'与Fab的差异在于其在重链CH1结构域的C末端具有包含一个或多个半胱氨酸残基的铰链区。 $F(ab')_2$ 抗体通过Fab'铰链区的半胱氨酸残基之间的二硫键形成。

[0062] Fv(可变片段)指仅具有重链可变区和轻链可变区的最小抗体片段。dsFv具有重链

可变区和轻链可变区彼此通过二硫键连接的结构,并且scFV通常具有重链可变区和轻链可变区彼此通过肽接头共价连接的结构。这些抗体片段可以使用蛋白酶获得(例如,Fab片段可以通过使用木瓜蛋白酶消化全长抗体而获得,并且F(ab')₂片段可以通过使用胃蛋白酶消化全长抗体而获得)。优选地,这些抗体片段可以通过基因重组技术产生(例如,使用编码抗体重链或其可变区的DNA和编码轻链或其可变区的DNA作为模板连同引物对一起通过PCR(聚合酶链式反应)进行扩增,以及使用引物对的组合使得编码多肽接头的DNA与重链或其可变区和轻链或其可变区连接而进行扩增)。

[0063] 免疫球蛋白具有重链和轻链,并且各重链和轻链含有恒定区和可变区(该区还被称为结构域)。轻链和重链可变区含有四个框架区和三个超变区,还被称为“互补决定区”(以下称为“CDR”)。CDR主要发挥结合抗原表位的作用。各链的CDR通常被称为CDR1、CDR2和CDR3,从N末端开始顺序编号,并且通常也由具体CDR所在的链识别。

[0064] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”指从基本相同的抗体群体获得的具有单一分子组成的抗体分子。该单克隆抗体可显示针对具体表位的单一结合特异性和亲和力。

[0065] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”指来源于包括互补决定区和框架区的人免疫球蛋白的分子,其中,抗体的全长氨基酸序列由人免疫球蛋白的氨基酸序列组成。人抗体通常用于治疗人类疾病,并且具有以下优点。第一,人抗体可更容易地与人免疫系统相互影响,使得目标细胞可以更有效地通过例如互补依赖性毒性(CDC)或抗体依赖性细胞介导的毒性(ADCC)而破坏。第二,人免疫系统不会将抗体识别为外源抗体。第三,甚至当抗体以较低频率少量施用,其在人循环系统中的半衰期类似于天然存在的抗体的半衰期。

[0066] 因此,根据本发明的抗体是特异性结合TFPI并且对TFPI显示高亲和力和特异性的抗体。此外,由于本发明的抗体是人源的,其显示低的免疫原性,并且因此有效用于治疗疾病,如抗体诱导的血友病(A型血友病或B型血友病)。

[0067] 如本文所使用的术语“克隆T417”、“克隆T308”、“克隆308”、“克隆308-2”或“克隆308-4”,其特异性结合TFPI,是指结合TFPI的抗体,这产生了对TFPI抑制的生物活性。该术语可以与术语“抗TFPI抗体”互换使用。在此,克隆T417和克隆T308是一种抗体,其是在使用重组人TFPI免疫小鼠后分离的抗体,并且克隆308是一种通过人源化克隆T417而制备的抗体。此外,克隆308-2和克隆308-4是如图5所示通过使用谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)使克隆308重链的赖氨酸(K)突变而制备的抗体。

[0068] 抗TFPI抗体的平衡解离常数(K_D)可以例如如下。克隆308的K_D可以是5.5x10⁻¹¹M或更低,优选5.25x10⁻¹¹M或更低,更优选5.0x10⁻¹²M或更低;克隆308-2的K_D可以是3.63x10⁻¹¹M或更低,优选3.465x10⁻¹¹M或更低,更优选3.3x10⁻¹¹M或更低;克隆308-4的K_D可以是2.64x10⁻¹¹M或更低,优选2.52x10⁻¹¹M或更低,更优选2.4x10⁻¹¹M或更低。

[0069] 如本文所使用的术语“克隆1001”、“克隆1015”、“克隆1021”、“克隆1023”、“克隆1024”、“克隆1104”、“克隆1123”、“克隆1202”、“克隆1208”、“克隆1214”、“克隆1216”、“克隆1223”、“克隆1224”、“克隆1232”、“克隆1234”、“克隆1238”、“克隆1243”、“克隆1248”、“克隆3007”、“克隆3016”、“克隆3024”、“克隆3115”、“克隆3120”、“克隆3131”、“克隆3203”、“克隆3241”、“克隆4011”、“克隆4017”、“克隆4034”、“克隆4041”、“克隆4141”、“克隆4146”、“克隆4206”、“克隆4208”、“克隆4278”、“克隆4287”、“克隆1”、“克隆2”、“克隆3”、“克隆4”、“克隆5”、“克隆6”、“克隆7”、“克隆8”、“克隆9”、“克隆10”、“克隆11”、“克隆12”、“克隆13”、“克隆

14”、“克隆15”、“克隆16”、“克隆17”、“克隆18”、“克隆19”、“克隆20”、“克隆21”、“克隆22”、“克隆23”、“克隆A24”、“克隆A25”、“克隆A52”、“克隆A63”、“克隆A67”、“克隆A71”或“克隆A74”，其特异性结合TFPI，是指结合TFPI的抗体，这产生了对TFPI抑制的生物活性。该术语可与术语“抗TFPI抗体”互换使用。

[0070] 此外，如本文所使用的术语“克隆T417”、“克隆T308”、“克隆308”、“克隆308-2”或“克隆308-4”，其特异性结合TFPI，是指结合TFPI导致抑制TFPI生物活性的抗体。该术语可以与“抗TFPI抗体”互换使用。在此，克隆T417和克隆T308是抗体，是在使用重组人TFPI免疫小鼠后分离的抗体，并且克隆308是通过人源化克隆T417的而制备的抗体。此外，克隆308-2和克隆308-4是如图5所示通过使用谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)使克隆308重链的赖氨酸(K)突变而制备的抗体。

[0071] 抗TFPI抗体的平衡解离常数(K_D)可以例如如下。克隆12的 K_D 可以是 9.009×10^{-12} M或更低，优选 8.59×10^{-12} M或更低，更优选 8.19×10^{-12} M或更低；克隆1023的 K_D 可以是 3.31×10^{-11} M或更低，优选 3.16×10^{-11} M或更低，更优选 3.01×10^{-11} M或更低；克隆1202的 K_D 可以是 10.42×10^{-12} M或更低，优选 9.94×10^{-12} M或更低，更优选 9.47×10^{-12} M或更低；以及克隆3241的 K_D 可以是 8.14×10^{-11} M或更低，优选 7.77×10^{-11} M或更低，更优选 7.4×10^{-11} M或更低。

[0072] 在本发明的另一个实例中，检查结合人TFPI的重链可变区基因和轻链可变区基因，然后将重链可变区基因连接到人IgG4重链恒定区，并且将轻链可变区基因连接到人轻链恒定区。然后，将这些基因的每个插入到动物细胞的蛋白质表达载体中从而构建载体。将所构建的载体转染到Expi293细胞系中，然后将其培养以产生抗体。所产生的抗体使用蛋白质A纯化(实施例1)。

[0073] 在本发明的另一个实例中，检查结合人TFPI的重链可变区基因和轻链可变区基因，然后将重链可变区基因连接到IgG4重链恒定区，并且将轻链可变区基因连接到人轻链恒定区。然后，将这些基因的每个插入到动物细胞的蛋白质表达载体中从而构建载体。将所构建的载体转染到Expi293细胞系中，然后将其培养以产生抗体。所产生的抗体使用蛋白质A纯化(实施例2和3)。

[0074] 因此，在另一方面，本发明涉及编码抗体的核酸。用于本发明的核酸可以存在于细胞裂解物中，或者以部分纯化或基本纯净的形式存在。当通过包括碱性/SDS处理、CsCl条带、柱色谱、琼脂糖凝胶电泳和其他本领域中熟知的标准技术从其他细胞成分或其他污染物，例如其他核酸或蛋白质，中纯化出来时，核酸是“分离的”或“呈现基本纯净的”。本发明的核酸可以是，例如DNA或RNA，并且可包含或不包含内含子序列。

[0075] 在又一方面，本发明涉及包含核苷酸的载体。为了表达其抗体或抗体片段，编码部分或全长轻链和重链的DNA可以通过标准分子生物学技术获得(例如，使用表达感兴趣的抗体的杂交瘤进行PCR扩增或cDNA克隆)，并且可以将DNA插入到表达载体中使其可操作地连接到转录和翻译控制序列。

[0076] 如本文所使用的术语“可操作地连接”意欲指将抗体基因连接到载体使得转录和翻译控制序列提供其调控抗体基因转录和翻译的预期功能。选择表达载体和表达控制序列与所使用的表达宿主细胞相容。抗体重链基因和抗体轻链基因可以被插入到单独的载体中，或两种基因被插入到相同表达载体中。抗体基因通过标准方法(例如，在抗体基因片段和载体上连接互补的限制性位点，或如果限制性位点不存在则平端连接)插入到表达载体

中。在一些情况下,重组表达载体可编码信号肽,其促进从宿主细胞分泌的抗体链。抗体链基因可以在载体中克隆,使得信号肽框内连接到抗体链基因的氨基末端。信号肽可以是免疫球蛋白信号肽,或异源信号肽(即,来自非免疫球蛋白的信号肽)。此外,重组表达载体携带在宿主细胞中控制抗体链基因表达的调节序列。术语“调节序列”意欲包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸化信号),其控制抗体链基因的转录和翻译。本领域的技术人员将理解的是,包含选择调控序列的表达载体的设计,可取决于这样的因素,如选择要转化的宿主细胞、所需蛋白质表达水平等。

[0077] 在另一方面,本发明涉及包含核酸或载体的宿主细胞。核酸或载体被转染到宿主细胞中。转染可使用各种通常用于将外源核酸(DNA或RNA)引入原核细胞或真核细胞中的技术,例如电泳、磷酸钙沉淀、DEAE-葡聚糖转染或脂质体转染而进行。根据本发明的抗体鉴于其适用于哺乳动物细胞,可以在真核细胞,优选哺乳动物宿主细胞中表达。用于表达抗体的哺乳动物宿主细胞的实例包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(其包括连同例如DHFR可选标记一起使用的dhfr-CHO细胞)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞和SP2细胞。

[0078] 在另一方面,本发明涉及用于生成抗体的方法,其包括培养宿主细胞以表达抗体。当编码抗体基因的重组表达载体被引入到哺乳动物细胞时,抗体基因可以通过培养宿主细胞一段时间以便抗体在宿主细胞中表达,优选培养宿主细胞一段时间以便在培养宿主细胞过程中将抗体分泌到培养基中而产生。

[0079] 在一些情况下,所表达的抗体可以从宿主细胞中分离并纯化。抗体的分离和纯化可以通过用于蛋白质的传统分离/纯化方法(例如,色谱法)而进行。色谱法的实例包括包含蛋白质A柱和蛋白质G柱的亲和色谱法,离子交换色谱法和疏水色谱法。除了所述色谱法之外,可以使用过滤、超滤、盐析、透析等的组合来分离和纯化抗体。

[0080] 在本发明的另一个实例中,进行FXa活性测定以评估抗TFPI抗体的作用(实施例7)。因此,如图9所示,发现在抗TFPI抗体候选物中作为嵌合抗体的克隆T308和克隆T417中,吸光度以浓度依赖性方式增加,表示两种抗体的TFPI抑制作用以抗体浓度依赖性方式增加。当在10nM的TFPI浓度下比较作用时,可见克隆T417的TFPI抑制活性好于克隆T308。

[0081] 此外,如图10所示,克隆308使用在上述测定中确定具有更好作用的克隆T417,通过人源化过程而获得。克隆308还显示出吸光度的浓度依赖性增加,这表示它可以抑制TFPI。

[0082] 此外,如图11所示,进行回复突变以增加克隆308的作用,并且获得克隆308-2和克隆308-4。可见克隆308-2和克隆308-4两者以浓度依赖性方式抑制TFPI。并且,当比较使用40nM和10nM处理的样本时,可见与克隆308比较,克隆308-2和克隆308-4的TFPI抑制活性增加。在40nM的浓度,与阳性对照(mAb2021或抗TFPI Ab)比较,克隆308-2和克隆308-4分别显示85%和82%的TFPI抑制活性,但是在10nM的浓度,克隆308-2显示出72%的TFPI抑制活性,并且克隆308-4显示出78%的TFPI抑制活性,这好于克隆308-2的TFPI抑制活性。此外,发现克隆抗体显示与克隆T417嵌合抗体相似的TFPI抑制活性,克隆T417嵌合抗体显示出77%的TFPI抑制活性。

[0083] 在本发明的另一个实例中,进行TF/FVIIa/Fxa复合物测定以评估抗TFPI抗体的作用(实施例8)。具体地,在TFPI与抗TFPI抗体一同存在或独立于抗TFPI抗体存在的情况下,基于FXa活性评估了通过TF/FVIIa复合物生成Fxa和抑制Fxa的程度。

[0084] 因此,如图12所示,克隆T308和克隆T417抗体是抗TFPI抗体候选物中显示出吸光度的浓度依赖性增加的嵌合抗体,这表明两种抗体的TFPI抑制作用以浓度依赖性方式增加。尤其,可见克隆T417的TFPI抑制活性好于克隆T308。

[0085] 此外,如图13所示,克隆308使用具有比克隆T308更好效果的克隆T417抗体通过人源化过程获得。可见克隆308也显示出吸光度的浓度依赖性增加,这表明它抑制TFPI。

[0086] 此外,如图14所示,进行回复突变以增加克隆308人源化抗体的效果。因此,与克隆308比较,克隆308-2和克隆308-4的TFPI抑制活性增加。在25nM的浓度,克隆308-2显示出37.8%的TFPI抑制活性,并且克隆308-4显示出68.4%的TFPI抑制活性,高于克隆308-2的TFPI抑制活性。

[0087] 在本发明的另一个实例中,进行通过FXa活性测定和TF/FVIIa/Fxa复合物测定而选择的克隆308-2和克隆308-4的凝血酶生成测定(实施例9)。因此,如图15所示,与阴性对照组(没有抗体)比较,克隆T417和克隆308两者均显示出凝血酶生成峰值和凝血酶生成的增加。在使用2.5nM处理的样本中,与阴性对照组(没有抗体)比较,克隆T417和克隆308分别显示出208%和162%的凝血酶峰值,并且表示凝血酶生成的ETP值在克隆T417中为131%,在克隆308中为122%。因此,发现克隆T417具有比克隆308抗体更好的效果。

[0088] 此外,如图16所示,与克隆308抗体比较,克隆308-2和克隆308-4显示出凝血酶生成峰值和总凝血酶生成的增加。尤其,在使用2.5nM处理的样本中,与阴性对照组(没有抗体)比较,克隆308-2和克隆308-4两者分别显示出凝血酶峰值增加183%和191%,并且ETP值在克隆308-2和克隆308-4两者中均为126%,这表明克隆抗体具有增加的生成凝血酶的能力。

[0089] 在本发明的另一个实例中,进行FXa活性测定以评估抗TFPI抗体的作用(实施例5)。因此,如图20至28所示,证实了抗TFPI抗体候选物中亲和力成熟抗体的作用。发现抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,这表明抗体的TFPI抑制效果以抗体浓度依赖性方式增加。

[0090] 在本发明的另一个实例中,进行TF/FVIIa/Fxa复合物测定以评估抗TFPI抗体的作用(实施例15)。具体地,TF/FVIIa复合物的FXa生成和抑制程度在TFPI与抗TFPI抗体一同存在或独立于抗TFPI抗体存在的情况下基于FXa活性评估。因此,如图29至33所示,证实了抗TFPI抗体MG1113候选物中亲和力成熟抗体的作用。发现抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,这表明候选抗体的TFPI抑制作用以抗体浓度依赖性方式增加。

[0091] 在本发明的另一个实例中,进行通过FXa活性测定而选择的抗TFPI抗体的凝血酶生成测定(实施例16)。因此,如图34所示,对于通过FXa活性测定和TF/FVIIa/Fxa复合物测定而选择的亲和力成熟抗体候选物中的第1023号抗体,凝血酶比较测定使用T417嵌合抗体进行。在2.5nM,与仅使用样本稀释液处理的空白比较,T417抗体显示出凝血酶峰值增加大约335%,并且与空白比较,第1023抗体显示凝血酶峰值增加大约401%。此外,在ETP表示凝血酶总生成的情况下,T417抗体在2.5nM的浓度与阴性对照组(没有抗体)比较,显示出ETP增加大约293%,并且与阴性对照组比较,第1023号抗体显示出ETP增加大约309%。两种抗体之间的比较表示从亲和力成熟获得的第1023号抗体具有比T417抗体更好的效果。

[0092] 在进一步的方面,本发明涉及用于治疗血友病的药物组合物,其包含抗TFPI抗体作为活性成分。

[0093] 本发明还提供了药物组合物,其包含治疗有效量的抗TFPI抗体以及药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指可以加入到活性成分中帮助配制制剂或稳定制剂并且对患者不造成重大不良毒理效应的物质。

[0094] 如本文所使用的术语“药学上可接受的载体”指不损害生物活性并且以施用的化合物为特征而不刺激生物体的载体或稀释剂。无菌和可生物相容的载体被用作配制成液体溶液的组合物中药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是生理盐水、无菌水、林格氏溶液(Ringer's solution)、缓冲盐水、白蛋白注射溶液、葡萄糖溶液、麦芽糖糊精溶液、甘油、乙醇或它们两种或多种的混合物。此外,如需要,本发明的组合物可包含其他传统添加剂,其包括抗氧化剂、缓冲剂和细菌抑制剂。此外,本发明的组合物可以借助稀释剂、分散剂、表面活性剂、粘合剂和润滑剂配制成可注射的形式、例如水溶液、悬浮液或乳液。此外,根据本发明的组合物可以配制成丸剂、胶囊、颗粒或片剂。其他载体在文献[Remington's Pharmaceutical Sciences (E.W.Martin)]中描述。该组合物可含有治疗有效量的至少一种抗TFPI抗体。

[0095] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。这种介质和试剂用于药物活性物质是本领域中已知的。组合物优选配制成肠胃外注射。组合物可以配置为固体、溶液、微乳剂、脂质体或其他适合于高药物浓度的有序结构。载体可以是含有例如水、乙醇、多羟基化合物(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇)的溶剂或分散体介质,以及它们适合的混合物。在一些情况下,组合物可含有等渗剂,例如,糖、多元醇、山梨醇或氯化钠。如需要,无菌可注射溶液可以通过所需量的活性化合物在合适的溶剂中与上面列举的成分中的一种或组合进行制备,接着过滤灭菌。通常,分散体通过将活性化合物并入无菌载体中而制备,所述无菌载体含有碱性分散介质和来自上面列举的那些所需的其他成分。在无菌粉末用于制备无菌可注射溶液的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从先前无菌过滤的溶液中产生活性成分的粉末加上任何另外的所需成分。

[0096] 抗TFPI抗体可以用作治疗目的,用于治疗遗传和获得性缺陷或凝血缺陷。例如,抗体可用来阻止TFPI和FXa之间的相互影响,或防止TFPI依赖的TF/FVIIa活性抑制。此外,人单克隆抗体还可以用来恢复TF/FVIIa驱动的FXa生成,以避免FVIII或FIX依赖的FXa扩增不足。

[0097] 抗体在治疗止血障碍,如血小板减少、血小板疾病和出血性疾病(例如血友病A和血友病B)方面具有治疗用途。所述疾病可以通过向有需要的患者施用治疗有效量的抗TFPI抗体治疗。抗体在治疗如创伤和出血性中风等适应症的不受控制的出血方面也具有治疗用途。因此本发明还提供了一种用于缩短出血时间的方法,其包括向有需要的患者施用治疗有效量的抗TFPI抗体。

[0098] 抗体可以用作单一疗法或与其他疗法组合使用以解决止血障碍。例如,认为共同施用本发明的一种或多种抗体与凝血因子,如TF(组织因子)、FVII(VII因子)或FX(X因子),对治疗血友病有用。通过抗体与凝血因子的共同施用或联合治疗是指两种治疗药物的施用,每种治疗药物单独配制或一起配制在一种组合物中,并且当单独配制时,大致相同或不同时间施用,但在相同的治疗期间。

[0099] 可以将药物组合物胃肠外给药至患有血友病A或B的受试者,给药剂量和频率可以

随出血发作的严重程度而变化,或者在预防性治疗的情况下可以随患者凝血缺陷的严重程度而变化。组合物可以作为单次快速注射或通过连续输注向需要的受试者施用。例如,作为Fab片段存在的本发明抗体的单次快速施用的量可以是0.0025至100mg/kg体重、0.025至0.25mg/kg、0.010至0.10mg/kg或0.10-0.50mg/kg。对于连续输注,作为Fab片段存在的本发明抗体可以以0.001至100mg/kg体重/分钟、0.0125至1.25mg/kg/min、0.010至0.75mg/kg/min、0.010至1.0mg/kg/min或0.10-0.50mg/kg/min施用1-24小时、1-12小时、2-12小时、6-12小时、2-8小时或1-2小时。对于施用作为全长抗体(具有完整恒定区)存在的本发明抗体,剂量可以是大约1-10mg/kg体重、2-8mg/kg或5-6mg/kg。这种全长抗体通常将通过灌注延长30分钟至35分钟来施用。施用的频率将取决于疾病的严重程度。频率可以从每周三次到每一周或两周一次。

[0100] 此外,组合物可以通过皮下注射向患者施用。例如,10至100mg抗TFPI抗体的剂量可以每周一次、每两周一次或每月一次通过皮下注射向患者施用。

[0101] 如本文所使用的“治疗有效量”指抗TFPI抗体变异体的量或所述抗体和TF(组织因子)、FVII(VII因子)或FX(X因子)组合的量,其是有效增加体内凝血时间所必须的,或者另外在有需要的患者体内产生可测量的益处。精确的量将取决于许多因素,其包括但不限于,治疗组合物的成分和物理特性、预期患者群体、个别患者考虑等,并且可以容易地通过本领域技术人员确定。当彻底考虑这些因素时,重要的是使用足够实现最高效果而不导致副作用的最小量,并且该剂量可以容易地通过本领域的技术人员确定。

[0102] 本发明的药物组合物的剂量可根据各种因素改变,其包括患者的健康状况和体重、疾病的严重程度、药物的种类和施用的途径及时间。组合物可以通过任一通常可接受的途径,例如口服、直肠、静脉内、皮下、子宫内或脑血管内,以每日单次剂量或多次剂量向哺乳动物,包括大鼠、小鼠、家畜人等,施用。

[0103] 实施例

[0104] 以下,将参考实施例进一步详细描述本发明。将对本领域的技术人员显而易见的是这些实施例仅是说明目的,并且不应被解释为限制本发明的范围。

[0105] 实施例1:制备抗TFPI抗体

[0106] 作为抑制X因子活性的抗TFPI抗体(组织因子通道抑制剂),制备可防止凝血抑制的抗体,其可用于治疗或预防血友病。

[0107] 1-1:抗体的选择

[0108] 使用重组人TFPI免疫小鼠,并且从小鼠中切除脾脏。从脾脏中提取B淋巴细胞,由此分离全部RNA,然后合成至cDNA中。从合成的cDNA中,通过PCR(聚合酶链式反应)克隆各种小鼠抗体基因,并且插入到pComb3X噬菌粒中,从而构建显示具有各种序列的抗体片段的抗体文库。为了从抗体文库中选择人TFPI特异性抗体,将TFPI固定的磁珠和抗体文库彼此混合,分离并培养结合于目标抗原的克隆。然后,特异性结合于目标抗原(人TFPI)的克隆(T417或T308克隆细胞)通过ELISA(酶联免疫测定)单独选择,并且抗体基因的氨基酸序列通过测序鉴定。

[0109] 因此,如下表1所示,可以选择特异性结合于人TFPI的克隆T417和克隆T308,并且鉴定其氨基酸序列。

[0110] 下表2是基于Kabat编号系统鉴定的表1克隆抗体的CDR氨基酸序列。

[0111] 表1

[0112]

克隆	可变区	AA 序列	SEQ ID NOS:
T417	VH	EVHLLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSSY AMSWVRQTPDKRLEWVATITTTGGSYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMY YCARQDGNFLMDYWGQGTTVTVSS	1
	VL	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQ GTHFPFTFGSGTKLEIKR	2
T308	VH	EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSNY PMSWVRQTPDKRLEWVATISNSGSYTYYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTAMY YCARQVYGNIEDFDYWGQGTTTLTVSS	3
	VL	DVVMQTQPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLDSD GKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQ GTHFPYTFGGGKLEIKR	4

[0113] 表2

[0114]

克隆	可变区	CDR1	CDR2	CDR3
T417	重链	SYAMS (SEQ ID NO: 5)	TITTTGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 6)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)
	轻链	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 8)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 9)	WQGTHFPF (SEQ ID NO: 10)

[0115]

T308	重链	NYPMS (SEQ ID NO: 11)	TISNSGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO: 12)	QVYGNIEDFDY (SEQ ID NO: 13)
	轻链	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 14)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 15)	WQGTHFPY (SEQ ID NO: 16)

[0116] 1-2:克隆T417和T308克隆抗体的IgG基因

[0117] 从T417和T308克隆细胞中,提取含有编码T417和T308克隆抗体的重链可变区的基因的pComb3X噬菌粒。使用各提取的pComb3X噬菌粒作为模板,使用Accupower Pfu PCR预混料(Bioneer)与含有NotI的正向引物(表3;SEQ ID NO:17)和含有ApaI的反向引物(表3;SEQ ID NO:18)一起进行PCR。PCR在以下条件下进行:94℃10分钟;然后30个循环,每个循环由94℃15秒、56℃30秒和72℃90秒组成;然后72℃10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电

泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。然后,各分离的基因在37°C使用NotI和ApaI限制性内切酶处理12小时以上。使用限制性内切酶处理的基因在1%琼脂糖凝胶上分离。含有IgG4重链恒定区基因的pcIw质粒载体也以相同方式消化并在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S,New England BioLabs (NEB)),将各分离的T417和T308重链可变区基因连接到含有人重链恒定区的线性pcIw载体的KpnI和ApaI位点中。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素(carbenicillin)的LB平板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上,然后在37°C培养12小时以上。然后,从平板选择单一菌落并培养,并且使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405,QIAGEN)由此分离质粒并通过DNA测区鉴定。

[0118] 从T417和T308克隆细胞中提取含有编码T417和T308克隆抗体轻链可变区的基因的pComb3X噬菌粒。使用各提取的pComb3X噬菌粒作为模板,使用Accupower Pfu PCR预混料与含有NotI的正向引物(表3;SEQ ID NO:19)和含有KpnI的反向引物(表3;SEQ ID NO:20)一起进行PCR。PCR在以下条件下进行:94°C10分钟;然后30个循环,每个循环由94°C15秒、56°C30秒和72°C90秒组成;然后72°C10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。然后,各分离的基因在37°C使用NotI和KpnI限制性内切酶处理12小时以上。使用限制性内切酶处理的基因在1%琼脂糖凝胶上分离。pcIw质粒载体也以相同方式消化并在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S,New England BioLabs (NEB)),将各分离的T417和T308轻链可变区基因连接到含有人重链恒定区的线性pcIw载体的KpnI和KpnI位点中。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB平板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上,然后在37°C培养12小时以上。然后,从平板选择单一菌落并培养,并且使用质粒迷你试剂盒由此分离质粒(Cat.No.27405,QIAGEN)并通过DNA测区鉴定。

[0119] 表3

[0120]

名称	DNA序列	SEQ ID NOS:
T417VH-F	GCGGCCGCCATGTATCTGGGTCTGAACTATGTCT TTATCGTGTTTCTGCTGAATGGTGTGCAGTCTGA GGTGCACCTGGTGGAGTCT	17
T417VH Apa-R	NNNNGGGCCCCTTGGTGCTGGCTGAGGAGACGG TGACCGTGGT	18
T417 VL-F	GCGGCCGCCATGGATAGCCAGGCTCAGGTGCTG ATGCTGCTGCTGCTGTGGGTGTCAGGGACTTGCG GGGACGTTGTGATGACCCAGACTCCACT	19
VL-R	NNNNGGTACCAGATTCAACTGCTCATCAGA	20

[0121] 1-3:抗TFPI T417、T308克隆抗体突变体IgG的生成和纯化

[0122] 为了生成和纯化通过小鼠免疫获得的抗TFPI克隆T417和T308克隆,将Expi293F™细胞在转染前一天以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度接种。培养(37°C,8%CO₂,125rpm)24小时后,

加入Expi293™表达培养基 (Cat.No. A1435101, Gibco) 以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度制备30mL的细胞(生存力 $\geq 95\%$)。将30 μ g DNA (pcIw抗TFPI重链:15 μ g, pcIw抗TFPI轻链:15 μ g) 在OptiPro™SEM培养基 (Cat.No. 12309019, Gibco) 中稀释成总体积1.5mL并且在室温培养5分钟。培养5分钟后, 1.5mL稀释的DNA和1.5mL ExpiFectamine™ 293试剂彼此很好的混合并在室温培养20-30分钟。将Expi293F™细胞使用3mL DNA和ExpiFectamine™ 293试剂的混合物处理。悬浮培养(37℃, 8%CO₂, 125rpm) 16-18小时后, 将150 μ L ExpiFectamine™ 293增强剂1 (Cat.No. A14524, Gibco) 和1.5mL ExpiFectamine™ 293增强剂2 (Cat.No. A14524, Gibco) 加入细胞, 然后悬浮培养5天。完成培养后, 将细胞以4000rpm离心20分钟以移除细胞碎片, 并且使上清液通过0.22 μ m过滤器。每30mL培养基制备100 μ L蛋白质A树脂MabSelect Xtra (Cat.No. 17-5269-02, 通用医疗), 以1000rpm离心2分钟以移除保存溶液, 并且洗涤三次, 每次洗涤使用400 μ L蛋白质A结合缓冲液 (Cat.No. 21007, Pierce)。将蛋白质A树脂加入到所制备的培养基中, 然后在室温旋转培养30分钟。将培养基和树脂的混合物加入到皮尔斯离心管-密封盖 (Pierce spin column-snap cap) (Cat.No. 69725, Thermo), 并且使用QIAvac 24Plus (Cat.No. 19413, QIAGEN) 真空歧管提取, 仅使树脂留在管中。树脂使用5mL蛋白质A结合缓冲液洗涤, 然后在200 μ L蛋白质A洗提缓冲液 (Cat.No. 21009, Pierce) 中重悬, 之后在室温培养2分钟并通过以1000rpm离心1分钟洗提。洗脱物通过加入2.5 μ L 1.5M Tris-HCl (pH 9.0) 中和。洗提进行4-6次, 各级分使用Nanodrop 200C (Thermo Scientific) 定量。收集具有其中检测出的蛋白质的级分, 并且在Zeba离心脱盐柱中用使用5mL 7K MWC0 (Cat.No. 0089892, Pierce) 的PBS (磷酸盐缓冲盐水) 缓冲液代替缓冲液。然后, 在还原和非还原条件下进行蛋白质的电泳 (SDS-PAGE) 以最终定量抗体的浓度并确认抗体的状态, 并且将抗体存储在4℃。

[0123] 因此, 如图3所示, 蛋白质电泳 (SDS-PAGE) 表示T417和T308克隆抗体以良好的状态被纯化。

[0124] 实施例2: 通过CDR移植到稳定框架构建人源化抗体

[0125] 当评估TFPI抗原 (全长人TFPI蛋白) (Cat.No. TFPI-875H; Creative Biomart, 美国) 对T417和T308克隆抗体的定量结合亲和力时, 克隆T417抗体显示出最好的效果 (见图8和实施例6)。因此, 对克隆T417进行人源化以克隆308。

[0126] 为了人源化小鼠来源的克隆T417抗体, 选择最广泛用于人源化的CDR移植。具体地, 克隆T417的结构在从结构预测网站, 即Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org/>) 中获得的50个样本中通过显示最高QMEAN、GMQE和同源性值的样本来预测, 并且使用Kabat和Chothia编号方案鉴定除了CDR之外结合抗原和框架的CDR。然后, 使用IgBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) 搜索具有最高同源性的人类框架。从通过搜索获得的一些重链可变区和轻链可变区的一些组合中, 选择在人胚系细胞分析中显示最高形成速率的VH3-21/VK2-30 (de Wildt RM et al., J.Mol.Biol., 285:895-901, 1999; mAbs, 5:3, 445-470)。然后, 构建克隆308, 即克隆T417的人源化抗体, 其包含: 克隆T417的轻链可变区K24, 其为框架序列但是不影响抗体稳定性, 并且还存在于人类抗体序列中; 以及重链可变区N35, 其为基于Kabat编号方案鉴别的CDR序列, 但是在结构术语中是框架序列 (Methods, 34:184-199, 2004; <http://www.vbase2.org/>) (见图4和下表4)。

[0127] 因此, 如图4所示, 克隆308通过人源化克隆T417来构建。

[0128] 下表5是基于Kabat编号系统鉴定的表4克隆抗体的CDR氨基酸序列。

[0129] 表4

[0130]

克隆	可变区	AA序列	SEQ ID NOS:
308	VH	EVQLVESGGGLVLPKGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNW VRQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSVKGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDY WGQGLVTVSS	21
	VL	DVVMVTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSGKTY LNWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGT DFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEI KR	22

[0131] 表5

[0132]

克隆	可变区	CDR1	CDR2	CDR3
308	重链	SYAMN (SEQ ID NO:23)	TITTTGGSYTYYPDSVKG (SEQ ID NO:6)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO:7)
	轻链	KSSQSLLDSGKTYLN (SEQ ID NO:8)	LVSKLDS (SEQ ID NO:9)	WQGTHFPF (SEQ ID NO:10)

[0133] 实施例3:通过计算机建模(in Silico Modeling)绘制克隆308抗体

[0134] 实施例2中构建的克隆308和TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2) 之间的结合通过计算机建模来预测,并且预测可以改善结合抗原的位置(重链-52a、重链-64和轻链27d)(见图5和下表6)。

[0135] 使用同源建模,即BioLuminate模块(Schrodinger,美国),生成结合TFPI的克隆308抗体的结构。为了产生所述结构,使用克隆308的序列通过PDB数据库进行模板搜索。因此,选择具有类似结构和高组合分数的3Q0S(PDB编号)结构。可见除了具有抗原特异性结构的HV CDR H3区之外,3Q0S和克隆308序列相似,并且3Q0S和克隆308序列是适合于产生所述结构的模板。生产全部克隆308模型并与3Q0S的结构比较,并且最终选择最相似的结构。除了HV CDR H3之外,所选择的模型结构相似,并且克隆308和TFPI结构之间的相互影响使用蛋白-蛋白结合预测程序预测(见图17,其中由绿色表示的分子表示308克隆抗体,并且由红色表示的分子表示TFPI抗原)。因此,可以鉴定与其结合的克隆308抗体的预期互补位和人TFPI抗体的预期表位(表8)。基于预期结合结构,突变被引入到克隆308的氨基酸序列中,以便增加克隆308的亲和力。换言之,K64使用Q和E代替以诱导与TFPI的R17离子键合。

[0136] 因此,如下表6所示,DNA序列表示构建了总共两种克隆308突变体。克隆308的重链可变区或轻链可变区和人TFPI抗原之间的预期结合示于图18和19。

[0137] 下表7显示基于Kabat编号系统鉴别的表6克隆抗体的CDR氨基酸序列。

[0138] 下表8显示克隆308抗体的预期互补位和与其结合的人TFPI抗原的预期表位。

[0139] 表6

[0140]

克隆	可变区	AA序列	SEQ ID NOS:
308-2	重链	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFS} SYAMNWVRQAPGK ^{GLEWVSTITGG} SYT YYADSV ^Q GRFTISRDN ^{AKNSLYLQMNSLR} AEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQGT ^{LV} TVSS	24
308-4	重链	EVQLVESGGGLV ^K PGGSLRLS ^{CAASGFTFS} SYAMNWVRQAPGK ^{GLEWVSTITGG} SYT YYADSV ^E GRFTISRDN ^{AKNSLYLQMNSLR} AEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQGT ^{LV} TVSS	25

[0141] 表7

[0142]

克隆	可变区	CDR1	CDR2	CDR3
308-2	重链	SYAMN (SEQ ID NO: 23)	TITGGSYTYYPDSVQ ^G (SEQ ID NO: 26)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)
308-4	重链	SYAMN (SEQ ID NO: 23)	TITGGSYTYYPDSVE ^G (SEQ ID NO: 27)	QDGNFLMDY (SEQ ID NO: 7)

[0143] 表8

[0144]

克隆308的互补位		hTFPIk的表位	结合的类型
HCDR1	S31	Q28	氢键
HCDR2	Y52	E31	氢键
HCDR2	Y52a	E30	氢键
HCDR2	Y56	F12	疏水相互作用
HCDR2	Y58	K36	氢键
HCDR2	Y59	R17	氢键
HCDR2	D61	R17	盐桥
HCDR3	Q98	R34	氢键
LCDR3	D98a	Y23	氢键
LCDR3	G91	R34	氢键
LCDR3	Y92	T21	氢键
LCDR3	Y92	R34	氢键
LCDR3	Y92	F38	氢键
LCDR3	F94	Y19	疏水相互作用

[0145] 实施例4:克隆308抗体突变体的制备

[0146] 4-1:对克隆308抗体突变体的IgG基因进行克隆

[0147] 使用各合成的308-2和308-4基因(Bioneer, 韩国)作为模板,重链可变区使用PrimeSTAR HS DNA聚合酶(Cat.No.R010B;Takara)与含有KpnI的正向引物(表9;SEQ ID

NO:28) 和含有ApaI的反向引物(表9;SEQ ID NO:29) 一起进行PCR。PCR在以下条件下进行: 98°C 2分钟;然后30个循环,每个循环由98°C 10秒、58°C 10秒和72°C 30秒组成;然后72°C 5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(Cat.No.287041,QIAGEN)分离。然后,各分离的基因在37°C使用NotI和ApaI酶处理4小时然后在1%的琼脂糖凝胶上分离。pcIw质粒载体也以相同方式消化并在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S,NEB),将分离的基因连接到线性pcIw载体的KpnI和ApaI中。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB平板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上,并且在37°C培养12小时以上,并从平板选择单一菌落并培养。然后,使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405,QIAGEN)从细胞中分离质粒并通过DNA测区鉴定。

[0148] 表9

[0149]

名称	DNA序列	SEQ ID NOS:
VH Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTACCTGTGGGG	28

[0150]

	AAGTGCAGCTCGTGGAGAGCGGT	
VH Re	AGTGGGAACACGGAGGGCCCCCTTGGTG CTGGCGGATGAGACAGTCACAAGTGTC CC	29

[0151] 4-2:克隆308抗体突变体IgG的生成和纯化

[0152] 为了产生和纯化308-2和308-4克隆,即克隆308-2和308-4抗体突变体,将Expi293F™细胞在转染前一天以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度接种。培养(37°C,8%CO₂,125rpm)24小时后,加入Expi293™表达培养基(Cat.No.A1435101,Gibco)以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度制备30mL的细胞(生存力 $\geq 95\%$)。将30 μ g DNA(pcIw抗TFPI重链:15 μ g,pcIw抗TFPI轻链:15 μ g)在OptiPro™SEM培养基(Cat.No.12309019,Gibco)中稀释成总体积1.5mL,并且在室温培养5分钟。将80 μ L ExpiFectamine™293试剂(Cat.No.A14524,Gibco)加入到1.5mL OptiPro™SEM培养基中(Cat.No.12309019,Gibco)至总体积1.5mL,然后在室温培养5分钟。培养5分钟后,1.5mL稀释的DNA和1.5mL ExpiFectamine™293试剂彼此很好的混合并在室温培养20-30分钟。将Expi293F™细胞使用3mL DNA和ExpiFectamine™293试剂的混合物处理。悬浮培养(37°C,8%CO₂,125rpm)16-18小时后,将150 μ L ExpiFectamine™293增强剂1(Cat.No.A14524,Gibco)和1.5mL ExpiFectamine™293增强剂2(Cat.No.A14524,Gibco)加入细胞,然后悬浮培养5天。完成培养后,将细胞以4000rpm离心20分钟以移除细胞碎片,并且使上清液通过0.22 μ m过滤器。每30mL培养基制备100 μ L蛋白质A树脂MabSelect Xtra(Cat.No.17-5269-02,通用医疗),以1000rpm离心2分钟以移除保存溶液,并且洗涤三次,每次洗涤使用400 μ L蛋白质A结合缓冲液(Cat.No.21007,Pierce)。将蛋白质A树脂加入到所制备的培养基中,然后在室温旋转培养30分钟。将培养基和树脂的混合物加入到皮尔斯离心管-密封盖(Pierce spin column-snap cap)(Cat.No.69725,Thermo),并且使用QIAvac 24Plus(Cat.No.19413,QIAGEN)真空歧管提取,仅使树脂留在管中。树脂使用5mL蛋白质A结合缓冲液洗涤,然后在200 μ L蛋白质A洗提缓冲液(Cat.No.21009,Pierce)中重悬,

之后在室温培养2分钟并通过以1000rpm离心1分钟洗提。洗脱物通过加入2.5μL 1.5M Tris-HCl (pH 9.0)中和。洗提进行4-6次,各级分使用Nanodrop 200C (Thermo Scientific)定量。收集具有其中检测出的蛋白质的级分,并且在Zeba离心脱盐柱中用使用5mL 7K MWC0 (Cat.No.0089892,Pierce)的PBS(磷酸盐缓冲盐水)缓冲液代替缓冲液。然后,在还原和非还原条件下进行蛋白质的电泳(SDS-PAGE)以最终定量抗体的浓度并证明抗体的状态,并且将抗体存储在4℃。

[0153] 因此,总共18种克隆抗体通过将一或多个突变引入到克隆308氨基酸序列的四个位置而制备,这可增强抗体与抗原(人重组TFPI蛋白)的结合并且基于实施例3的预测进行选择(图5和表4-7;308、308-2和308-4克隆抗体的氨基酸序列)。蛋白质电泳(SDS-PAGE)表示抗体以良好的状态被纯化(图6)。在这些抗体中,克隆308-2和克隆308-4具有引入到克隆308的重链赖氨酸(K)中的谷氨酰胺(Q)或谷氨酸(E)突变。

[0154] 表4和6显示抗TFPI克隆抗体的重链和轻链氨基酸序列。

[0155] 表5和7显示基于Kabat编号系统鉴定的表4和6克隆抗体的CDR氨基酸序列。

[0156] 实施例5:制备TFPI KPI-2

[0157] 5-1:克隆人TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2)、兔KPI-2和小鼠TFPI KPI-2基因

[0158] 为了构建人TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2)、兔TFPI KPI-2和小鼠TFPI KPI-2基因(见表10),将限制性内切酶位点NcoI (Cat.No.R0193S,NEB)和NotI (Cat.No.R0189S,NEB)引入到pET22b质粒载体中。各基因(通过GeneScript合成)使用含有NcoI的正向引物(表11;SEQ ID NOs:33~35)和含有NotI的反向引物(表11;SEQ ID NOs:36~38)进行PCR。PCR在以下条件下进行:94℃2分钟;然后30个循环,每个循环由94℃30秒、55℃30秒和72℃30秒组成;然后72℃5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(Cat.No.28704,QIAGEN)分离。然后,三种分离的基因在37℃使用NotI和ApaI限制性内切酶处理4小时。处理的基因在1%的琼脂糖凝胶上分离。pET22b质粒载体也以相同方式使用NcoI和NotI消化并在琼脂糖凝胶上分离。制备的pET22b NcoI/NotI载体和插入物以1:3的摩尔比混合,然后向其中加入T4 DNA连接酶(Cat.No.M0202S;NEB)和连接酶缓冲液(Cat.No.B0202S;NEB),然后在25℃培养3小时。将5μL连接产物加入到DH5α(化学感受态细胞;Invitrogen)并在冰上培养10分钟。为了热休克,细胞在42℃培养1分钟,并且为了细胞恢复,细胞在37℃在SOC培养基中悬浮培养40分钟。50μL转化的DH5α细胞接种在羧苄青霉素平板上,并且在37℃培养12小时以上。选择6种生产的克隆,并在37℃以220rpm悬浮培养12小时以上。使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405,QIAGEN)从含有质粒的细胞中分离质粒。所分离的质粒通过DNA测序鉴定。

[0159] 下表10显示每种动物类型的TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2)的氨基酸序列。

[0160] 表10

[0161]

类型	AA序列	SEQ ID NOS:
人	KPDFCFLEEDPGICRGYITRYFYNNQTKQCERFKYGGCLGNM NNFETLEECKNICEDG	30
兔	KPDFCFLEEDPGICRGFMTRYFYNNQSKQCEQFKYGGCLGNS NNFETLEECRNTCEDP	31
小鼠	RPDFCFLEEDPGLCRGYMKRYLYNNQTKQCERFVYGGCLGN RNNFETLDECKKICENP	32

[0162] 下表11显示用于实施例5的TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2) 基因克隆的引物。

[0163] 表11

[0164]

名称	DNA序列	SEQ ID NOS:
HTK2 For	CCATGGAAACCCGACTTTTGCTTCCTGGA	33
RTK2 For	CCATGGAAACCCGATTTCTGCTTTCTGGAG	34
MTK2 For	CCATGGAGACCTGACTTCTGCTTTCTGGAG	35
HTK2 Re	GCGGCCGCCTAGCCGTCTCACAGATGTTCTTG	36
RTK2 Re	GCGGCCGCCTAGGGTCTCACAGGTGTTG	37
MTK2 Re	GCGGCCGCCTAGGGTCTCACAGATTTCTTGCATT	38

[0165] 5-2: 人TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2)、兔TFPIKPI-2和小鼠TFPI KPI-2蛋白质的生成和纯化

[0166] 将鉴定的TFPI基因序列的克隆转化到BL21 (DE3) 细菌(化学感受态细胞; Cat.No.C2527I, NEB) 中。将各人TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2)、兔TFPI KPI-2和小鼠TFPI KPI-2基因加入到细菌细胞中, 然后将其在冰上培养10分钟。为了热休克, 将细胞在42℃培养1分钟, 并且为了细胞恢复, 将细胞在37℃在SOC中悬浮培养40分钟。将50转化的细菌细胞接种在羧苄青霉素平板上并且在37℃培养12小时以上。将生产的克隆之一接种在含有羧苄青霉素的LB培养基中, 并在37℃在220rpm悬浮培养12小时以上。次日, 将培养的细菌细胞接种在500ml SB-葡萄糖培养基中, 并在37℃在220rpm悬浮培养2小时。当细菌培养基的OD达到0.6时, 使用NanoDrop加入0.1mM IPTG进行诱导。然后, 将细胞在25℃在180rpm悬浮培养12小时以上。细菌细胞通过以6000rpm离心20分钟而恢复, 并且将冷冻和解冻重复三次以恢复周质区的蛋白质表达, 然后离心。将上清液通过0.22μm过滤器以移除细胞碎片, 然后离心。纯化过程使用Talon金属亲和性树脂 (Cat.No.635501, Clonetech) 进行, 并且所述树脂使用磷酸盐缓冲液稳定, 并且使用过滤的培养基在4℃培养12小时以上。洗涤过程使用10mM咪唑进行, 并且洗提过程使用250mM咪唑进行。纯化的蛋白质在NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶上电泳, 然后分离的蛋白质通过考马斯蓝染色可视化。洗提的蛋白质通过Vivaspin (Cat.No.28-9322-18, GE) 柱过滤, 并且缓冲液使用PBS (磷酸盐缓冲的盐溶液) 缓冲液替代。

[0167] 因此, 如图7所示, 蛋白质电泳 (SDS-PAGE) 表示每种动物类型的TFPI KPI-2 (Kunitz结构域2) 蛋白质在良好状态中纯化。

[0168] 实施例6: 测量抗TFPI抗体对TFPI抗原的定量亲和力

[0169] 使用Biacore T-200 (通用医疗, 美国) 生物传感器测量作为纯化的抗TFPI抗体的

克隆T417、克隆T308、克隆308、克隆308-2或克隆308-4对重组人TFPI的定量亲和力。从HEK293细胞中纯化的TFPI (Cat.No.TFPI-875H, Creative Biomart, 美国) 通过胺羧基反应固定在CM5芯片(通用医疗, 美国) 上至200的Rmax, 然后在HBS-EP缓冲液(10mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005%表面活性剂P20) 中连续稀释的克隆T417、克隆T308、克隆308、克隆308-2或克隆308-4抗体以0.078-10nM的浓度以30 μ L/min流速在芯片上运行120秒来结合, 并运行600秒来解离(表12)。10mM的甘氨酸-HCl (pH 1.5) 以30 μ L/min的流速运行30秒, 从而诱导与TFPI结合的抗体解离。动力学速率常数(结合速率常数(K_{on}) 和解离速率常数(K_{off})) 和平衡解离常数(K_D) 方面的亲和力使用Biacore T-200评估软件评估。

[0170] 因此, 如下表13和图8所示, 显示出所制备的克隆308-2和克隆308-4抗体的亲和力高于克隆308的亲和力。

[0171] 表12

[0172]

SPR	Biacore T200
芯片	CM5

[0173]

电泳缓冲液	HBS-EP pH7.4
流速	30 μ L/min
结合 / 解离时间	120秒 / 600秒
IgG 浓度	0.3125~5nM, 1/2连续稀释
再生	10mM 甘氨酸-HCl pH1.5, 30秒

[0174] 表13

[0175]

	K_{on}	K_{off}	K_D
T417	5.3×10^6	3.5×10^{-5}	6.7×10^{-12}
T308	4.4×10^6	4.2×10^{-5}	9.4×10^{-12}
308	3.5×10^6	1.7×10^{-4}	5.0×10^{-11}
308-2	3.0×10^6	9.9×10^{-5}	3.3×10^{-11}
308-4	3.5×10^6	8.2×10^{-5}	2.4×10^{-11}

[0176] 实施例7: 测量Fxa活性

[0177] 凝血通过内源性途径和外源性途径诱导, 并且两种途径通过激活X因子的共同途径而激活凝血酶, 从而形成纤维蛋白以诱导凝血。此外, TFPI由Kunitz 1 (K1)、Kunitz 2 (K2) 和Kunitz 3 (K3) 结构域组成。已知K1结构域与FVIIa结合, 并且K2结构域与FXa结合。已知凝血通过TFPI和血液凝固因子之间的结合而抑制。因此, 为了确定抗TFPI候选抗体对凝血过程的作用, 评估FXa活性。测定系统仅由FXa、TFPI和候选抗体组成, 以便最小化一些因子的影响。当候选抗体与TFPI结合时, 其不抑制FXa的功能, 并且因此FXa活性出现。然而, 当候选抗体与TFPI没有有效结合时, TFPI结合FXa从而抑制FXa的活性, 并且因此颜色发展的程度降低。因此, 没有通过TFPI抑制的FXa的剩余活性通过底物降解的程度测量。本文所使用的底物是FXa特异性底物S-2765, 并且降解底物以生成在405nm可测量的发色pNA。该测量方法基于酰胺分解检测法。

[0178] 各FXa、TFPI、mAb2021和S-2765参考下表14使用测定缓冲液(20mM HEPES、150mM NaCl、1mg/mL BSA、0.02%NaN₃、5mM CaCl₂、pH7.4)稀释,并分配在1.5ml管中。

[0179] 表14

[0180]

物质)	稀释前浓度 (nM)	工作浓度 (nM)	其他
FXa	2nM	0.5nM	
TFPI	40nM	10nM	

[0181]

S-2765	2mM	0.5mM	
标准曲线	10nM	0.02, 0.1, 0.5, 2.5nM	FXa
mAb2021	160nM	0.625, 2.5, 10, 40nM	阳性对照

[0182] 将50 μ L的各阳性对照(mAb2021,抗TFPI Ab,Novo Nordisk)和抗TFPI候选抗体加入到各孔中至40、10、2.5或0.625nM的浓度。将50 μ L的40nM TFPI溶液加入到各孔中,并且使其在室温静置30分钟。为了获得标准曲线,将50 μ L的FXa溶液以不同浓度加入到各孔中,并且将50 μ L的2mM FXa溶液加入到各孔中,并且在37 $^{\circ}$ C培养10分钟。将50 μ L的2mM S-2765溶液加入到各孔中,并且在37 $^{\circ}$ C培养30分钟。然后,在405nm波长下各孔的吸光度通过端点模式中的酶标仪(microplate reader)读取。

[0183] 因此,如图9所示,在抗TFPI候选抗体中作为嵌合抗体的克隆T308和克隆T417两者均显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加,其表示两种抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与作为阳性对照(mAb2021,抗TFPI Ab)的没有使用TFPI处理的样本比较,克隆T308在使用40nM处理样本中抑制TFPI的作用为91%,并且在使用10nM处理样本中抑制TFPI的作用为89%。与作为阳性对照(mAb2021,抗TFPI Ab)的没有使用TFPI处理的样本比较,克隆T417显示在用40nM处理的样本中抑制TFPI的作用为89%,并且在使用10nM处理样本中抑制TFPI的作用为72%。当效果在10nM的TFPI浓度下比较时,可见克隆T417比克隆T308具有更好的TFPI抑制活性。

[0184] 此外,如图10所示,克隆308通过在上述测定中确定具有更好效果的克隆T417的人源化而获得。克隆308还显示吸光度以浓度依赖性方式增加,其表示它可以抑制TFPI。与阳性对照(mAb2021,抗TFPI Ab)比较,克隆308显示出在使用40nM处理的样本中TFPI抑制活性为大约85.1%,并且在使用10nM处理的样本中TFPI抑制活性为大约58.2%,表示其对在用10nM处理的样品中显示TFPI抑制活性为78.4%的克隆T417具有较差的作用。

[0185] 此外,如图11所示,进行回复突变以增加克隆308的作用,并且获得克隆308-2和克隆308-4。可见克隆308-2和克隆308-4两者以浓度依赖性方式抑制TFPI。并且,在使用40nM和10nM处理的样本中,可见克隆308-2和克隆308-4的TFPI抑制活性与克隆308比较增加。在40nM的浓度,与阳性对照(mAb2021,抗TFPI Ab)比较,克隆308-2和克隆308-4显示出TFPI抑制活性分别为85%和82%,但是在10nM的浓度,克隆308-2显示出TFPI抑制活性为72%,并且克隆308-4显示出TFPI抑制活性为78%,其高于克隆308-2的TFPI抑制活性。此外,这些抗体与表达TFPI抑制活性为77%的克隆T417嵌合抗体相当。

[0186] 实施例8:测量TF/FVIIa/FXa复合物

[0187] 凝血外源性途径中最重要的因子包括TF (组织因子)、FVII (VII因子)、FX (X因子)等。当TF和FVIIa通过外部信号形成复合物时,FX被活化为FXa。然后,FXa将凝血素活化为凝血酶,然后其将纤维蛋白原剪切为起凝血作用的纤维蛋白。然而,TFPI (组织因子通道抑制剂)通过结合FXa抑制FXa的功能,从而干扰凝血。为了评估上述途径中抗TFPI抗体MG1113的作用,进行TF/FVIIa/FXa复合物测定。在TFPI与抗TFPI抗体MG1113一同存在或独立于抗TFPI抗体存在的情况下,通过TF/FVIIa复合物产生和抑制FXa的程度基于由FXa降解的底物的颜色发展程度测量,从而评估抗TFPI抗体MG1113的作用。换言之,由于抗TFPI抗体MG1113的TFPI抑制效果增加,FXa的产生增加,并且降解的底物的量增加,导致吸光度增加。

[0188] 在1.5mL管中,TF (4500L/B, Sekisui diagnostics)、FVIIa (Novo Nordisk, Novo Seven)和FX (PP008A, Hyphen biomed)使用测定缓冲液 (20mM HEPES、150mM NaCl、1mg/mL BSA、0.02%NaN₃、5mM CaCl₂、pH 7.4)稀释至下表15所示的浓度,从而制备混合物溶液。

[0189] 表15

[0190]

物质	TF	FVIIa	FX
浓度	6ng/mL	800nM	30nM

[0191] 将70μL混合物溶液加入到96孔板的各孔中。向空白孔,加入70μL的测定缓冲液。将各孔在37°C培养15分钟,然后将30μL的TFPI加入到各孔至50nM的浓度。然而,将30μL的测定缓冲液加入到各空白孔和阳性对照孔 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)中。将30μL的抗TFPI抗体加入到各孔中至12.5、25、50和100nM的浓度。向各空白孔、阳性对照孔 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)和阴性对照孔 (样本不使用抗TFPI抗体处理),加入30μL的测定缓冲液,然后在37°C培养15分钟。将20μL的EDTA (E7889, Sigma-Aldrich)加入到各孔中至50mM的浓度。然后,将50μL的S2765加入到各孔中至200μM的浓度,然后在37°C培养10分钟。然后使用酶标仪测量在405nm的各孔吸光度。

[0192] 因此,如图12所示,确认在抗TFPI候选抗体中作为嵌合抗体的克隆T308和克隆T417。显示出两种抗体都显示吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,表示两种抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与阳性对照 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)比较,克隆T308显示出在使用100nM处理的样本中抑制TFPI效果为100%,并且在使用50nM处理的样本中抑制TFPI效果为大约87%。与阳性对照 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)比较,克隆T417显示出使用100nM和50nM处理的样本中抑制TFPI效果为100%。因此,可见克隆T417的TFPI抑制活性高于克隆T308的TFPI抑制活性。

[0193] 此外,如图13所示,克隆308通过具有比克隆T308更好效果的克隆T417的人源化而获得。克隆308还显示吸光度以浓度依赖性方式增加,表示它抑制TFPI。与阳性对照 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)比较,克隆308显示出在使用100nM处理的样本中TFPI抑制活性为大约94.3%,并且在使用50nM处理的样本中TFPI抑制活性为大约54.2%,表示克隆308比显示TFPI抑制活性为100%的克隆T417的作用差。

[0194] 此外,如图14所示,进行回复突变以增加人源化克隆308抗体的作用,并且获得克隆308-2和克隆308-4。可见克隆308-2和克隆308-4两者以浓度依赖性方式抑制TFPI。此外,在使用50nM处理的样本中,可见克隆308-2和克隆308-4的TFPI抑制活性与克隆308比较增加。在100nM和50nM的浓度,与阳性对照 (样本不使用抗TFPI抗体或TFPI处理)比较,克隆

308-2和克隆308-4均显示出TFPI抑制活性为100%。在25nM的浓度,克隆308-2显示出TFPI抑制活性为37.8%,并且克隆308-4显示出TFPI抑制活性为68.4%,其高于克隆308-2的TFPI抑制活性。然而,可见回复突变抗体的TFPI抑制活性比克隆T417嵌合抗体的TFPI抑制活性低。

[0195] 实施例9:测量凝血酶生成

[0196] 凝血机制被分为内源性途径和外源性途径。已知外源性途径中的TF(组织因子)的功能是凝血机制中的活性反馈功能,并且是产生非常快的凝血酶的爆炸性生产。在该凝血机制中最重要的因子包括TF(组织因子)、FVII(VII因子)、FX(X因子)等。当TF和FVIIa通过外部信号形成复合物时,FX被活化为FXa。然后,FXa将凝血素活化为凝血酶,然后其将纤维蛋白原剪切为起凝血作用的纤维蛋白。然而,TFPI(组织因子通道抑制剂)通过结合FXa抑制FXa的功能,从而干扰凝血。凝血酶生成测定包括:使用要评估的试验样本处理血浆;然后,基于在低PPP试剂的存在下产生的凝血酶将荧光底物转化为荧光产物时产生的荧光产物的量;以及使用凝血酶校准仪的已知量校准凝血酶的检查量,从而测量凝血酶的实际生成量。

[0197] 将20 μ L的低PPP试剂溶液加入到预热的96孔板(圆底Immulon 2HB 96孔板)的样本加载孔中,并且将20 μ L的校准溶液加入到该板的校准孔中。将抗FVIII候选抗体在预溶解样本稀释液(FVIII缺乏的血浆)中以0.3125、0.625、1.25或2.5nM的浓度稀释,然后在室温培养10分钟使其可结合FVIII。

[0198] 将80 μ L的各样本稀释液加入到各校准和空白孔中,并且将80 μ L稀释的抗体溶液加入到各剩余孔中。按下软件屏幕底部的开始按钮以执行洗涤。洗涤在进口管置于37 $^{\circ}$ C水浴中的蒸馏水中且出口管置于空容器中的情况下进行。完成洗涤后,按下下一个按钮以执行一个空的过程。进口管置于加热到37 $^{\circ}$ C的FluCa溶液中,并且实现使用所述溶液填充管子。出口管安装在分配器中的M孔中,然后按下下一个按钮以将20 μ L的FluCa溶液自动分配到各孔中,之后进行摇动过程并且开始分析。

[0199] 因此,如图15所示,凝血酶生成测定使用通过上述Fxa活性测定和TF/FVIIa/FXa复合物测定选择的克隆T417嵌合抗体和人源化克隆308抗体进行。在2.5nM,与仅使用样本稀释液处理的空白比较,克隆T417显示出凝血酶峰值增加208%,并且与空白比较,克隆308显示出凝血酶峰值增加162%。在ETP表示凝血酶总生成量的情况下,在使用2.5nM处理的样本中,与阴性对照(没有抗体)比较,克隆T417显示出ETP增加131%,并且克隆308显示出ETP增加122%。当比较两种抗体时,显示出克隆T417具有比克隆308抗体更好的作用。

[0200] 此外,如图16所示,对于在进行回复突变后通过Fxa活性测定和TF/FVIIa/FXa复合物测定选择的克隆308-2和克隆308-4,为了增加人源化克隆308抗体的作用,进行凝血酶生成测定。显示克隆308-2和克隆308-4两者均显示出凝血酶生成以浓度依赖性方式增加。当比较使用2.5nM处理的样本时,可见克隆308-2和克隆308-4与克隆308抗体比较显示出凝血酶峰值和总凝血酶生成增加。在使用2.5nM处理的样本中,与阴性对照(没有抗体)比较,克隆308-2和克隆308-4显示出凝血酶峰值分别增加183%和191%,并且ETP值在克隆308-2和克隆308-4两者中均为126%,表明克隆308-2和克隆308-4具有增加的生成凝血酶的能力。此外,两种抗体产生凝血酶的能力比克隆308抗体产生凝血酶的能力好,并且与克隆T417嵌合抗体产生凝血酶的能力相当。

[0201] 实施例10:预测抗TFPI抗体308-4克隆和Kunitz结构域-2之间的结合

[0202] 作为抑制X因子活性的抗TFPI (组织因子通道抑制剂) 抗体, 构建可防止抑制凝血的用于治疗或预防血友病的抗体

[0203] 凝血通过内源性途径和外源性途径而诱导, 并且两种途径通过活化X因子的共同途径来活化凝血酶, 从而形成纤维蛋白以诱导凝血。此外, TFPI由Kunitz 1 (K1)、Kunitz 2 (K2) 和Kunitz 3 (K3) 结构域组成。已知K1结构域与FVIIa结合, 并且K2结构域与FXa结合。

[0204] 如在韩国专利申请第10-2015-0026555号, 发明名称为“新型抗TFPI抗体以及包含所述抗体的组合物”, 中描述的, 制备了作为抗TFPI抗体的308-4克隆。可见308-4克隆具有 $2.64 \times 10^{-11} \text{M}$ 或更低, 优选 $2.52 \times 10^{-11} \text{M}$ 或更低, 更优选 $2.4 \times 10^{-11} \text{M}$ 或更低的 K_D 。

[0205] 在本发明中, 尝试通过亲和力成熟的308-4克隆制备对TFPI具有较高亲和力的抗体。

[0206] 为了预测抗TFPI抗体308-4克隆和Kunitz结构域-2之间的结合, 使用308-4克隆的氨基酸序列在Igbblast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中进行同源搜索。因此, 发现3Q0S (PDB号码) 结构相似。基于3Q0S, 308-4克隆的结构使用作为BioLuminate模块 (Schrodinger, 德国) 的同源建模绘制。所绘制的结构使用蛋白质-蛋白质结合预测程序PIPER进行Kunitz结构域-2的对接模拟以获得结合预测数据。为了从获得的结合结构中选择互补位, 分析308-4克隆和Kunitz结构域-2之间的相互作用, 并且选择产生共价键的308-4克隆的氨基酸 (表16)。所选互补位使用bioluminate模块进行亲和力成熟以计算各互补位的结合能值并预测通过使用其他氨基酸取代而改变的结合能值。因此, 选择具有稳定结合能值的氨基酸并且在引物设计中反映 (表17)。

[0207] 下表16显示所选抗TFPI抗体308-4克隆的氨基酸, 其被确定在308-4克隆和Kunitz结构域-2之间的相互作用中产生非共价键。

[0208] 下表17显示所选表16的氨基酸, 其通过亲和力成熟被确定具有互补位的稳定结合能值。

[0209] 表16

[0210]

可变区	所选氨基酸 (基于kabat)
重链	S31, T52a, Y56, E64, N98
轻链	S31a, T92, H93

[0211] 表17

[0212]

可变区	所选氨基酸
VH_S31	H, K, R, T, Y, I, L
VH_T52a	F, Y, L, H, K, R, I
VH_Y56	H, R, K
VH_E64	Q, D, H
VH_N98	F, H, K, Q, R, Y
VL_S31a	I, L, N, Q, R, F, K, T, V
VL_T92	F, Y, I, N
VL_H93	Y, L, I, Q, N, K

[0213] 实施例11:使用酵母展示scFv文库通过308-4的亲合力成熟制备新型抗体

[0214] 11-1:构建酵母展示scFv文库

[0215] 为了将突变引入酵母文库,三个重链可变区片段和两个轻链可变区片段经过聚合物链式反应(PCR)。具体地,对于重链可变区片段1的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:40)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:41至48)一同用作模板;对于重链可变区片段2的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:49)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:50至61)一同用作模板;以及对于重链可变区片段3的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:62)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:63至69)一同用作模板。各片段的PCR使用AccuPower Pfu PCR PreMix (CAT.No.K-2015,Bioneer)进行。PCR在以下条件下进行:95°C2分钟;然后30个循环,每个循环由95°C30秒、55°C30秒和72°C60秒组成;然后72°C10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,CAT.No.28706,QIAGEN)分离。对于轻链可变区片段1的PCR,抗TFPI 308-4克隆的轻链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:72)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:73至82)一同用作模板;以及对于轻链可变区片段2的PCR,抗TFPI 308-4克隆的轻链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:83)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:84至87)一同用作模板。各片段的PCR在以下条件下使用AccuPower Pfu PCR PreMix (Bioneer)进行:95°C2分钟;然后30个循环,每个循环由95°C30秒、55°C30秒和72°C60秒组成;然后72°C10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离。

[0216] 将所得重链可变区片段基因调整为1:1:1的摩尔比,并且在PCR中与正向引物(表18;SEQ ID NO:70)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:71)一同用作模板。片段基因的PCR在以下条件下使用Takara primer star PCR premix (CAT.NO.R040B,Takara)进行:95°C2分钟;然后20个循环,每个循环由95°C10秒、55°C20秒和72°C30秒组成;然后72°C5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离,从而获得重链可变区基因。

[0217] 将所得轻链可变区片段基因调整为1:1的摩尔比,并且在PCR中与正向引物(表18;SEQ ID NO:91)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:92)一同用作模板。片段基因的PCR在以下条件下使用Takara primer star PCR premix (CAT.NO.R040B,Takara)进行:95°C2分钟;然后20个循环,每个循环由95°C10秒、55°C30秒和72°C40秒组成;然后72°C5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离,从而获得轻链可变区基因。

[0218] 将所得重链和轻链可变区基因调整为1:1的摩尔比,并且在PCR中与正向引物(表18;SEQ ID NO:93)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:94)一同用作模板。基因的PCR在以下条件下使用Takara primer star PCR premix (Takara)进行:95°C2分钟;然后20个循环,每个循环由95°C10秒、55°C20秒和72°C30秒组成;然后72°C5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离,从而构建308-4亲合力成熟scFv文库基因。200ng构建的文库基因与1μg施用限制性内切酶NheI (CAT.No.R0131L,NEB)和BamHI (CAT.No.R0136L,NEB)处理的pCTCON

基因混合,并且将混合物转化到酵母中(EBY100电感受态细胞)。将所转化的酵母细胞悬浮在100mL YPD培养基中,并在30℃在200rpm震荡培养1小时。将所培养的酵母接种至1L SD培养基中,并且在30℃在200rpm培养12小时以上,之后将其离心以移除上清液,并且在酵母存储缓冲液中重悬,并保存在-70℃。为了确定文库的大小,在转化后1小时收集100μl培养基,通过连续稀释法在SD板上接种,在30℃培养12小时以上,然后经过菌落计数。

[0219] 下表18显示用于构建酵母展示scFv文库的引物。

[0220] 表18

[0221]

名称	核酸序列	SEQ ID NOS:
VH FR1 Fo	GAA GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGT	40
VH FR1 Re_S	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA GCT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	41
VH FR1 Re_H	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA ATG GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	42
VH FR1 Re_K	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA TTT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	43
VH FR1 Re_R	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA TCT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	44
VH FR1 Re_T	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AGT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	45
VH FR1 Re_Y	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA ATA GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	46
VH FR1 Re_I	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AAT GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	47
VH FR1 Re_L	CGG GGC CTG ACG AAC CCA GTT CAT GGC ATA AAG GCT GAA GGT GAA GCC GCT CGC TGC	48
VH FR2 Fo	TAT GCC ATG AAC TGG GTT CGT CAG GCC	49
VH FR2 Re_T-YH-EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	50
VH FR2 Re_T-RK-EQDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	51
VH FR2 Re_FYLLH-YH-E QDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	52

[0222]

VH FR2 Re_FY LH-RK-E QDH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	53
VH FR2 Re_KRI-YH-EQ DH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT GTX1 TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	54
VH FR2 Re_KRI-RK-EQ DH	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC X3TX2 AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	55
VH FR2 Re_T-YH-EQDH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	56
VH FR2 Re_T-RK-EQDH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC GGT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	57
VH FR2 Re_FY LH-YH-E QDH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	58
VH FR2 Re_FY LH-RK-E QDH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC TWR TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	59
VH FR2 Re_KRI-YH-EQ DH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT ATR TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	60
VH FR2 Re_KRI-RK-EQ DH #2	GTT ATC GCG GGA AAT GGT GAA GCG CCC NTS AAC GCT ATC GGC GTA GTA GGT TYT TGA CCC ACC THT TGT GAT GGT GCT GAC CCA TTC CAA GCC	61
VH FR3 Fo	GGG CGC TTC ACC ATT TCC CGC GAT AAC	62
VH FR3 Re_N	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATT GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	63
VH FR3 Re_F	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA AAA GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	64
VH FR3 Re_H	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATG GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	65
VH FR3 Re_K	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TTT GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	66
VH FR3 Re_Q	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TTG GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	67
VH FR3 Re_R	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA TCT GCC	68

[0223]

	ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	
VH FR3 Re_Y	GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA ATA GCC ATC CTG GCG CGC GCA ATA ATA TAC CGC	69
VH最终Fo	GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GCT AGC GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	70
VH最终Re	GGA GCT CAC AGT CAC CAG CGT GCC CTG GCC CCA ATA ATC CAT CAG AAA	71
VL FR1 Fo	GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	72
VL FR1 Re_S	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC GGA GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	73
VL FR1 Re_I	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	74
VL FR1 Re_L	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAG GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	75
VL FR1 Re_N	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AGC GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	76
VL FR1 Re_Q	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TTG GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	77
VL FR1 Re_R	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TCT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	78
VL FR1 Re_F	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAA GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	79
VL FR1 Re_K	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC TTT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	80
VL FR1 Re_T	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AGT GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	81
VL FR1 Re_V	GAG CCA ATT CAG ATA CGT CTT GCC GTC AAC GTC CAG CAG CGA CTG GCT TGA TTT GCA	82
VL FR2 Fo	GAC GGC AAG ACG TAT CTG AAT TGG CTC CAG	83
VL FR2 Re_T-YH	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA GTR GGT GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	84
VL FR2 Re_T-LIHQNK	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA WWK GGT GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	85
VL FR2 Re_FYIN-YH	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA GTR AWW GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	86

[0224]

VL FR2 Re_FYIN-LIHQ NK	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA CGG AAA WWK AWW GCC CTG CCA GCA ATA GTA GAC GCC	87
VL最终Re	GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	88
VL最终Fo Sfil	Cgtggcccaggcgccc GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	89
VL最终Fo NruI	Cta TCG CGA TTG CAG TGG CAC TGG CTG GTT TCG	90
VL重叠Fo	GGC ACG CTG GTG ACT GTG AGC TCC Gga ggc ggc gga agt ggc gga gga ggc agc ggc gga ggc ggg agt GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	91
VL最终Re	GTC CTC TTC AGA AAT AAG CTT TTG TTC GGA TCC GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	92
VH同源重组	GCT CTG CAG GCT AGT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT GGT TCT gct agc	93
VL同源重组	TTG TTA TCA GAT CTC GAG CTA TTA CAA GTC CTC TTC AGA AAT AAG CTT TTG TTC GGA TCC	94

[0225] 11-2: 抗体选择

[0226] 将在实施例11-1中构建的文库酵母细胞接种在SD培养基中,并且在30℃在200rpm培养12小时以上,然后将培养基使用SG培养基替代,并将细胞在25℃在200rpm培养12小时以在酵母表面表达抗体。然后,将通过离心收集的酵母细胞使用PBSM(含有3%BSA的PBS)缓冲液洗涤,在1mL PBSM缓冲液中重悬,并且在室温与生物素结合的重组人TFPI蛋白一同培养1小时。与重组人TFPI蛋白一同培养的酵母细胞使用PBSM洗涤,然后使用链霉亲和素微球(CAT.NO.130-048-101,Miltenyi biotech)在冰上培养15分钟。然后,将细胞使用PBSM缓冲液洗涤一次,在PBSM缓冲液中重悬,然后通过MACS柱(CAT.NO.130-042-901,Miltenyi biotech)以分离TFPI蛋白结合的酵母细胞。将所分离的酵母细胞接种在SD培养基中并且培养48小时以上,并重复上述程序两次,从而选择抗体。

[0227] 11-3: 通过FACS制备单个克隆

[0228] 从酵母展示文库中收集最终扩增的单克隆,然后在30℃在SD培养基中以200rpm培养12小时。然后,培养基使用SG培养基替代,并将细胞在25℃在200rpm培养12小时以上,从而在酵母表面表达抗体。然后,通过离心回收的酵母细胞使用PBSF(含有1%BSA的PBS)缓冲液洗涤,在50μlPBSM缓冲液中重悬,然后在室温与生物素结合的重组人TFPI蛋白和抗c-myc小鼠抗体(CAT.No.M4439,Sigma)一同培养30分钟。将所培养的细胞使用PBSF洗涤,在50μlPBSM缓冲液中重悬,然后在光屏蔽条件下与FITC结合的抗小鼠抗体(CAT.No.F0257,Sigma)和PE结合的链霉素亲和素在冰上培养15分钟。然后,将细胞使用PBSM缓冲液洗涤,在500μlPBSM缓冲液中重悬,然后通过FACS选择在FITC和PE波长范围内显示高值的克隆,从而获得单个克隆。

[0229] 因此,如下表19所示,可以选择特异性结合人TFPI的克隆,并且分析其氨基酸序

列。在韩国专利申请第10-2015-0026555中表述的抗体中,用于本发明的抗体描述为“2015-26555_(在先申请的SEQ ID NO)”。

[0230] 下表20显示表19的克隆抗体的CDR氨基酸序列,基于Kabat编号系统。

[0231] 表19

[0232]

克隆	可变区	氨基酸序列	SEQ ID NOS:
1001	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVDGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	95
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1015	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSHTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	97
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1021	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVDGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLVTVSS	98
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL	96

[0233]

		NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	
1023	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTTYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	99
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1024	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM <u>S</u> WV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTTYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	100
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>L</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	101
1104	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGS <u>H</u> TYTYADSV <u>Q</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	102
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
1123	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGS <u>H</u> TYTYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGH <u>F</u> LMDYWG QGTLVTVSS	104
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1202	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTTYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLKMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	105
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1208	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGS <u>H</u> TYTYADSV <u>E</u> GRFTISRDN	104

[0234]

		AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDG <u>H</u> FLMDYWG QGTLVTVSS	
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>Y</u> LPFTFGQGTKVEIKR	106
1214	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	2015-26555 _(25)
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> PFTFGQGTKVEIKR	103
1216	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>S</u> H <u>Y</u> AMN <u>W</u> VRQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVEGRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDG <u>H</u> FLMDYW GQGTLVTVSS	107
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> LPFTFGQGTKVEIKR	108
1223	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDG <u>H</u> FLMDYWG QGTLVTVSS	109
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> PFTFGQGTKVEIKR	96
1224	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM <u>S</u> W <u>V</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADS <u>V</u> DGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	100
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> PFTFGQGTKVEIKR	96
1232	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADS <u>V</u> DGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDG <u>H</u> FLMDYWG QGTLVTVSS	98
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF	103

[0235]

		TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	
1234	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSY ^H TY ^A ADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	110
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLEISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	111
1238	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSY ^H TY ^A ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLVTVSS	109
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDV ^D DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
1243	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGS ^H TY ^A ADSVHGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLVTVSS	112
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1248	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGS ^H TY ^A ADSV ^D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLVTVSS	113
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
3007	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF ^T SYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITLGGSY ^H TY ^A ADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	114
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDL ^D DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	101
3016	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGS ^H TY ^A ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG	115

[0236]

		QGTLVTVSS	
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	116
3024	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS ^W V RQAPGKGLEWVSTITGGSYTY ^Y ADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	117
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	116
3115	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN ^W V RQAPGKGLEWV ^G TITGGSH ^T TY ^Y ADSV ^D GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	117
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD ^V DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTH ^F PFTFGQGTKVEIKR	103
3120	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN ^W V RQAPGKGLEWVSTITGGSYTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD ^G Y ^F LMDYWG QGTLVTVSS	118
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD ^I DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTH ^F PFTFGQGTKVEIKR	96
3131	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS ^W V RQAPGKGLEWVSTITGGSYTY ^Y ADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQD ^G Q ^F LMDYWG QGTLVTVSS	119
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD ^I DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTH ^F PFTFGQGTKVEIKR	96
3203	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS ^W V RQAPGKGLEWVSTITGGSYTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGILVTVSS	120
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD ^L DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTH ^F PFTFGQGTKVEIKR	101

[0237]

3241	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	2015-26555 (25)
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
4011	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF ^Y SYAMNHW VRQAPGKGLEWVSTITTTGGSHTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG GQGLVTVSS	121
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDV ^D DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H L ^P FTFGQGTKVEIKR	122
4017	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTY ^Y ADSV ^Q GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGY ^F LMDYWG QGTLVTVSS	123
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
4034	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSHTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGY ^F LMDYWG QGTLVTVSS	124
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	96
4041	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM ^S WV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSHTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGY ^F LMDYWG QGTLVTVSS	125
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDV ^D DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT ^H FPFTFGQGTKVEIKR	103
4141	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSHTY ^Y ADSV ^E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGY ^F LMDYWG QGTLVTVSS	126

[0238]

	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
4146	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITGGSYTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGY <u>FL</u> MDYWG QGTLVTVSS	127
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
4206	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITGGSHTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQM <u>DSL</u> RAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	128
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTH <u>L</u> PFTFGQGTKVEIKR	122
4208	重链	EVQLVESGGGLVK <u>S</u> GGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWV RQAPGKGLEW <u>GT</u> ITTTGGSYTYYADSVQGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	129
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	130
4278	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>SK</u> YAMN <u>W</u> E RQAPGKGLEWVSTIT <u>L</u> GGSYTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ <u>YLD</u> GNFLMDY WGQGTLVTVSS	131
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
4287	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>SK</u> YAMN <u>W</u> E RQAPGKGLEWVSTITGGSYTYYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ <u>H</u> PYGNFLMDY WGQGTLVTVSS	132
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>I</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
1	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW	99

[0239]

		RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTTYADSVDGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	2015-26555 _(22)
2	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTTYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	2015-26555 _(25)
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
3	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSHTYTYADSVDGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	117
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
4	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSHTYTYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	133
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
5	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTTYADSVDGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	95
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	2015-26555 _(22)
6	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTTYADSVEGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	134
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL	2015-26555

[0240]

		NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	(22)
7	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSVDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	99
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
8	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSV _E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	2015-26555 (25)
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
9	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSV _Q GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	135
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
10	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSV _Q GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	110
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	103
11	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSYTYADSV _E GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	136
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD _I DGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
12	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNHW RQAPGKGLEWVGTITTTGGSHTYTYADSV _E GRFTISRDN	137

[0241]

		AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDG <u>H</u> FLMDYWG QGTLVTVSS	
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>I</u> DGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
13	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVGTITTTGG <u>S</u> HTYYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	138
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>I</u> DGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
14	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>S</u> KYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITLGGSYTYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ <u>Y</u> L <u>D</u> GNFLMDY WGQGTTLVTVSS	131
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>S</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGY <u>F</u> FPFTFGQGTKVEIKR	139
15	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>S</u> KYAMN <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQ <u>H</u> PYGNFLMDY WGQGTTLVTVSS	132
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>S</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGF <u>Y</u> FPFTFGQGTKVEIKR	140
16	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>S</u> H <u>Y</u> AMT <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>S</u> HTYYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	141
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>I</u> DGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
17	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMT <u>W</u> RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>S</u> HTYYADSV <u>Q</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	142
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLD <u>I</u> DGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF	96

[0242]

		LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	
18	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMTWV RQAPGKGLEWVSTITGGSHYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	143
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	96
19	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMNW VRQAPGKGLEWVSTITKKGSFTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGEFLMDYW GQGTLVTVSS	144
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	2015-26555 _(22)
20	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSQYAMNW VRQAPGKGLEWVSTIKKGSFTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGEFLMDYW GQGTLVTVSS	145
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	2015-26555 _(22)
21	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITKGGSYTYYADSV <u>D</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWG QGTLVTVSS	146
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDSDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPFTFGQGTKVEIKR	2015-26555 _(22)
22	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWW RQAPGKGLEWVSTITGGSHYYADSV <u>E</u> GRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYWG QGTLVTVSS	109
	轻链	DVVMQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDV <u>D</u> GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGYFPFTFGQGTKVEIKR	147
23	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSHYAMNW VRQAPGKGLEWVSTITGGSYTYYADSV <u>E</u> GRFTISRDN NAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGHFLMDYW	148

[0243]

		GQGTLVTVSS	
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSPSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTHLPFTFGQGTKVEIKR	108

[0244] 表20

[0245]

克隆	可变区	CDR1氨基酸 序列	SEQ ID NOS:	CDR2氨基酸序 列	SEQ ID NOS:	CDR3氨基酸 序列	SEQ ID NOS:
1001	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVDG	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1015	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1021	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVDG	150	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1023	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVDG	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1024	重链	SYAMS	157	TITTGGSYTTY ADSVDG	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDL GKTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1104	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVQG	159	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1123	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1202	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVDG	150	QDGNFLMDY	151

[0246]

	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1208	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTYLPF	161
1214	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVEG	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1216	重链	HYAMN	163	TITTGGSYTY ADSVEG	162	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDID GKTYL	152	LVSKLDS	153	WQGTHLPF	164
1223	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVEG	162	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1224	重链	SYAMS	157	TITTGGSYTY ADSVDG	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1232	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVDG	150	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1234	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVQG	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1238	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTY ADSVEG	162	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1243	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVHG	166	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1248	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY	167	QDGHFLMDY	156

[0247]

				ADSV <u>DG</u>			
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3007	重链	SYAMN	149	TITLGGSYTY ADSVQ <u>G</u>	168	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDLD GKTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3016	重链	SYAMN	149	TITGGSHTY ADSV <u>E</u> G	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDSD GKTYLN	169	LVSKLDS	153	WQGT <u>H</u> LPF	164
3024	重链	SYAM <u>S</u>	157	TITGGSYTY ADSVQ <u>G</u>	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDSD GKTYLN	169	LVSKLDS	153	WQGT <u>H</u> LPF	164
3115	重链	SYAMN	149	TITGGSHTY ADSV <u>D</u> G	167	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3120	重链	SYAMN	149	TITGGSYTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGY <u>F</u> FLMDY	170
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3131	重链	SYAM <u>S</u>	157	TITGGSYTY ADSVQ <u>G</u>	165	QDGQ <u>F</u> FLMDY	171
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3203	重链	SYAM <u>S</u>	157	TITGGSYTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDLD GKTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3241	重链	SYAMN	149	TITGGSYTY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4011	重链	SYAMN	149	TITGGSHTY ADSV <u>E</u> G	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGT <u>H</u> LPF	164

[0248]

4017	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVQG	165	QDGYFLMDY	131
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4034	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGYFLMDY	131
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4041	重链	SYAMS	157	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGYFLMDY	131
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYL	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4141	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGYFLMDY	131
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4146	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSVEG	162	QDGYFLMDY	131
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4206	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSVEG	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDVD GKTYLN	160	LVSKLDS	153	WQGT H LPF	164
4208	重链	SYAMS	157	TITTGGSYTTY ADSVQG	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	171	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4278	重链	KYAMN	172	TITLGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	173	QYLDGNFLM DY	174
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4287	重链	KYAMN	172	TITTGGSYTTY ADSVEG	162	QHPYGNFLM DY	175
	轻链	KSSQSLLDID GKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
1	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTTY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLDSD	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

[0249]

		GKTYLN					
2	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>I</u> D GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
3	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>D</u> G	167	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
4	重链	SYAMN	149	TITTGGSHTYY ADSV <u>E</u> G	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
5	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>S</u> D GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
6	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>S</u> D GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
7	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>D</u> G	150	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
8	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
9	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>Q</u> G	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
10	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>Q</u> G	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLD <u>V</u> D GKTYLN	178	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
11	重链	SYAMN	149	TITTGGSYTYY ADSV <u>E</u> G	162	QDGNFLMDY	151

[0250]

	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
12	重链	SYAMN	149	TITTGGSH ^H TY ADSVEG	155	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
13	重链	SYAMN	149	TITTGGSH ^H TY ADSVEG	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
14	重链	<u>K</u> YAMN	172	TITLGGSYTY ADSV <u>D</u> G	173	QYLDGNFLM DY	174
	轻链	KSSPSLLDSD GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGT <u>Y</u> FPF	179
15	重链	<u>K</u> YAMN	172	TITTGGSYTY ADSVEG	162	QHPYGNFLM DY	175
	轻链	KSSPSLLDSD GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGF <u>Y</u> FPF	180
16	重链	<u>H</u> YAMT	181	TITTGGSH ^H TY ADSVEG	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
17	重链	SYAMT	182	TITTGGSH ^H TY ADSVQ <u>G</u>	159	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
18	重链	<u>H</u> YAMT	181	TITTGGSH ^H TY ADSV <u>D</u> G	167	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSPSLLDID GKTYLN	177	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
19	重链	<u>Q</u> YAMN	183	TITKKG <u>S</u> F ^F TY ADSV <u>D</u> G	184	QDGEFLMDY	185
	轻链	KSSPSLLDSD GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
20	重链	<u>Q</u> YAMN	183	TIKKGG <u>S</u> F ^F TY ADSV <u>D</u> G	186	QDGEFLMDY	185
	轻链	KSSPSLLDSD GKTYLN	176	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
21	重链	SYAMN	149	TITKGG <u>S</u> F ^F TY	187	QDGNFLMDY	151

[0251]

				ADSVDG			
	轻链	KSSPSLLDSD GKTYLN	176	LVS K LDS	153	WQGTHFPF	154
22	重链	SYAMN	149	TITTGGSH T YY ADSVEG	155	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSPSLLD V D GKTYLN	178	LVS K LDS	153	WQGT Y FPF	179
23	重链	HYAMN	188	TITTGG S Y T YY ADSVEG	162	QDGHFLMDY	156
	轻链	KSSPSLLD I D GKTYLN	177	LVS K LDS	153	WQGT H L P F	164

[0252] 11-4:克隆作为通过酵母展示获得的抗TFPI抗体的克隆308-4抗体突变体的IgG基因

[0253] 作为实施例11-2和11-3中获得的抗TFPI抗体的308-4抗体突变体的轻链可变区基因,使用PrimeSTAR HS DNA聚合酶(CAT.NO.R040B,Takara)与含有KpnI的正向引物(表21;SEQ ID NO:189)和反向引物(表21;SEQ ID NO:190)一同进行PCR。此外,人抗体的κ轻链恒定区使用正向引物(表21;SEQ ID NO:191)和反向引物(表21;SEQ ID NO:192)进行PCR。PCR在以下条件下进行:94℃10分钟;然后30个循环,每个循环由94℃15秒、56℃30秒和72℃90秒组成;然后72℃10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。然后,轻链可变区和轻链恒定区彼此以1:1的比例混合,并且混合物在以下条件下使用正向引物(表20;SEQ ID NO:189)和反向引物(表20;SEQ ID NO:192)进行重叠PCR:94℃10分钟;然后30个循环,每个循环由94℃15秒、56℃30秒和72℃90秒组成;然后72℃10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。所分离的基因在37℃使用KpnI(CAT.NO.R0142L,NEB)和HindIII(CAT.NO.R0104L,NEB)限制性内切酶处理12小时,然后在1%的琼脂糖凝胶上分离。pcIW质粒载体以相同方式消化并且在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S,NEB),将所分离的轻链区基因连接到线性pcIW载体中的NotI和HindIII位点。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上并在37℃培养12小时以上,并且从板中选择单克隆并培养。然后,质粒使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405,QIAGEN)从细胞中分离,并通过DNA测序鉴定。

[0254] 重链可变区使用308-4抗体突变体的重链可变区基因作为模板,与PrimeSTAR HS DNA聚合酶(Takara)以及含有KpnI的正向引物(表21;SEQ ID NO:193)和含有ApaI的反向引物(表21;SEQ ID NO:194)一同进行PCR。PCR在以下条件下进行:98℃2分钟;然后30个循环,每个循环由98℃10秒、58℃10秒和72℃30秒组成;然后72℃5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。然后,三种分离的基因在37℃使用KpnI和ApaI限制性内切酶处理4小时。使用限制性内切酶处理的基因在1%琼脂糖凝胶上分离。pcIW质粒载体也以相同方式消化并且在琼脂糖凝胶上分离。使

用T4 DNA连接酶,将所分离的基因连接到含有人重链恒定区的线性pcIW载体中的KpnI (CAT.NO.R0142L,NEB)和ApaI (CAT.NO.R0114L,NEB)位点。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Stratagene)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上并在37℃培养12小时以上,并且从板中选择单克隆并培养。然后,质粒使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405,QIAGEN)从细胞中分离,并进行所分离质粒的DNA测序。

[0255] 下表21显示用于克隆308-4抗体突变体的IgG基因克隆的引物,所述308-4抗体突变体为通过酵母展示获得的抗TFPI抗体。

[0256] 表21

[0257]

名称	核酸序列	SEQ ID NOS:
VH Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTACCTGTGGG GAA GTC CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGT	189
VH Re	AGT GGG AAC ACG GAG GGC CCC TTG GTG CTG GCG GAG CTC ACA GTC ACC AGC GTG CC	190
VL Fo	TGCTGTGGGTGAGTGGTACCTGTGGG GAC GTG GTG ATG ACA CAG ACG CCG CTG	191
VL Re_CL 重叠	GAT GAA CAC AGA AGG GGC AGC CAC CGT GCG TTT AAT TTC AAC CTT AGT GCC TTG GCC GAA CGT AAA	192
Ck Fo	ACG GTG GCT GCC CCT TCT GTG TTC ATC	193

[0258]

Ck Re	GAT TGG ATC CAA GCT TAC TAG CAC TCA CCC CTG TTG AAA GAC TTA	194
-------	--	-----

[0259] 11-5:抗TFPI 308-4克隆抗体突变体IgG的生成和纯化

[0260] 为了生成和纯化在实施例11-4中克隆的抗TFPI克隆抗体突变体,将Expi293F™细胞在转染前一天以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度接种。培养24小时后(37℃,8%CO₂,125rpm),加入Expi293™表达培养基(Cat.No.A1435101,Gibco)以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度制备30mL的细胞(生存力 $\geq 95\%$)。将30 μ g DNA(pcIw抗TFPI重链:15 μ g,pcIw抗TFPI轻链:15 μ g)在OptiPro™SEM培养基(Cat.No.12309019,Gibco)中稀释成总体积1.5mL并且在室温培养5分钟。将80 μ L ExpiFectamine™293试剂(Cat.No.A14524,Gibco)加入到1.5mLOptiPro™SEM培养基中(Cat.No.12309019,Gibco)至总体积1.5mL,然后在室温培养5分钟。培养5分钟后,1.5mL稀释的DNA和1.5mL ExpiFectamine™293试剂彼此很好的混合并在室温培养20-30分钟。将Expi293F™细胞使用3mL DNA和ExpiFectamine™293试剂的混合物处理。悬浮培养(37℃,8%CO₂,125rpm)16-18小时后,将150 μ L ExpiFectamine™293增强剂1(Cat.No.A14524,Gibco)和1.5mL ExpiFectamine™293增强剂2(Cat.No.A14524,Gibco)加入细胞,然后悬浮培养5天。完成培养后,将细胞以4000rpm离心20分钟以移除细胞碎片,并且使上清液通过0.22 μ m过滤器。每30mL培养基制备100 μ L蛋白质A树脂MabSelect Xtra

(Cat.No.17-5269-02,通用医疗),以1000rpm离心2分钟以移除保存溶液,并且洗涤三次,每次洗涤使用400 μ L蛋白质A结合缓冲液(Cat.No.21007,Pierce)。将蛋白质A树脂加入到所制备的培养基中,然后在室温旋转培养30分钟。将培养基和树脂的混合物加入到皮尔斯离心管-密封盖(Pierce spin column-snap cap)(Cat.No.69725,Thermo),并且使用QIAvac 24Plus(Cat.No.19413,QIAGEN)真空歧管提取,仅使树脂留在管中。树脂使用5mL蛋白质A结合缓冲液洗涤,然后在200 μ L蛋白质A洗提缓冲液(Cat.No.21009,Pierce)中重悬,之后在室温培养2分钟并通过以1000rpm离心1分钟洗提。洗脱物通过加入2.5 μ L 1.5M Tris-HCl(pH 9.0)中和。洗提进行4-6次,并且各级分使用Nanodrop 200C(Thermo Scientific)定量。收集具有其中检测出的蛋白质的级分,并且在Zeba离心脱盐柱中用使用5mL 7K MWC0(Cat.No.0089892,Pierce)的PBS(磷酸盐缓冲盐水)缓冲液代替缓冲液。然后,在还原和非还原条件下进行蛋白质的电泳(SDS-PAGE)以最终定量抗体的浓度并证明抗体的状态,并且将抗体存储在4 $^{\circ}$ C。

[0261] 因此,蛋白质电泳(SDS-PAGE)表示抗TFPI 308-4克隆抗体以良好的状态被纯化。

[0262] 实施例12:使用噬菌体展示Fab文库制备抗TFPI 308-4克隆亲和力成熟的抗体

[0263] 12-1:构建噬菌体展示Fab文库

[0264] 为了构建Fab文库,构建重链可变区文库,然后构建轻链可变区文库。具体地,对于重链可变区片段1的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:40)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:41至48)一同用作模板;对于重链可变区片段2的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:49)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:50至61)一同用作模板;以及对于重链可变区片段2的PCR,抗TFPI 308-4克隆的重链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:62)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:63至69)一同用作模板。各片段的PCR在以下条件下使用AccuPower Pfu PCR PreMix(CAT.No.K-2015,Bioneer)进行:95 $^{\circ}$ C 2分钟;然后30个循环,每个循环由95 $^{\circ}$ C 30秒、55 $^{\circ}$ C 30秒和72 $^{\circ}$ C 60秒组成;然后72 $^{\circ}$ C 10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离。将分离的重链可变区片段基因调整为1:1:1的摩尔比,并且在PCR中与正向引物(表18;SEQ ID NO:70)和反向引物(表18;SEQ ID NO:71)一同用作模板。所扩增基因的PCR在以下条件下使用Takara primer star PCR premix(Takara)进行:95 $^{\circ}$ C 2分钟;然后30个循环,每个循环由95 $^{\circ}$ C 10秒、55 $^{\circ}$ C 20秒和72 $^{\circ}$ C 30秒组成;然后72 $^{\circ}$ C 5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离,从而获得重链可变区基因。所得基因在37 $^{\circ}$ C使用Xho I(CAT.No.R0146L,NEB)和Apa I(Cat.No.R0114L,NEB)限制性内切酶处理4小时。将基因在1%琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S,NEB),将分离的基因连接到含有308-4轻链可变-恒定区的线性pcIw载体的Xho I和Apa I中。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,然后将细菌细胞在37 $^{\circ}$ C以220rpm在300ml的LB培养基中培养1小时,然后使用150 μ L羧苄青霉素和300 μ L四环素处理,然后在37 $^{\circ}$ C以220rpm悬浮培养12小时以上。然后,构建的重链可变区文库质粒使用Midi prep试剂盒(CAT.No.12143,QIAGEN)分离。为了确定文库的大小,在转化后1小时收集100 μ l培养基,并且通过连续稀释法接种在含有羧苄青霉素的LB板(Cat.No.LN004CA,NaraeBiotech)上,之

后在37°C培养12小时以上,然后经过菌落计数。

[0265] 对于轻链可变区片段1的PCR,抗TFPI 308-4克隆的轻链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:72)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:73至82)一同用作模板;以及对于轻链可变区片段2的PCR,抗TFPI 308-4克隆的轻链可变区基因序列与正向引物(表18;SEQ ID NO:83)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:84至87)一同用作模板。各片段的PCR在以下条件下使用AccuPower Pfu PCR PreMix (Bioneer) 进行:95°C2分钟;然后30个循环,每个循环由95°C30秒、55°C30秒和72°C60秒组成;然后72°C10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离。将轻链可变区片段基因调节到1:1的摩尔比,并且在PCR中与正向引物(表18;SEQ ID NO:91)和反向引物(表18;SEQ ID NOs:92)一同用作模板。所扩增基因的PCR在以下条件下使用Takara primer star PCR premix (Takara) 进行:95°C2分钟;然后20个循环,每个循环由95°C10秒、55°C30秒和72°C40秒组成;然后72°C5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒(QIAquick凝胶回收试剂盒,QIAGEN)分离,从而获得轻链可变区基因。所得基因在37°C使用NruI (Cat.No.R0192L,NEB)和XbaI (Cat.No.R0145L,NEB)限制性内切酶处理4小时。使用限制性内切酶处理的基因在1%琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶 (Cat.No.M0203S,NEB),将分离的基因连接到含有308-4重链可变区文库的线性pComb3x文库的NruI和XbaI位点。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Cat.No.200228,Stratagene)中,然后细菌细胞在37°C以220rpm在300ml的LB培养基中培养1小时,然后使用150μL羧苄青霉素和300μL四环素处理,然后在37°C以220rpm震荡培养1小时。然后,下拨使用4.5mL (10^{11} pfu)的VCS M13辅助噬菌体处理,然后在37°C以220rpm震荡培养1小时。然后细胞使用300μL卡那霉素(kanamycin)和300μL羧苄青霉素处理并且在37°C以220rpm培养过夜。次日,培养的细胞以4000rpm离心20分钟,并且将上清液转移到新鲜的容器中。为了沉淀噬菌体,将5X PEG/NaCl以1X加入到上清液中,然后使其在冰上静置30分钟以上。沉淀的噬菌体以8000rpm离心30分钟。丢弃上清液,并且沉淀的噬菌体在10mL的PBS中重悬。为了移除细胞随便,悬浮在10mLPBS中的噬菌体以14,000rpm离心10分钟,并且将上清液分离并存储在4°C。为了确定文库的大小,在转化后1小时收集100μl培养基,并且通过连续稀释法接种在含有羧苄青霉素的LB板(NaraeBiotech)上,之后在37°C培养12小时以上,然后经过菌落计数。

[0266] 12-2:选择抗TFPI抗体突变体

[0267] 将1mL人重组蛋白TFPI以1μg/ml的浓度加入到固相聚苯乙烯管 (Cat.No.444202, Nunc)中,并且将管在4°C使用蛋白包被12小时以上,并且使用5mL 0.05%PBST洗涤三次。TFPI包被的Immuno管在室温使用5mL 1%BSA/PBS封闭2小时。将封闭缓冲液从Immuno管中移除,然后,该管使用噬菌体文库处理,并在室温培养2小时。然后,该管使用5mL PBST洗涤4次。Immuno管使用1mL甘氨酸(pH 2.0)洗提缓冲液处理,并在室温培养10分钟,并且上清液的洗脱的噬菌体通过加入100μl 1.5M Tris-Cl (pH8.8)中和。10mL培养大约2小时的XLI-Blue电穿孔-感受态细胞(OD₆₀₀=0.8-1.0),使用中性的噬菌体处理。在室温感染30分钟后,将10mL SB,20μl四环素(50mg/ml)和0μl羧苄青霉素(100mg/ml)加入到10mL感染的XLI-Blue电穿孔-感受态细胞中,然后在37°C以200rpm将其震荡培养1小时。然后,细胞使用1mL VCSM13辅助噬菌体(> 10^{11} pfu/ml)处理,并且在37°C以200rpm震荡培养1小时。培养1小时后,

细胞使用80mL SB、100 μ l卡那霉素和100 μ l羧苄青霉素处理,并且在37 $^{\circ}$ C以200rpm培养过夜。培养12小时以上的文库以4000rpm离心15分钟以分离上清液,并且将5X PEG/NaCl缓冲液以1X加入到上清液中,然后使其在冰上静置30分钟。上清液通过以8000rpm离心30分钟移除。将沉淀重悬于2mL 1%BSA/PBS中,然后以12000rpm离心10分钟,并且上清液被收集并用于下一次淘洗。将上述程序重复4次。

[0268] 12-3:通过ELISA制备抗TFPI单个克隆抗体

[0269] 将单克隆从最终扩增的文库中收集,然后在37 $^{\circ}$ C以220rpm在1.5mL SB/羧苄青霉素中培养,直到达到大约0.8-1.0的OD600,然后在30 $^{\circ}$ C以200rpm使用1mM IPTG培养12小时。然后,将细胞以5500rpm离心5分钟,并且将上清液加入到TFPI抗原包被的ELISA板中,在室温培养2小时,然后使用PBST (1XPBS,0.05% tween 20) 洗涤4次。然后,将使用1%BSA/1XPBS的HRP/抗hFab-HRP缀合物 (CAT.No.A0293, Sigma) 的1:5000稀释加入细胞,之后将细胞在室温培养1小时,并且使用PBST (1XPBS,0.05% tween 20) 洗涤4次。然后,细胞使用TMB溶液处理5-10分钟,并且将TMB终止液加入细胞。然后,在450nm波长的吸光度使用TECAN sunrise测量,并且将具有高OD的克隆选作单个克隆。

[0270] 因此,如下表23所示,可以选择特异性结合人TFPI的克隆,并且分析其氨基酸序列。在韩国专利申请第10-2015-0026555中描述的抗体中,用于本发明的抗体被描述为‘2015-26555_(在先申请的SEQ ID NO)’。

[0271] 下表23显示表22的克隆抗体的CDR氨基酸序列,基于Kabat编号系统鉴定。

[0272] 表22

[0273]

克隆	可变区	氨基酸序列	SEQ ID NOS:
A24	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFH <u>SY</u> AMNWV RQAPGKGLEWVSTITTRGSYTYYYADSV <u>EGRFT</u> ISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	195
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>V</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	103
A25	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>SS</u> YAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>SHT</u> YYADSV <u>EGRFT</u> ISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	97
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD <u>R</u> DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGT <u>H</u> FPFTFGQGTKVEIKR	196
A52	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTF <u>SS</u> YAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGG <u>SHT</u> YYADSV <u>D</u> GRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ	197

[0274]

		GTLVTVSS	
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPFTFGQGTKVEIKR	96
A63	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVQGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	198
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDV _D GKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPFTFGQGTKVEIKR	103
A67	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV _E GRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	2015-26555 (25)
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDLDGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPFTFGQGTKVEIKR	101
A71	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMNWV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSV _H GRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	199
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLD _T DGKTYL NWLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF TLKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPFTFGQGTKVEIKR	130
A74	重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM _H WV RQAPGKGLEWVSTITTTGGSYTYYADSVQGRFTISRDN KNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQDGNFLMDYWGQ GTLVTVSS	200
	轻链	DVVMTQTPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDIDGKTYLN WLQQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDF LKISRVEAEDVGVYYCWQGTFFPFTFGQGTKVEIKR	96

[0275] 表23

[0276]

克隆	可变区	CDR1 AA 序列	SEQ ID NOS:	CDR2 AA 序列	SEQ ID NOS:	CDR3 AA 序列	SEQ ID NOS:
A24	重链	SYAMN	149	TITTRGSYTY YADSV E G	200	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

[0277]

		<u>VDGKTYLN</u>					
A25	重链	SYAMN	149	TITTTGGSH <u>T</u> Y YADSV E G	155	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>R</u> DGKTYLN	201	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A52	重链	SYAMN	149	TITTTGGSH <u>T</u> Y YADSV <u>D</u> G	167	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>I</u> DGKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A63	重链	SYAMN	149	TITTTGGSYTY YADSV <u>Q</u> G	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>VDGKTYLN</u>	160	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A67	重链	SYAMN	149	TITTTGGSYTY YADSV E G	162	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>L</u> DGKTYLN	158	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A71	重链	SYAMN	149	TITTTGGSYTY YADSV <u>H</u> G	202	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>T</u> DGKTYLN	171	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154
A74	重链	SYAM <u>H</u>	203	TITTTGGSYTY YADSV <u>Q</u> G	165	QDGNFLMDY	151
	轻链	KSSQSLLD <u>I</u> DGKTYLN	152	LVSKLDS	153	WQGTHFPF	154

[0278] 12-4:克隆抗TFPI 308-4克隆抗体突变体的IgG基因

[0279] 使用所得抗TFPI 308-4克隆抗体突变体轻链可变区基因作为模板,PCR使用PrimeSTAR HS DNA聚合酶(Takara)与含有KpnI的正向引物(表21;SEQ ID NO:189)和反向引物(表21;SEQ ID NO:190)一起进行。此外,使用人抗体κ轻链恒定区作为模板,PCR使用正向引物(表21;SEQ ID NO:191)和反向引物(表21;SEQ ID NO:192)进行。PCR在以下条件下进行:94℃10分钟;然后30个循环,每个循环由94℃15秒、56℃30秒和72℃90秒组成;然后72℃10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使

用凝胶回收试剂盒分离。然后,轻链可变区基因和轻链恒定区基因彼此以1:1的比例混合,并且混合物在以下条件下使用正向引物(表20;SEQ ID NO:189)和反向引物(表20;SEQ ID NO:192)进行重叠PCR:94°C 10分钟;然后30个循环,每个循环由94°C 15秒、56°C 30秒和72°C 90秒组成;然后72°C 10分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。所分离的基因在37°C使用KpnI (CAT.NO.R0142L, NEB)和HindIII (CAT.NO.R0104L, NEB)限制性内切酶处理12小时以上,然后在1%的琼脂糖凝胶上分离。pcIW质粒载体以相同方式消化并且在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶(Cat.No.M0203S, NEB),将所分离的轻链区基因连接到线性pcIW载体中的NotI和HindIII位点。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Stratagene, Cat.No.200228)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB板(Cat.No.LN004CA, NaraeBiotech)上并在37°C培养12小时以上,并且从板中选择单克隆并培养。然后,质粒使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405, QIAGEN)从细胞中分离,并通过DNA测序鉴定。

[0280] 重链可变区使用308-4抗体突变体的重链可变区基因作为模板,与PrimeSTAR HS DNA聚合酶(Takara)以及含有KpnI的正向引物(表21;SEQ ID NO:193)和含有ApaI的反向引物(表21;SEQ ID NO:194)一同进行PCR。PCR在以下条件下进行:98°C 2分钟;然后30个循环,每个循环由98°C 10秒、58°C 10秒和72°C 30秒组成;然后72°C 5分钟。扩增的基因在1%的琼脂糖凝胶上电泳以确认具有预期大小的DNA条带,并且使用凝胶回收试剂盒分离。然后,三种分离的基因在37°C使用KpnI和ApaI限制性内切酶处理4小时。使用限制性内切酶处理的基因在1%琼脂糖凝胶上分离。pCIW质粒载体也以相同方式消化并且在琼脂糖凝胶上分离。使用T4 DNA连接酶,将所分离的基因连接到含有人重链恒定区的线性pcIW载体中的KpnI (CAT.NO.R0142L, NEB)和ApaI (CAT.NO.R0114L, NEB)位点。将连接产物转化到XL1-Blue细菌(电穿孔-感受态细胞;Stratagene, Cat.No.200228)中,并且将细菌细胞接种在含有羧苄青霉素的LB板(Cat.No.LN004CA, NaraeBiotech)上并在37°C培养12小时以上,并且从板中选择单克隆并培养。然后,质粒使用质粒迷你试剂盒(Cat.No.27405, QIAGEN)从细胞中分离,并通过DNA测序分析。

[0281] 12-5:抗TFPI 308-4可用抗体突变体IgG的生成和纯化

[0282] 为了生成和纯化在实施例12-4中克隆的抗TFPI克隆抗体突变体,将Expi293F™细胞在转染前一天以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度接种。培养24小时后(37°C, 8%CO₂, 125rpm),加入Expi293™表达培养基(Cat.No.A1435101, Gibco)以 2.5×10^6 个细胞/mL的浓度制备30mL的细胞(生存力 $\geq 95\%$)。将30 μ g DNA (pcIW抗TFPI重链:15 μ g, pcIW抗TFPI轻链:15 μ g)在OptiPro™SEM培养基(Cat.No.12309019, Gibco)中稀释成总体积1.5mL,并且在室温培养5分钟。将80 μ L ExpiFectamine™293试剂(Cat.No.A14524, Gibco)加入到1.5mL OptiPro™SEM培养基中(Cat.No.12309019, Gibco)至总体积1.5mL,然后在室温培养5分钟。培养5分钟后,1.5mL稀释的DNA和1.5mL ExpiFectamine™ 293试剂彼此很好的混合并在室温培养20-30分钟。将Expi293F™细胞使用3mL DNA和ExpiFectamine™ 293试剂的混合物处理。悬浮培养(37°C, 8%CO₂, 125rpm) 16-18小时后,将150 μ L ExpiFectamine™ 293增强剂1 (Cat.No.A14524, Gibco)和1.5mL ExpiFectamine™ 293增强剂2 (Cat.No.A14524, Gibco)加入细胞,然后悬浮培养5天。完成培养后,将细胞以4000rpm离心20分钟以移除细胞碎片,并且使上清液通过0.22 μ m过滤器。每30mL培养基制备100 μ L蛋白质A树脂MabSelect Xtra

(Cat.No.17-5269-02,通用医疗),以1000rpm离心2分钟以移除保存溶液,并且洗涤三次,每次洗涤使用400 μ L蛋白质A结合缓冲液(Cat.No.21007,Pierce)。将蛋白质A树脂加入到所制备的培养基中,然后在室温旋转培养30分钟。将培养基和树脂的混合物加入皮尔斯离心管-密封盖(Pierce spin column-snap cap)(Cat.No.69725,Thermo),并且使用QIAvac 24Plus(Cat.No.19413,QIAGEN)真空歧管提取,仅使树脂留在管中。树脂使用5mL蛋白质A结合缓冲液洗涤,然后在200 μ L蛋白质A洗提缓冲液(Cat.No.21009,Pierce)中重悬,之后在室温培养2分钟并通过以1000rpm离心1分钟洗提。洗脱物通过加入2.5 μ L 1.5M Tris-HCl(pH 9.0)中和。洗提进行4-6次,并且各级分使用Nanodrop 200C(Thermo Scientific)定量。收集具有其中检测出的蛋白质的级分,并且在Zeba离心脱盐柱中用使用5mL 7K MWC0(Cat.No.0089892,Pierce)的PBS(磷酸盐缓冲盐水)缓冲液代替缓冲液。然后,在还原和非还原条件下进行蛋白质的电泳(SDS-PAGE)以最终定量抗体的浓度并证明抗体的状态,并且将抗体存储在4 $^{\circ}$ C。

[0283] 因此,蛋白质电泳(SDS-PAGE)表示抗TFPI 308-4克隆抗体以良好的状态被纯化。

[0284] 实施例13:测量308-4抗体突变体对TFPI抗原的定量亲和力

[0285] 使用Biacore T-200(通用医疗)生物传感器测量作为实施例11和12中纯化的抗TFPI抗体的308-4克隆重链可变区抗体突变体12、1023、1202、3241对人重组TFPI的定量亲和力。具体地,通过胺羧基反应固定在CM5芯片(CAT.No.BR-1005-30,通用医疗)上至200的Rmax,然后将各纯化的12、1023、1202和3241克隆与固定的蛋白质A结合。然后,在HBS-EP缓冲液(10mM HEPES(pH7.4),150mM NaCl,3mM EDTA,0.005%表面活性剂P20)中连续稀释的重组人TFPI以0.078-10nM的浓度以30 μ L/min流速在芯片上运行120秒来结合,并运行3600秒来解离。与抗体相关的TFPI的解离通过以30 μ L/min的流速运行10mM的甘氨酸-HCl(pH 1.5)30秒而诱导。动力学速率常数(结合速率常数(K_{on})和解离速率常数(K_{off}))和平衡解离常数(K_D)方面的亲和力使用Biacore T-200评估软件评估,并且结果示于下表24。

[0286] 下表24显示出速率常数(结合速率常数(K_{on})和解离速率常数(K_{off}))和平衡解离常数(K_D)方面的抗TFPI抗体对于重组人TFPI蛋白的亲和力。

[0287] 表24

	结合速率常数	解离速率常数	平衡解离常数
[0288] 12	4.87X10 ⁶	3.99X10 ⁻⁵	8.19X10 ⁻¹²
1023	4.91X10 ⁶	1.5X10 ⁻⁴	3.01X10 ⁻¹¹
1202	7.56X10 ⁶	7.16X10 ⁻⁵	9.47X10 ⁻¹²
3241	1.91X10 ⁶	1.4X10 ⁻⁴	7.4X10 ⁻¹¹

[0289] 实施例14:测量Fxa活性

[0290] 凝血通过内源性途径和外源性途径诱导,并且两种途径通过激活X因子的共同途径而激活凝血酶,从而形成纤维蛋白以诱导凝血。此外,TFPI由Kunitz 1(K1)、Kunitz 2(K2)和Kunitz 3(K3)结构域组成。已知K1结构域与FVIIa结合,并且K2结构域与FXa结合。已知凝血通过TFPI和血液凝固因子之间的结合而抑制。因此,为了确定在凝血过程中MG1113(抗-TFPI抗体)的作用,评估FXa活性。

[0291] 测定系统仅由FXa、TFPI和候选抗体组成,以便最小化一些因子的影响。当候选抗体与TFPI结合时,其不抑制FXa的功能,并且因此FXa活性出现。然而,当候选抗体与TFPI没有有效结合时,TFPI结合FXa从而抑制FXa的功能,并且因此颜色发展的程度降低。因此,没有通过TFPI抑制的FXa的剩余活性通过底物降解的程度测量。本文所使用的底物是FXa特异性底物S-2765,并且降解底物以生成在405nm可测量的发色pNA。该测量方法基于酰胺分解检测法。

[0292] 各FXa、TFPI、mAb2021和S-2765参考下表25使用测定缓冲液(20mM HEPES,150mM NaCl,1mg/mL BSA,0.02%NaN₃,5mM CaCl₂,pH7.4)稀释,并分配在1.5ml管中。

[0293] 表25

[0294]

物质	稀释前浓度 (nM)	工作浓度 (nM)	其他
FXa	2nM	0.5nM	
TFPI	40nM	10nM	
S-2765	2mM	0.5mM	
标准曲线	10nM	0.02,0.1,0.5,2.5nM	FXa
mAb2021	160nM	2.5,5,10,20nM	阳性对照

[0295] 将50 μ L的各阳性对照mAb2021抗体(抗TFPI Ab,Novo Nordisk)和候选抗体以20、10、5或2.5nM的浓度加入到各孔中。将50 μ L的40nM TFPI溶液加入到各孔中,并且使其在室温静置30分钟。为了获得标准曲线,将50 μ L的FXa溶液以不同浓度加入到各孔中,并且将50 μ L的2mM FXa溶液加入到各孔中,并且在37 $^{\circ}$ C培养10分钟。将50 μ L的2mM S-2765溶液加入到各孔中,并且在37 $^{\circ}$ C培养30分钟。然后,在405nm波长下各孔的吸光度通过端点模式中的酶标仪读取。

[0296] 因此,如图20所示,分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第1015、1021、1023、3007、3016和3024号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中,与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1015号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约83%,并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约71%。此外,与阳性对照样本比较,第1023号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约86%,并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约84%。当效果在10nM的TFPI浓度下比较时,可见第1023号抗体比第1015号抗体具有更好的TFPI抑制活性。

[0297] 此外,如图21所示,分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第3036、3115、3120、3131、4017和4141号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中,与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第4017号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约90%,并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约70%。

[0298] 此外,如图22所示,分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第1001、1024、1104和1123号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中,与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1123号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大

约88%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约69%。

[0299] 此外，如图23所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的A24、A25、A51、A52、A63和A67抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，A67抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约79%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约67%。

[0300] 此外，如图24所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第3203、3241、4206和4208号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第3241号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约82%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约83%。

[0301] 此外，如图25所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第1、2、3、7、8和10号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第2号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约76%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约79%。与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第3号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约81%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约70%。与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第8号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约80%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约69%。

[0302] 此外，如图26所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第1214、1216、1224、1234、1238和4287号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第1214号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约77%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约63%。

[0303] 此外，如图27所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第16、19、20、21和23号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第16号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约55%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约34%。

[0304] 此外，如图28所示，分析在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟抗体的第11、12、13和1202号抗体的作用。显示所有抗体显示出吸光度抗体浓度依赖性方式增加，其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。在这些抗体中，与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第11号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约89%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约81%。与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第12号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约82%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约82%。与未使用TFPI处理的阳性对照样本比较，第13号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约85%，并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约76%。与未使用TFPI处理的阳

性对照样本比较,第1202号抗体显示出在使用20nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约87%,并且在使用10nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约82%。

[0305] 实施例15:测量TF/FVIIa/FX复合物

[0306] 凝血外源途径中最重要的因子包括TF(组织因子)、FVII(VII因子)、FX(X因子)等。当TF和FVIIa通过外部信号形成复合物时,FX被活化为FXa。然后,FXa将凝血素活化为凝血酶,然后其将纤维蛋白原转化为起凝血作用的纤维蛋白。然而,TFPI(组织因子通道抑制剂)通过结合FXa抑制FXa的功能,从而干扰凝血。为了评估上述途径中抗TFPI抗体的作用,进行TF/FVIIa/FXa复合物测定。在TFPI与抗TFPI抗体一同存在或独立于抗TFPI抗体存在的情况下,通过TF/FVIIa复合物生产和抑制FXa的程度基于由FXa降解的底物的颜色发展程度测量,从而评估抗TFPI抗体的作用。换言之,由于抗TFPI抗体的TFPI抑制效果增加,FXa的生产增加,并且降解的底物的量增加,导致吸光度增加。

[0307] 在1.5mL管中,TF(4500L/B, Sekisui diagnostics)、FVIIa(Novo Nordisk, Novo Seven)和FX(PP008A, Hyphen biomed)使用测定缓冲液(20mM HEPES、150mM NaCl、1mg/mL BSA、0.02%NaN₃、5mM CaCl₂、pH 7.4)稀释至下表26所示的浓度,从而制备混合物溶液。

[0308] 表26

[0309]

物质	TF	FVIIa	FX
浓度	0.6ng/mL	1nM	17nM-->5nM

[0310] 将70μL混合物溶液加入到96孔板的各孔中。向空白孔,加入70μL的测定缓冲液。将各孔在37℃培养15分钟,然后将30μL TFPI加入到各孔至50nM的浓度。然而,将30μL的测定缓冲液加入到各空白孔和阳性对照孔(不使用抗TFPI抗体MG1113和TFPI处理的样本)中。将30μL的抗TFPI抗体MG1113加入到各孔中至12.5、25、50和100nM的浓度。向各空白孔、阳性对照孔(不使用抗TFPI抗体和TFPI处理的样本)和阴性对照孔(不使用抗TFPI抗体MG1113处理的样本),加入30μL的测定缓冲液,然后在37℃培养15分钟。将20μL的EDTA(E7889, Sigma-Aldrich)加入到各孔中至50mM的浓度。然后,将50μL的S2765(Chromogenix, S-2765)加入到各孔中至200μM的浓度,然后在37℃培养10分钟。然后使用酶标仪测量在405nm各孔的吸光度。

[0311] 下表27显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0312] 表27

[0313]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	308-4	1015	1023	4017
100nM	0.918	0.119	0.937	0.949	0.938	0.944	0.951	0.943
50nM			0.929	0.945	0.926	0.919	0.947	0.919

[0314]

25nM			0.918	0.873	0.664	0.269	0.795	0.307
12.5nM			0.218	0.242	0.223	0.179	0.228	0.181
6.25nM			0.168	0.179	0.177	0.158	0.168	0.150
3.13nM			0.145	0.147	0.155	0.148	0.152	0.138
1.56nM			0.125	0.134	0.135	0.141	0.143	0.134

[0315] 下表28显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0316] 表28

[0317]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	308-4	1015	1023	4017
100nM	100.0%	13.0%	102.0%	103.3%	102.1%	102.8%	103.6%	102.7%
50nM			101.2%	102.9%	100.8%	100.1%	103.1%	100.1%
25nM			100.0%	95.0%	72.3%	29.3%	86.5%	33.4%
12.5nM			23.7%	26.3%	24.2%	19.4%	24.8%	19.7%
6.25nM			18.2%	19.4%	19.2%	17.2%	18.2%	16.3%
3.13nM			15.7%	16.0%	16.8%	16.1%	16.5%	15.0%
1.56nM			13.6%	14.5%	14.7%	15.4%	15.6%	14.5%

[0318] 因此,如图29以及上表27和28所示,确认了在抗TFPI MG1113候选抗体中作为亲和力成熟的第1015、1023和4017号抗体的作用。显示了所有候选抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制交过以浓度依赖性方式增加。与没有使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1015号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约29.3%。与阳性对照样本比较,第1023号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约86.5%。与阳性对照样本比较,第4017号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约33.4%。因此,发现第1023号抗体具有高的抑制TFPI的能力。

[0319] 下表29显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0320] 表29

[0321]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	308-4	1023	1123	A67
100nM	0.955	0.143	0.966	0.945	0.926	0.935	0.905	0.907
50nM			0.951	0.908	0.909	0.905	0.770	0.895
25nM			0.955	0.880	0.716	0.923	0.272	0.914

[0322]

12.5nM			0.233	0.251	0.222	0.259	0.157	0.290
6.25nM			0.180	0.186	0.185	0.190	0.150	0.196
3.13nM			0.171	0.160	0.164	0.167	0.151	0.177
1.56nM			0.151	0.145	0.154	0.153	0.140	0.154

[0323] 下表30显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0324] 表30

[0325]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	308-4	1023	1123	A67
100nM	100.0%	15.0%	101.2%	99.0%	97.0%	98.0%	94.8%	95.0%
50nM			99.6%	95.1%	95.2%	94.8%	80.7%	93.7%
25nM			100.1%	92.2%	75.0%	96.6%	28.5%	95.8%
12.5nM			24.4%	26.3%	23.2%	27.1%	16.4%	30.3%
6.25nM			18.8%	19.5%	19.4%	19.9%	15.7%	20.5%
3.13nM			17.9%	16.8%	17.2%	17.5%	15.8%	18.5%
1.56nM			15.8%	15.2%	16.1%	16.0%	14.7%	16.1%

[0326] 此外,如图30以及上表29和30所示,评估确定在上述测定中具有最高效果的第1023号抗体,与另一个亲和力成熟的抗体第1123号抗体和A67抗体。显示了所有抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与没有使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1023号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为94.8%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约96.6%。与阳性对照样本比较,第1123号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为80.7%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约28.5%。与阳性对照样本比较,A67抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为93.7%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约95.8%。因此,发现第1023号抗体和A67抗体在抑制TFPI的能力方面彼此相似。

[0327] 下表31显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟抗TFPI MG1113抗体的作用获得的数值结果。

[0328] 表31

[0329]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	1023	A67	3203	3241
100nM	0.915	0.115	0.952	0.931	0.939	0.947	0.932	0.937
50nM			0.953	0.938	0.938	0.938	0.934	0.935
25nM			0.932	0.894	0.914	0.908	0.424	0.911

[0330]

12.5nM			0.241	0.253	0.290	0.330	0.208	0.305
6.25nM			0.156	0.183	0.185	0.195	0.173	0.197
3.13nM			0.143	0.158	0.160	0.172	0.162	0.171
1.56nM			0.137	0.160	0.135	0.149	0.147	0.157

[0331] 下表32显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0332] 表32

[0333]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb2021	T417	1023	A67	3203	3241
100nM	100.0%	12.6%	104.0%	101.7%	102.6%	103.5%	101.8%	102.3%
50nM			104.1%	102.5%	102.5%	102.5%	102.1%	102.1%
25nM			101.9%	97.7%	99.8%	99.2%	46.3%	99.6%
12.5nM			26.3%	27.7%	31.6%	36.1%	22.7%	33.3%
6.25nM			17.0%	20.0%	20.2%	21.3%	18.9%	21.5%
3.13nM			15.6%	17.2%	17.5%	18.7%	17.7%	18.7%
1.56nM			15.0%	17.5%	14.7%	16.3%	16.1%	17.2%

[0334] 此外,如图31以及上表31和32所示,评估确定在上述测定中具有最高效果的第1023号抗体、A67抗体、以及另外的亲和力成熟的抗体第3203号抗体和第3241号抗体。显示了所有抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与没有使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1023号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约99.8%。与阳性对照样本比较,A67抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约99.2%。与阳性对照样本比较,第3203号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约46.3%。与阳性对照样本比较,第3241号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为100%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约99.6%。因此,发现第1023号抗体、A67抗体和第3241号抗体在抑制TFPI的能力方面彼此相似。

[0335] 下表33显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0336] 表33

[0337]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb202	T417	1023	2	3	8
------	-----	------------	--------	------	------	---	---	---

[0338]

			1					
100nM	0.809	0.04	0.805	0.745	0.810	0.835	0.842	0.834
50nM			0.733	0.509	0.652	0.735	0.743	0.673
25nM			0.344	0.154	0.216	0.416	0.527	0.391
12.5nM			0.082	0.072	0.079	0.083	0.141	0.088
6.25nM			0.050	0.050	0.056	0.052	0.059	0.052
3.13nM			0.047	0.049	0.048	0.045	0.046	0.050
1.56nM			0.043	0.045	0.050	0.045	0.045	0.041

[0339] 下表34显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0340] 表34

[0341]

Ab浓度	标准化	TFPI(50 M)	mAb202 1	T417	1023	2	3	8
100nM	100.0%	4.9%	99.4%	92.0%	100.1%	103.2%	104.1%	103.0%
50nM			90.6%	62.9%	80.5%	90.9%	91.8%	83.2%
25nM			42.5%	19.0%	26.6%	51.4%	65.1%	48.3%
12.5nM			10.1%	8.9%	9.7%	10.3%	17.4%	10.8%
6.25nM			6.1%	6.2%	6.9%	6.4%	7.2%	6.4%
3.13nM			5.7%	6.0%	5.9%	5.6%	5.7%	6.1%
1.56nM			5.3%	5.5%	6.2%	5.5%	5.6%	5.1%

[0342] 此外,如图32以及上表33和34所示,将用于治疗FX的浓度从17nM变为5nM以降低反应速率从而增加分析候选抗体效果的分辨率。评估通过上述测定选择的第1023号抗体,以及另外的亲和力成熟的抗体第2、3和8号抗体。观察到候选抗体显示了吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。显示了所有抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与没有使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1023号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为80.5%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约26.6%。与阳性对照样本比较,第2号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约99.9%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约51.4%。与阳性对照样本比较,第3号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约91.8%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约61.5%。与阳性对照样本比较,第8号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约83.2%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约48.3%。

[0343] 下表35显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0344] 表35

[0345]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb202 1	T417	1023	12	13	1202
100nM	0.848	0.035	0.852	0.810	0.846	0.847	0.859	0.859
50nM			0.730	0.600	0.681	0.803	0.818	0.843
25nM			0.462	0.273	0.371	0.489	0.528	0.509
12.5nM			0.105	0.074	0.088	0.097	0.101	0.091
6.25nM			0.062	0.050	0.071	0.067	0.075	0.059
3.13nM			0.046	0.047	0.051	0.048	0.054	0.051
1.56nM			0.044	0.045	0.041	0.041	0.046	0.043

[0346] 下表36显示了通过TF/FVIIa/FX复合物测定评估亲和力成熟的抗TFPI MG1113抗体效果获得的数值结果。

[0347] 表36

[0348]

Ab浓度	标准化	TFPI(50nM)	mAb202 1	T417	1023	12	13	1202
100nM	100.0%	4.1%	100.4%	95.5%	99.8%	99.9%	101.3%	101.2%
50nM			86.1%	70.7%	80.3%	94.6%	96.5%	99.4%
25nM			54.4%	32.1%	43.7%	57.7%	62.2%	60.0%
12.5nM			12.4%	8.7%	10.3%	11.4%	11.9%	10.7%
6.25nM			7.3%	5.8%	8.3%	7.8%	8.8%	6.9%
3.13nM			5.4%	5.5%	6.0%	5.6%	6.4%	6.0%
1.56nM			5.2%	5.2%	4.8%	4.8%	5.4%	5.1%

[0349] 如图32以及上表35和36所示,评估第1023号抗体以及第12、13和1202号抗体是另外的亲和力成熟的抗体。观察到候选抗体显示了吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。显示了所有抗体显示出吸光度以抗体浓度依赖性方式增加,其表示抗体的TFPI抑制效果以浓度依赖性方式增加。与没有使用TFPI处理的阳性对照样本比较,第1023号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为80.3%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约43.7%。与阳性对照样本比较,第12号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约94.6%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约57.7%。与阳性对照样本比较,第13号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约96.5%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约62.2%。与阳性对照样本比较,第1202号抗体显示了在使用50nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约99.4%,并且在使用25nM处理的样本中抑制TFPI的作用为大约60.0%。

[0350] 实施例16:测量凝血酶生成

[0351] 凝血机制被分为内源性途径和外源性途径。已知外源性途径中TF(组织因子)的功能是凝血机制中的激活反馈功能,并且是产生非常快的凝血酶的爆炸性生产。在该凝血机

制中最重要的因子包括TF (组织因子)、FVII (VII因子)、FX (X因子) 等。当TF和FVIIa通过外部信号形成复合物时,FX被活化为FXa。然后,FXa将凝血素活化为凝血酶,然后其将纤维蛋白原剪切为起凝血作用的纤维蛋白。然而,TFPI (组织因子通道抑制剂) 通过结合FXa抑制FXa的功能,从而干扰凝血。凝血酶生成测定包括:使用要评估的试验样本处理血浆;然后,基于在PPP试剂的存在下产生的凝血酶将荧光底物转化为荧光产物时产生的荧光产物的量;以及使用凝血酶校准仪的已知量校准凝血酶的检查量,从而测量凝血酶的实际生成量。

[0352] 将20 μ L的低PPP试剂溶液加入到预热的96孔板 (圆底Immulon 2HB 96孔板) 的样本加载孔中,并且将20 μ L的校准溶液加入到该板的校准孔中。将抗TFPI候选抗体在预溶解样本稀释液 (FVIII缺乏的血浆) 中以0.3125、0.625、1.25或2.5nM的浓度稀释,然后在室温培养10分钟使其可以结合FVIII。

[0353] 将80 μ L的各样本稀释液 (FVIII缺乏的血浆) 加入到各校准和空白孔中,并且将80 μ L稀释的抗体溶液加入到各剩余孔中。按下软件屏幕底部的开始按钮以执行洗涤。洗涤在进口管置于37 $^{\circ}$ C水浴中的蒸馏水且出口管置于空容器的情况下进行。完成洗涤后,按下下一个按钮以执行一个空的过程。将进口管置于加热到37 $^{\circ}$ C的FluCa溶液中,并且准备好使用所述溶液填充管子。出口管安装在分配器中的M孔中,然后按下下一个按钮以将20 μ L的FluCa溶液自动分配到各孔中,之后进行摇动过程并且开始分析。

[0354] 因此,如图34所示,对于通过上述Fxa活性测定和TF/FVIIa/Fxa复合物测定选择的亲和力成熟的抗体中的第1023抗体,使用克隆T417嵌合抗体进行凝血酶生成比较测定。在2.5nM的浓度,与仅使用样本稀释液处理的空白比较,T417抗体显示出凝血酶峰值增加大约401%,并且第1023号抗体显示出凝血酶峰值增加大约401%。在ETP表示凝血酶总生成量的情况下,在使用2.5nM处理的样本中,与阴性对照组 (没有抗体) 比较,T417抗体显示出ETP增加大约293%,并且第1023号抗体显示出ETP增加大约309%。当比较两种抗体时,显示出通过亲和力成熟获得的第1023号具有比T417抗体更好的作用。

[0355] 工业实用性

[0356] 如上所述,特异性结合TFPI的本发明的抗体,可通过抑制TFPI激活外源性凝血途径。因此,本发明的抗体可以有效地用于治疗抗体诱导的血友病患者和预防A型血友病或B型血友病患者的凝血疾病。

[0357] 尽管已经参考具体特征详细描述了本发明,将对本领域技术人员显而易见的是,本说明书仅针对优选的实施方式,并不限制本发明的范围。因此,本发明的实质范围将通过所附权利要求及其等同物来限定。

[0358] 序列表文本格式

[0359] 见所附电子文档。

序列表

- <110> 财团法人牧岩生命科学研究所
 <120> 结合TFPI的新型抗体以及包含所述抗体的组合物
 <130> PF-B1943
 <140> PCT/KR2015/014370
 <141> 2015-12-29
 <150> 10-2015-0026555
 <151> 2015-02-25
 <150> 10-2015-0135761
 <151> 2015-09-24
 <160> 203
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH FR1 Fo
 <400> 1
 gaagtccagc tggtaggagtc tggaggt 27
 <210> 2
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH FR1 Re_S
 <400> 2
 cggggcctga cgaaccagc tcatggcata gctgctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
 <210> 3
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH FR1 Re_H
 <400> 3
 cggggcctga cgaaccagc tcatggcata atggetgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
 <210> 4
 <211> 57

<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_K
<400> 4
cggggcctga cgaaccagtc tcatggcata ttgctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 5
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_R
<400> 5
cggggcctga cgaaccagtc tcatggcata tetgctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 6
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_T
<400> 6
cggggcctga cgaaccagtc tcatggcata agtgctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 7
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_Y
<400> 7
cggggcctga cgaaccagtc tcatggcata atagctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 8
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_I
<400> 8
cggggcctga cgaaccagtc tcatggcata aatgctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 9

<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR1 Re_L
<400> 9
cggggcctga cgaaccctcgt tcatggcata aaggctgaag gtgaagccgc tcgctgc 57
<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Fo
<400> 10
tatgccatga actgggttcg tcaggcc 27
<210> 11
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_T-YH-EQDH
<400> 11
gttatcgagg gaaatggtga agcgccttg aacgctatcg gcgtagtagg tgtttgacc 60
accggttgat atggtgctga cccattccaa gcc 93
<210> 12
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_T-RK-EQDH
<400> 12
gttatcgagg gaaatggtga agcgccttg aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
accggttgat atggtgctga cccattccaa gcc 93
<210> 13
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_FYLH-YH-EQDH

<400> 13
gttatcgcg gaaatggtga agcgcccttg aacgctatcg gcgtagtagg tgtttgacc 60
acctwrtgtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 14
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_FYLN-RK-EQDH

<400> 14
gttatcgcg gaaatggtga agcgcccttg aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
acctwrtgtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 15
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_KRI-YH-EQDH

<400> 15
gttatcgcg gaaatggtga agcgcccttg aacgctatcg gcgtagtagg tgtttgacc 60
accthttggtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 16
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_KRI-RK-EQDH

<400> 16
gttatcgcg gaaatggtga agcgcccttg aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
accthttggtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 17
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_T-YH-EQDH_#2

<400> 17
gttatcgcg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg tatrtgacc 60
accggttggtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 18
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_T-RK-EQDH_#2
<400> 18
gttatcgcg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
accggttg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 19
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_FYLH-YH-EQDH_#2
<400> 19
gttatcgcg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg tatrtgacc 60
acctwrtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 20
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_FYLH-RK-EQDH_#2
<400> 20
gttatcgcg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
acctwrtg atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 21
<211> 93
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_KRI-YH-EQDH_#2
<400> 21
gttatcgcg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg tatrtgacc 60
accthttgt atggtgctga cccattccaa gcc 93

<210> 22
<211> 93
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR2 Re_KRI-RK-EQDH_#2
<400> 22
gttatcgcgg gaaatggtga agcgccnts aacgctatcg gcgtagtagg ttyttgacc 60
accthttgatg atggtgctga cccattccaa gcc 93
<210> 23
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Fo
<400> 23
gggcgcttca ccatttcccg cgataac 27
<210> 24
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_N
<400> 24
gccctggccc caataatcca tcagaaaatt gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 25
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_F
<400> 25
gccctggccc caataatcca tcagaaaaaa gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 26
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_H
<400> 26
gccctggccc caataatcca tcagaaaatg gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 27

<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_K
<400> 27
gccctggccc caataatcca tcagaaattt gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 28
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_Q
<400> 28
gccctggccc caataatcca tcagaaattg gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 29
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_R
<400> 29
gccctggccc caataatcca tcagaaatct gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 30
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH FR3 Re_Y
<400> 30
gccctggccc caataatcca tcagaaaata gccatcctgg cgcgcgcaat aatataccgc 60
<210> 31
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH最终Fo(VH Final Fo)
<400> 31
ggttctgggtg gtgggtggttc tgctagcgac gtggtgatga cacagacgcc gctg 54

<210> 32
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VH最终Re (VH Final Re)
<400> 32
ggagctcaca gtcaccagcg tgcctggcc ccaataatcc atcagaaa 48
<210> 33
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Fo
<400> 33
gacgtggtga tgacacagac gccgctg 27
<210> 34
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_S
<400> 34
gagccaattc agatacgtct tgccgtcgga gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 35
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_I
<400> 35
gagccaattc agatacgtct tgccgtcaat gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 36
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_L
<400> 36

gagccaattc agatacgtct tgccgtcaag gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 37
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_N
<400> 37
gagccaattc agatacgtct tgccgtcagc gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 38
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_Q
<400> 38
gagccaattc agatacgtct tgccgtcttg gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 39
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_R
<400> 39
gagccaattc agatacgtct tgccgtctct gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 40
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_F
<400> 40
gagccaattc agatacgtct tgccgtcaaa gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 41
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_K

<400> 41
gagccaattc agatacgtct tgccgtcttt gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 42
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_T
<400> 42
gagccaattc agatacgtct tgccgtcagt gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 43
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR1 Re_V
<400> 43
gagccaattc agatacgtct tgccgtcaac gtccagcagc gactggcttg atttgca 57
<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR2 Fo
<400> 44
gacggcaaga cgtatctgaa ttggctccag 30
<210> 45
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> VL FR2 Re_T-YH
<400> 45
gcgtttaatt tcaaccttag tgccettgccc gaacgtaaac ggaaagtrgg tgccctgcca 60
gcaatagtag acgcc 75
<210> 46
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL FR2 Re_T-LIHQNK

<400> 46

gcgtttaatt tcaaccttag tgccttgcc gaacgtaaac ggaaawwkgg tgccttgcca 60
gcaatagtag acgcc 75

<210> 47

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL FR2 Re_FYIN-YH

<400> 47

gcgtttaatt tcaaccttag tgccttgcc gaacgtaaac ggaaagtraw wgccttgcca 60
gcaatagtag acgcc 75

<210> 48

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL FR2 Re_FYIN-LIHQNK

<400> 48

gcgtttaatt tcaaccttag tgccttgcc gaacgtaaac ggaaawwkaw wgccttgcca 60
gcaatagtag acgcc 75

<210> 49

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL最终Re(VL Final Re)

<400> 49

gcgtttaatt tcaaccttag tgccttgcc gaacgtaaa 39

<210> 50

<211> 43

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> VL最终Fo SfiI(VL Final Fo SfiI)

<400> 50

cgtggcccag gcggccgacg tggatgatgac acagacgccg ctg 43

- <210> 51
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL最终Fo NruI(VL Final Fo NruI)
 <400> 51
 ctatcgcgat tgcagtggca ctggctggtt tcg 33
 <210> 52
 <211> 96
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL重叠Fo(VL Overlapping Fo)
 <400> 52
 ggcacgctgg tgactgtgag ctccggaggc ggcggaagtg gcggaggagg cagcggcgga 60
 ggcgggagtg acgtggtgat gacacagacg ccgctg 96
 <210> 53
 <211> 72
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL最终Re(VL Final Re)
 <400> 53
 gtcctcttca gaaataagct ttgttcgga tccgcgttta attcaacct tagtgccttg 60
 gccgaacgta aa 72
 <210> 54
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH同源重组(Homologous recombination)
 <400> 54
 gctctgcagg ctagtggagg tgggtgttct ggtggtggtg gttctggtgg tgggtgttct 60
 gctagc 66
 <210> 55
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

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

Arg

<210> 58

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1015_可变重链(Clone 1015_Variable heavy chain)

<400> 58

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

<210> 59

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1021_可变重链(Clone 1021_Variable heavy chain)

<400> 59

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

<210> 60

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1023_可变重链(Clone 1023_Variable heavy chain)

<400> 60

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

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

Arg

<210> 65

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1123_可变重链(Clone 1123_Variable heavy chain)

<400> 65

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

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1202_可变重链(Clone 1202_Variable heavy chain)

<400> 66

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

<210> 67

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1208_可变轻链(Clone 1208_Variable light chain)

<400> 67

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

Thr Tyr Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 68

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1216_可变重链(Clone 1216_Variable heavy chain)

<400> 68

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 69

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1216_可变重链(Clone 1216_Variable light chain)

<400> 69

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

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

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Leu Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg

<210> 70

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1223_可变重链(Clone 1223_Variable heavy chain)

<400> 70

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

<210> 71

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1234_可变重链(Clone 1234_Variable heavy chain)

<400> 71

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

<210> 72

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1234_可变轻链(Clone 1234_Variable light chain)

<400> 72

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

Arg

<210> 73

<211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1243_可变重链(Clone 1243_Variable heavy chain)
 <400> 73
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 His Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly His Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 74
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1248_可变重链(Clone 1248_Variable heavy chain)
 <400> 74
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Asp Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 75

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3007_可变重链(Clone 3007_Variable heavy chain)

<400> 75

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3016_可变重链(Clone 3016_Variable heavy chain)

<400> 76

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

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

<210> 77

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3016_可变轻链(Clone 3016_Variable light chain)

<400> 77

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

Arg

<210> 78

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3024_可变重链(Clone 3024_Variable heavy chain)

<400> 78

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

<210> 79

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3120_可变重链(Clone 3120_Variable heavy chain)

<400> 79

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

Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 82

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4011_可变重链(Clone 4011_Variable heavy chain)

<400> 82

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

<210> 83

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4011_可变轻链(Clone 4011_Variable light chain)

<400> 83

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

Arg

<210> 84

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4017_可变重链(Clone 4017_Variable heavy chain)

<400> 84

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

<210> 85

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4034_可变重链(Clone 4034_Variable heavy chain)

<400> 85

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

<210> 86

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4041_可变重链(Clone 4041_Variable heavy chain)

<400> 86

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

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

<210> 89

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4206_可变重链(Clone 4206_Variable heavy chain)

<400> 89

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

<210> 90

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4208_可变重链(Clone 4208_Variable heavy chain)

<400> 90

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

<210> 91

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4208_可变轻链(Clone 4208_Variable light chain)

<400> 91

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

	85	90	95
Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110

Arg

<210> 92

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4278_可变重链(Clone 4278_Variable heavy chain)

<400> 92

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gln Tyr Leu Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln			
	100	105	110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115	120

<210> 93

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4287_可变重链(Clone 4287_Variable heavy chain)

<400> 93

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

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

Ala Met Asn Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
---	--	--	--

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

<210> 94

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 4_可变重链(Clone 4_Variable heavy chain)

<400> 94

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

<210> 95

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 6_可变重链(Clone 6_Variable heavy chain)

<400> 95

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

<210> 96

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 9_可变重链(Clone 9_Variable heavy chain)

<400> 96

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

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 97

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 11_可变重链(Clone 11_Variable heavy chain)

<400> 97

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 98

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 12_可变重链(Clone 12_Variable heavy chain)

<400> 98

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50	55	60																		
Glu	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr					
65					70					75				80						
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys					
				85						90				95						
Ala	Arg	Gln	Asp	Gly	His	Phe	Leu	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr					
			100					105					110							
Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser															

<210> 99

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 13_可变重链(Clone 13_Variable heavy chain)

<400> 99

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

<210> 100

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 14_可变轻链(Clone 14_Variable light chain)

<400> 100

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

Arg

<210> 101

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 15_可变轻链(Clone 15_Variable light chain)

<400> 101

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

Arg

<210> 102

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 16_可变重链(Clone 16_Variable heavy chain)

<400> 102

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

<210> 103

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 17_可变重链(Clone 17_Variable heavy chain)

<400> 103

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

85 90 95
Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 104

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 18_可变重链(Clone 18_Variable heavy chain)

<400> 104

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 105

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 19_可变重链(Clone 19_Variable heavy chain)

<400> 105

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

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

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

<210> 106

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 20_可变重链(Clone 20_Variable heavy chain)

<400> 106

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

<210> 107

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 21_可变重链(Clone 21_Variable heavy chain)

<400> 107

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

<210> 108

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 22_可变轻链(Clone 22_Variable light chain)

<400> 108

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

	100	105	110
Arg			
<210>	109		
<211>	118		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	克隆 23_可变重链(Clone 23_Variable heavy chain)		
<400>	109		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser His Tyr			
	20	25	30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	35	40	45
Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
	50	55	60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gln Asp Gly His Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	110		
<211>	5		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			
<223>	克隆 1001_可变重链 CDR 1(Clone 1001_Variable heavy chain CDR 1)		
<400>	110		
Ser Tyr Ala Met Asn			
1	5		
<210>	111		
<211>	17		
<212>	PRT		
<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
<220>			

<223> 克隆 1001_可变重链 CDR 2(Clone 1001_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 111
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 112
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1001_可变重链 CDR 3(Clone 1001_Variable heavy chain CDR 3)
 <400> 112
 Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 113
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1001_可变轻链 CDR 1(Clone 1001_Variable light chain CDR 1)
 <400> 113
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 114
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1001_可变轻链 CDR 2(Clone 1001_Variable light chain CDR 2)
 <400> 114
 Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
 1 5
 <210> 115
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1001_可变轻链 CDR 3(Clone 1001_Variable light chain CDR 3)
 <400> 115

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe

1 5

<210> 116

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1015_可变重链 CDR 2(Clone 1015_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 116

Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu

1 5 10 15

Gly

<210> 117

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1021_可变重链 CDR 3(Clone 1021_Variable heavy chain CDR 3)

<400> 117

Gln Asp Gly His Phe Leu Met Asp Tyr

1 5

<210> 118

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1024_可变重链 CDR 1(Clone 1024_Variable heavy chain CDR 1)

<400> 118

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 119

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1024_可变轻链 CDR 1(Clone 1024_Variable light chain CDR 1)

<400> 119

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Leu Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1104_可变重链 CDR 2(Clone 1104_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 120
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 121
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1104_可变轻链 CDR 1(Clone 1104_Variable light chain CDR 1)
 <400> 121
 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Val Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 122
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1208_可变轻链 CDR 3(Clone 1208_Variable light chain CDR 3)
 <400> 122
 Trp Gln Gly Thr Tyr Leu Pro Phe
 1 5
 <210> 123
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1214_可变重链 CDR 2(Clone 1214_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 123
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 124

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1216_可变重链 CDR 1(Clone 1216_Variable heavy chain CDR 1)
 <400> 124
 His Tyr Ala Met Asn
 1 5
 <210> 125
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1216_可变轻链 CDR 3(Clone 1216_Variable light chain CDR 3)
 <400> 125
 Trp Gln Gly Thr His Leu Pro Phe
 1 5
 <210> 126
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1234_可变重链 CDR 2(Clone 1234_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 126
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 127
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 1243_可变重链 CDR 2(Clone 1243_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 127
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val His
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 128
 <211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1248_可变重链 CDR 2(Clone 1248_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 128

Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp

1 5 10 15

Gly

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3007_可变重链 CDR 2(Clone 3007_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 129

Thr Ile Thr Leu Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 130

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3016_可变轻链 CDR 1(Clone 3016_Variable light chain CDR 1)

<400> 130

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3120_可变重链 CDR 3(Clone 3120_Variable heavy chain CDR 3)

<400> 131

Gln Asp Gly Tyr Phe Leu Met Asp Tyr

1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 3131_可变重链 CDR 3(Clone 3131_Variable heavy chain CDR 3)
 <400> 132
 Gln Asp Gly Gln Phe Leu Met Asp Tyr
 1 5
 <210> 133
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 4278_可变重链 CDR 1(Clone 4278_Variable heavy chain CDR 1)
 <400> 133
 Lys Tyr Ala Met Asn
 1 5
 <210> 134
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 4278_可变重链 CDR 2(Clone 4278_Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 134
 Thr Ile Thr Leu Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 135
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 4278_可变重链 CDR 3(Clone 4278_Variable heavy chain CDR 3)
 <400> 135
 Gln Tyr Leu Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 136
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>

<223> 克隆 4287_可变重链 CDR 3(Clone 4287_Variable heavy chain CDR 3)

<400> 136

Gln His Pro Tyr Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 137

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 1_可变轻链 CDR 1(Clone 1_Variable light chain CDR 1)

<400> 137

Lys Ser Ser Pro Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 138

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 2_可变轻链 CDR 1(Clone 2_Variable light chain CDR 1)

<400> 138

Lys Ser Ser Pro Ser Leu Leu Asp Ile Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 139

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 3_可变轻链 CDR 1(Clone 3_Variable light chain CDR 1)

<400> 139

Lys Ser Ser Pro Ser Leu Leu Asp Val Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 14_可变轻链 CDR 3(Clone 14_Variable light chain CDR 3)

<400> 140

Trp Gln Gly Thr Tyr Phe Pro Phe

1 5
<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 15_可变轻链 CDR 3(Clone 15_Variable light chain CDR 3)
<400> 141
Trp Gln Gly Phe Tyr Phe Pro Phe
1 5
<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 16_可变重链 CDR 1(Clone 16_Variable heavy chain CDR 1)
<400> 142
His Tyr Ala Met Thr
1 5
<210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 17_可变重链 CDR 1(Clone 17_Variable heavy chain CDR 1)
<400> 143
Ser Tyr Ala Met Thr
1 5
<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 19_可变重链 CDR 1(Clone 19_Variable heavy chain CDR 1)
<400> 144
Gln Tyr Ala Met Asn
1 5
<210> 145
<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 19_可变重链 CDR 2(Clone 19_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 145

Thr Ile Thr Lys Lys Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp
1 5 10 15

Gly

<210> 146

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 19_可变重链 CDR 3(Clone 19_Variable heavy chain CDR 3)

<400> 146

Gln Asp Gly Glu Phe Leu Met Asp Tyr
1 5

<210> 147

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 20_可变重链 CDR 2(Clone 20_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 147

Thr Ile Lys Lys Gly Gly Ser Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp
1 5 10 15

Gly

<210> 148

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 21_可变重链 CDR 2(Clone 21_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 148

Thr Ile Thr Lys Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Asp
1 5 10 15

Gly

<210> 149

<211> 5

<212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 23_可变重链 CDR 1(Clone 23_Variable heavy chain CDR 1)
 <400> 149
 His Tyr Ala Met Asn
 1 5
 <210> 150
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH Fo
 <400> 150
 tgctgtgggt gagggtacc tgggggaag tccagctggt ggagtctgga ggt 53
 <210> 151
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VH Re
 <400> 151
 agtgggaaca cggagggccc cttggtgctg gcggagctca cagtcaccag cgtgcc 56
 <210> 152
 <211> 53
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL Fo
 <400> 152
 tgctgtgggt gagggtacc tgggggacg tggatgac acagacgccg ctg 53
 <210> 153
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> VL Re_CL 重叠(overlap)
 <400> 153
 gatgaacaca gaaggggcag ccaccgtgcg ttaatttca accttagtgc cttggccgaa 60

cgtaaa 66
 <210> 154
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ck Fo
 <400> 154
 acgggtggctg ccccttctgt gttcatc 27
 <210> 155
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> Ck Re
 <400> 155
 gattggatcc aagcttacta gcactcaccc ctgttgaaag actta 45
 <210> 156
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 A24_可变重链(Clone A24_Variable heavy chain)
 <400> 156
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Thr Arg Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 157

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A25_可变轻链(Clone A25_Variable light chain)

<400> 157

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

Arg

<210> 158

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A52_可变重链(Clone A52_Variable heavy chain)

<400> 158

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

65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 159
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 A63_可变重链(Clone A63_Variable heavy chain)
 <400> 159
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 160
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 A71_可变重链(Clone A71_Variable heavy chain)
 <400> 160
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

<210> 161

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A74_可变重链(Clone A74_Variable heavy chain)

<400> 161

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

<210> 162

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A25_可变轻链 CDR 1(Clone A25_Variable light chain CDR 1)

<400> 162

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Arg Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 163

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A71_可变重链 CDR 2(Clone A71_Variable heavy chain CDR 2)

<400> 163

Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val His

1 5 10 15

Gly

<210> 164

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 A74_可变重链 CDR 1(Clone A74_Variable heavy chain CDR 1)

<400> 164

Ser Tyr Ala Met His

1 5

<210> 165

<211> 304

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人类组织因子途径抑制因子(HUMAN Tissue factor pathway inhibitor)

<400> 165

Met Ile Tyr Thr Met Lys Lys Val His Ala Leu Trp Ala Ser Val Cys

1 5 10 15

Leu Leu Leu Asn Leu Ala Pro Ala Pro Leu Asn Ala Asp Ser Glu Glu

20 25 30

Asp Glu Glu His Thr Ile Ile Thr Asp Thr Glu Leu Pro Pro Leu Lys

35 40 45

Leu Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys
 50 55 60
 Ala Ile Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu
 65 70 75 80
 Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser
 85 90 95
 Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp Asn Ala Asn Arg Ile
 100 105 110
 Ile Lys Thr Thr Leu Gln Gln Glu Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu
 115 120 125
 Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn
 130 135 140
 Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly
 145 150 155 160
 Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu
 165 170 175
 Asp Gly Pro Asn Gly Phe Gln Val Asp Asn Tyr Gly Thr Gln Leu Asn
 180 185 190
 Ala Val Asn Asn Ser Leu Thr Pro Gln Ser Thr Lys Val Pro Ser Leu
 195 200 205
 Phe Glu Phe His Gly Pro Ser Trp Cys Leu Thr Pro Ala Asp Arg Gly
 210 215 220
 Leu Cys Arg Ala Asn Glu Asn Arg Phe Tyr Tyr Asn Ser Val Ile Gly
 225 230 235 240
 Lys Cys Arg Pro Phe Lys Tyr Ser Gly Cys Gly Gly Asn Glu Asn Asn
 245 250 255
 Phe Thr Ser Lys Gln Glu Cys Leu Arg Ala Cys Lys Lys Gly Phe Ile
 260 265 270
 Gln Arg Ile Ser Lys Gly Gly Leu Ile Lys Thr Lys Arg Lys Arg Lys
 275 280 285
 Lys Gln Arg Val Lys Ile Ala Tyr Glu Glu Ile Phe Val Lys Asn Met
 290 295 300
 <210> 166
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 T417_小鼠可变重链(Clone T417_mouse Variable heavy chain)
 <400> 166

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

<210> 167

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变轻链(Clone T417_mouse Variable light chain)

<400> 167

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

Arg

<210> 168

<211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 T308_小鼠可变重链(Clone T308_mouse Variable heavy chain)
 <400> 168

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

<210> 169
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 T308_小鼠可变轻链(Clone T308_mouse Variable light chain)
 <400> 169

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

Arg

<210> 170

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变重链 CDR 1(Clone T417_mouse Variable heavy chain
 CDR 1)

<400> 170

Ser Tyr Ala Met Ser

1 5

<210> 171

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变重链 CDR 2(Clone T417_mouse Variable heavy chain
 CDR 2)

<400> 171

Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 172

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr

<400> 172

Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr

1 5

<210> 173

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变轻链 CDR 1(Clone T417_mouse Variable light chain CDR 1)

<400> 173

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 174

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变轻链 CDR 2(Clone T417_mouse Variable light chain CDR 2)

<400> 174

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 175

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T417_小鼠可变轻链 CDR 3(Clone T417_mouse Variable light chain CDR 3)

<400> 175

Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe

1 5

<210> 176

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T308_小鼠可变重链 CDR 1(Clone T308_mouse Variable heavy chain CDR 1)

<400> 176

Asn Tyr Pro Met Ser

1 5

<210> 177

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T308_小鼠可变重链 CDR 2(Clone T308_mouse Variable heavy chain CDR 2)

<400> 177

Thr Ile Ser Asn Ser Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 178

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T308_小鼠可变重链 CDR 3(Clone T308_mouse Variable heavy chain CDR 3)

<400> 178

Gln Val Tyr Gly Asn Tyr Glu Asp Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 179

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T308_小鼠可变轻链 CDR 1(Clone T308_mouse Variable light chain CDR 1)

<400> 179

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn

1 5 10 15

<210> 180

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 T308_小鼠可变轻链 CDR 2(Clone T308_mouse Variable light chain CDR 2)

<400> 180

Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser

1 5

<210> 181

<211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 T308_小鼠可变轻链 CDR 3(Clone T308_mouse Variable light chain CDR 3)
 <400> 181
 Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
 1 5
 <210> 182
 <211> 87
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 引物_T417VH-F(Primer_T417VH-F)
 <400> 182
 gcggccgcca tgtatctggg tctgaactat gtctttatcg tgtttctgct gaatggtgtg 60
 cagtctgagg tgcacctggt ggagtct 87
 <210> 183
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 引物_T417VH Apa-R(Primer_T417VH Apa-R)
 <400> 183
 nnnngggccc cttggtgctg gctgaggaga cggtgaccgt ggt 43
 <210> 184
 <211> 95
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 引物_T417 VL-F(Primer_T417 VL-F)
 <400> 184
 gcggccgcca tggatagcca ggetcaggtg ctgatgetgc tgctgctgtg ggtgtcaggg 60
 acttgcgggg acgttgtgat gaccagaact ccaact 95
 <210> 185
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物_VL-R(Primer_VL-R)

<400> 185

nnnnggtacc agatttcaac tgctcatcag a 31

<210> 186

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 308_人源化可变重链(Clone 308_humanized Variable heavy chain)

<400> 186

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 187

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 克隆 308_人源化可变轻链(Clone 308_humanized Variable light chain)

<400> 187

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

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

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser

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

Arg
<210> 188
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 308_人源化可变重链 CDR 1(Clone 308_humanized Variable heavy chain CDR 1)
<400> 188
Ser Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 189
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 克隆 308-2_人源化和突变的可变重链(Clone 308-2_humanized and mutated Variable heavy chain)
<400> 189
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

	85	90	95
Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 190			
<211> 118			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 克隆 308-4_人源化和突变的可变重链(Clone 308-4_humanized and mutated Variable heavy chain)			
<400> 190			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1 5 10 15			
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20 25 30			
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35 40 45			
Ser Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50 55 60			
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65 70 75 80			
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Arg Gln Asp Gly Asn Phe Leu Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
100 105 110			
Leu Val Thr Val Ser Ser			
	115		
<210> 191			
<211> 17			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 克隆 308-2_人源化和突变的可变重链 CDR 2(Clone 308-2_humanized and mutated Variable heavy chain CDR 2)			
<400> 191			
Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Gln			
1 5 10 15			

Gly
 <210> 192
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 克隆 308-4_人源化和突变的可变重链 CDR 2(Clone 308-4_humanized and mutated Variable heavy chain CDR 2)
 <400> 192
 Thr Ile Thr Thr Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15

Gly
 <210> 193
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 引物_VH Fo(Primer_VH Fo)
 <400> 193
 tgctgtgggt gactggtacc tgtggggaag tgcagctcgt ggagagcgg 50
 <210> 194
 <211> 56
 <212> DNA
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 引物_VH Re(Primer_VH Re)
 <400> 194
 agtgggaaca cggagggcc cttggtgctg gcggatgaga cagtcacaag tgtccc 56
 <210> 195
 <211> 58
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人_TFPI Kunitz结构域2(Human_TFPI Kunitz domain 2)
 <400> 195
 Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly
 1 5 10 15
 Tyr Ile Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg
 20 25 30

Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Met Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 35 40 45

Glu Glu Cys Lys Asn Ile Cys Glu Asp Gly
 50 55

<210> 196

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 兔_TFPI Kunitz结构域2(Rabbit_TFPI Kunitz domain 2)

<400> 196

Lys Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Ile Cys Arg Gly
 1 5 10 15

Phe Met Thr Arg Tyr Phe Tyr Asn Asn Gln Ser Lys Gln Cys Glu Gln
 20 25 30

Phe Lys Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Ser Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 35 40 45

Glu Glu Cys Arg Asn Thr Cys Glu Asp Pro
 50 55

<210> 197

<211> 58

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 小鼠_TFPI Kunitz结构域2(Mouse_TFPI Kunitz domain 2)

<400> 197

Arg Pro Asp Phe Cys Phe Leu Glu Glu Asp Pro Gly Leu Cys Arg Gly
 1 5 10 15

Tyr Met Lys Arg Tyr Leu Tyr Asn Asn Gln Thr Lys Gln Cys Glu Arg
 20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Leu Gly Asn Arg Asn Asn Phe Glu Thr Leu
 35 40 45

Asp Glu Cys Lys Lys Ile Cys Glu Asn Pro
 50 55

<210> 198

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物_HTK2 For(Primer_HTK2 For)
<400> 198
ccatggaaac cgcacttttg cttcctgga 29
<210> 199
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 引物_RTK2 For(Primer_RTK2 For)
<400> 199
ccatggaaac ccgatttctg ctttctggag 30
<210> 200
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 引物_MTK2 For(Primer_MTK2 For)
<400> 200
ccatggagac ctgacttctg ctttctggag 30
<210> 201
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 引物_HTK2 Re(Primer_HTK2 Re)
<400> 201
gcggccgcct agccgtcttc acagatgttc ttg 33
<210> 202
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 引物_RTK2 Re(Primer_RTK2 Re)
<400> 202
gcggccgcct aggggtcctc acaggtgttg 30
<210> 203
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 引物_MTK2 Re(Primer_MTK2 Re)

<400> 203

gcggccgcct aggggttctc acagatttcc ttgcatt 37

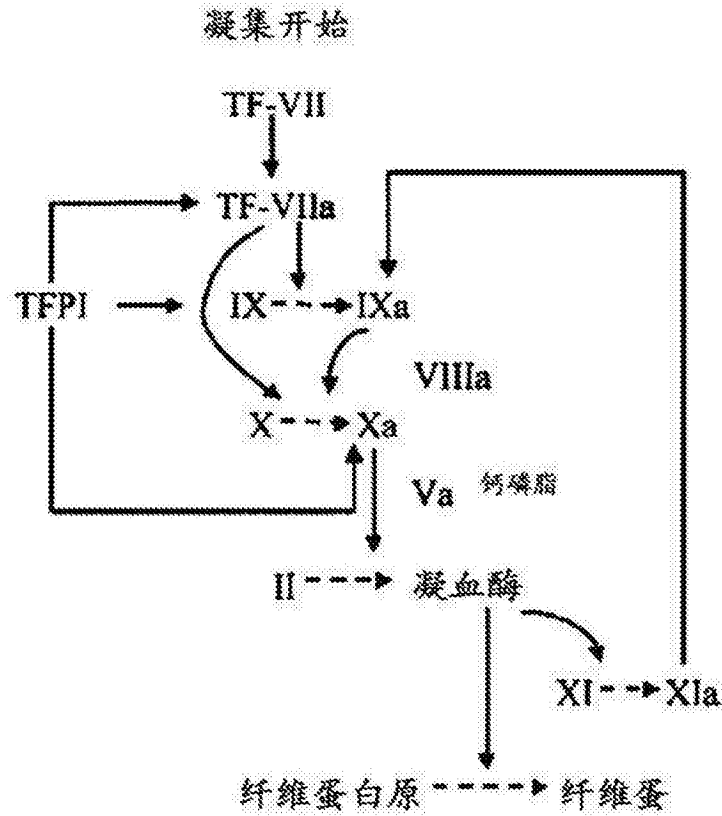


图1

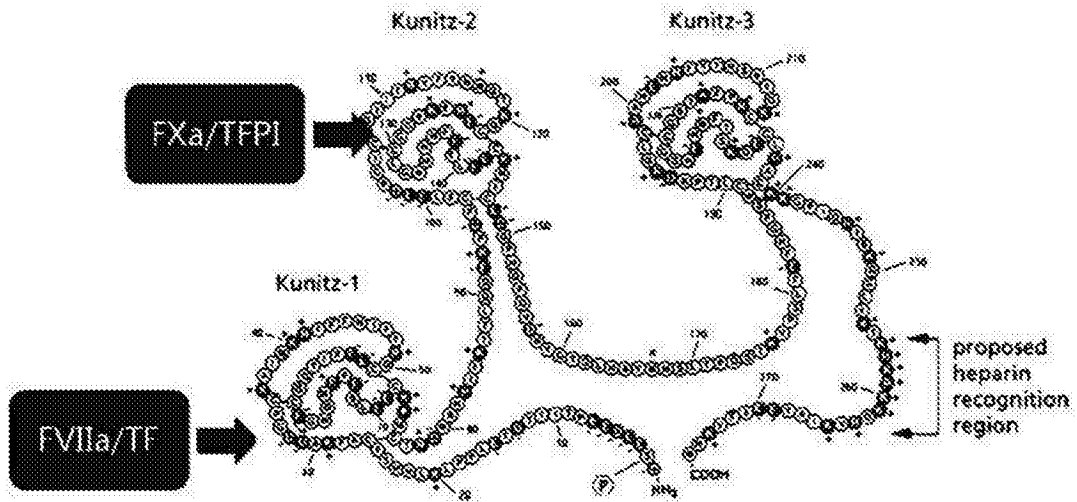


图2

未还原

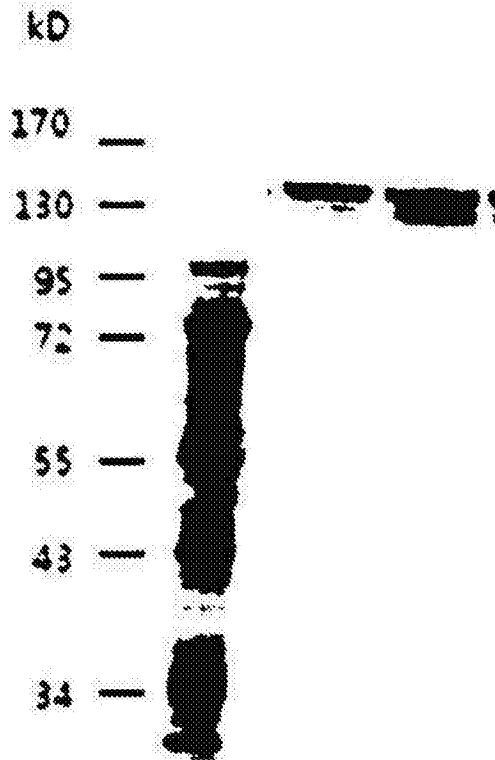


图3

序列比对

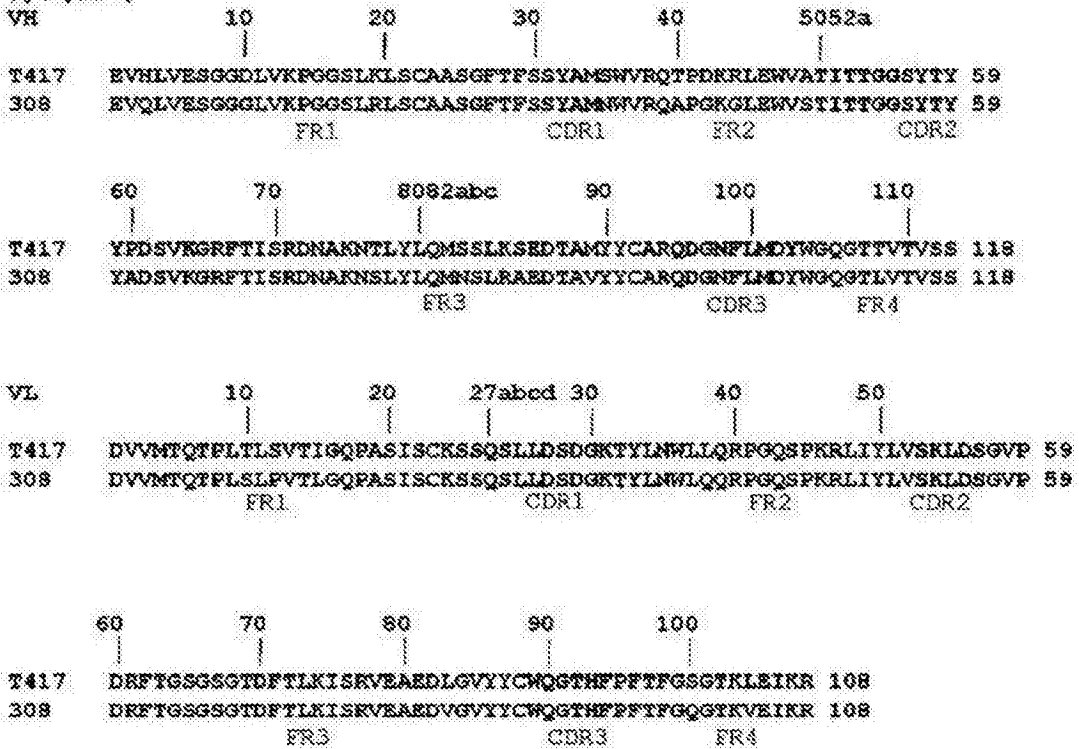


图4

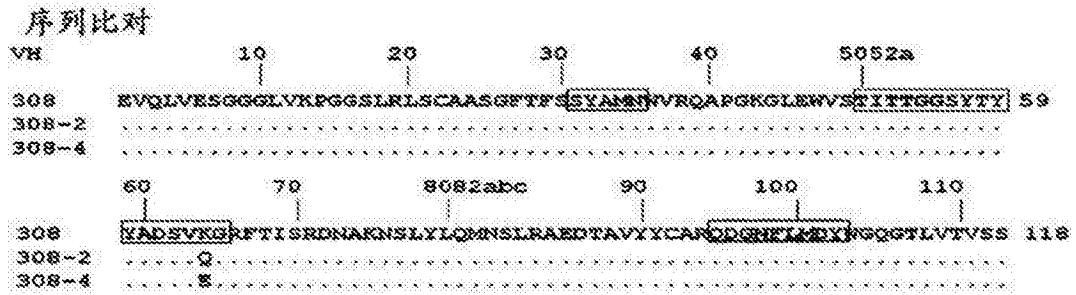


图5

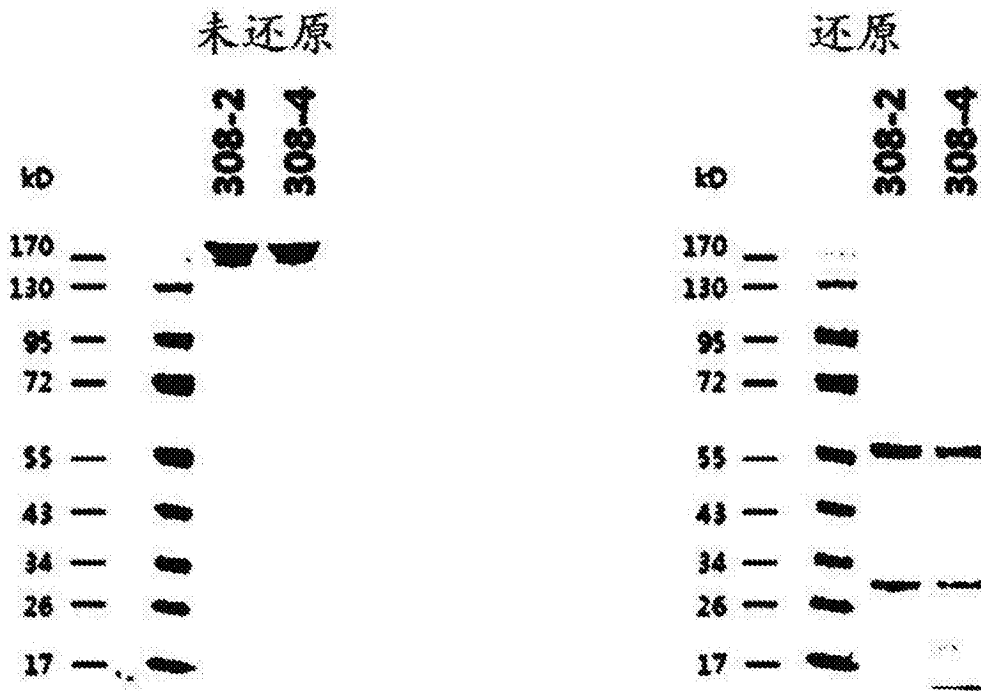


图6

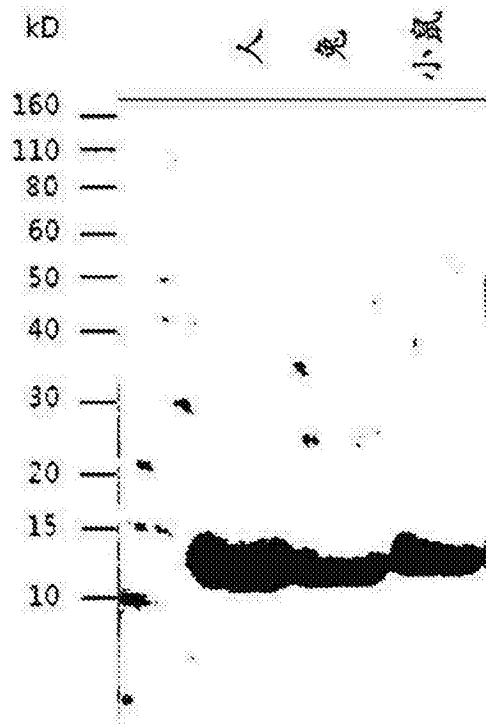


图7

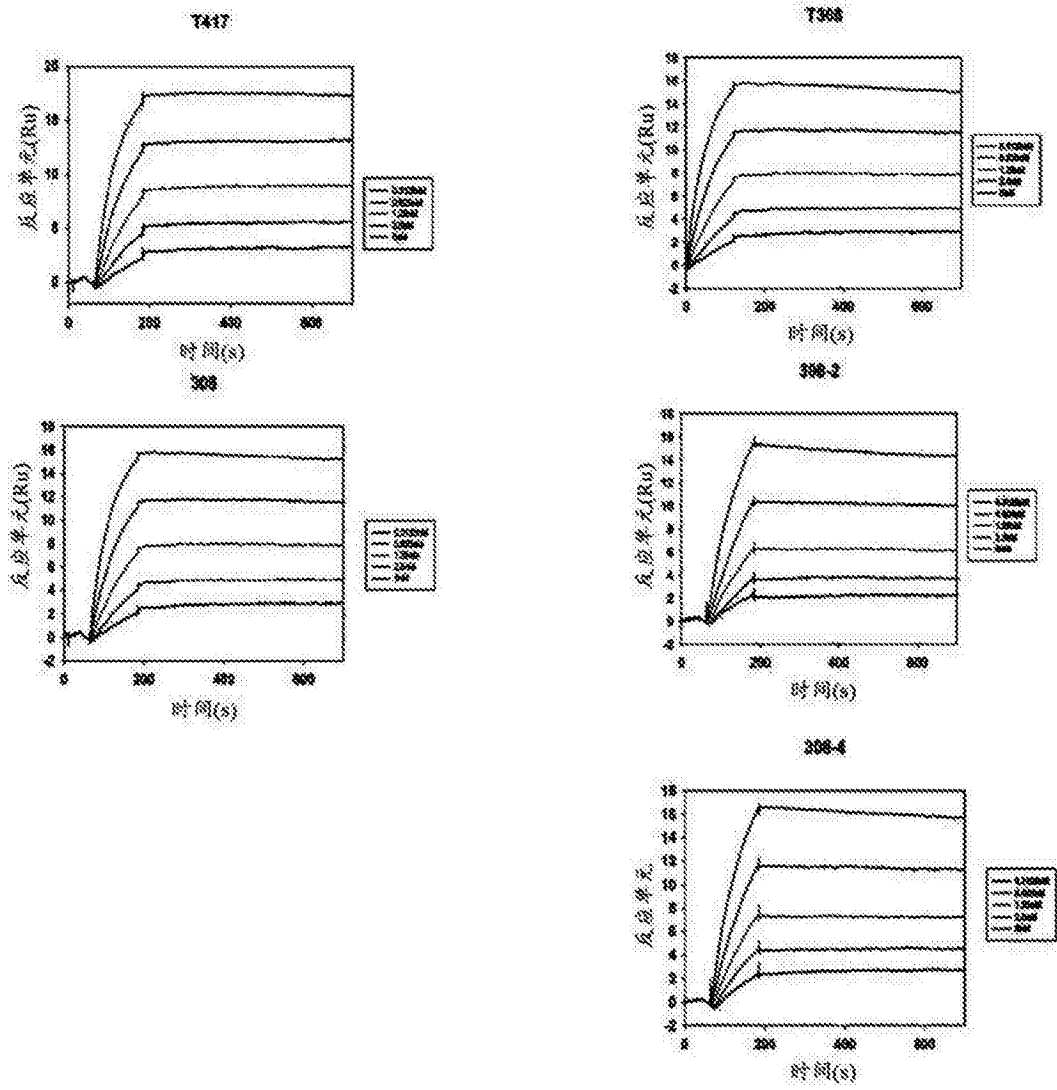


图8

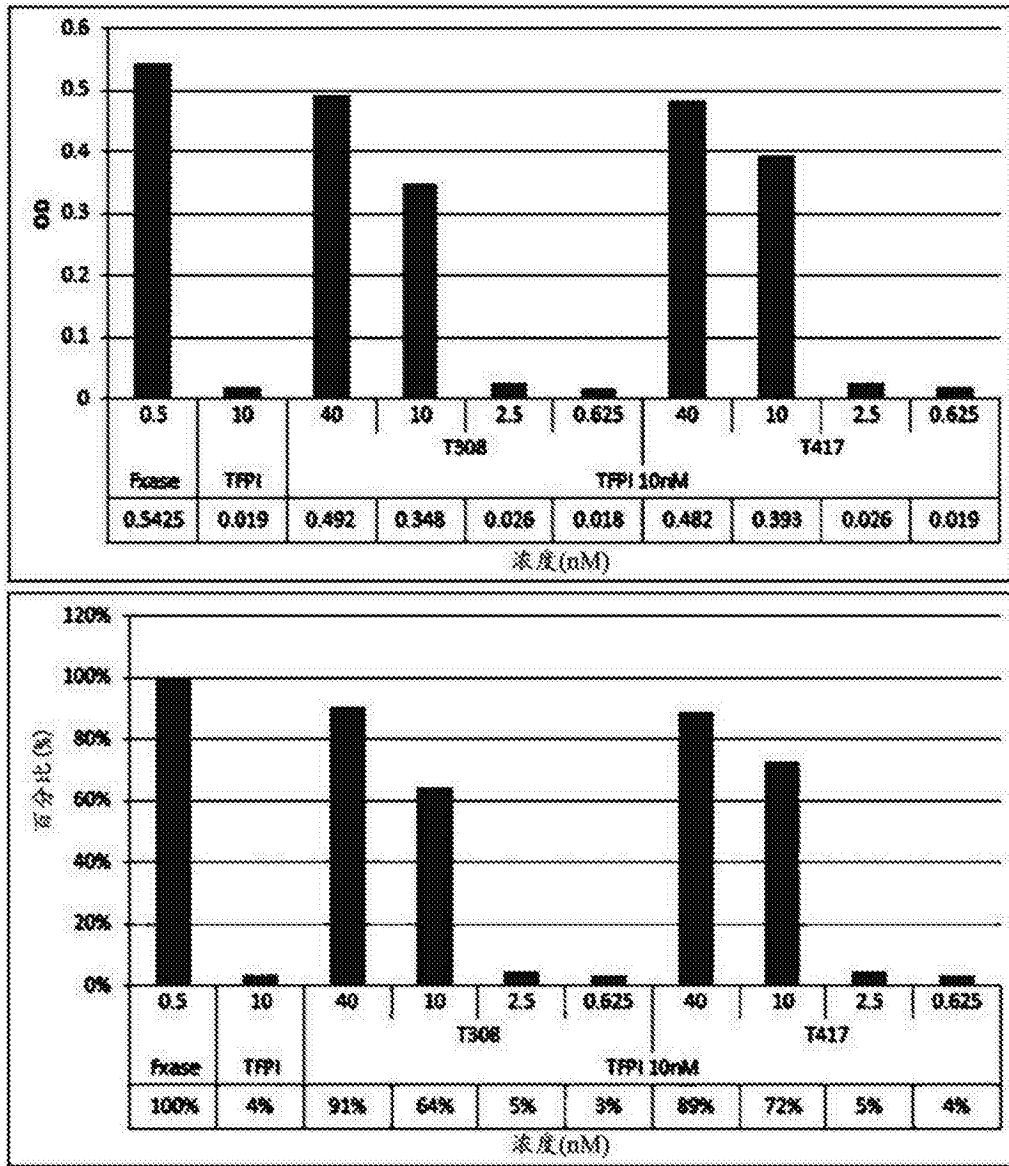


图9

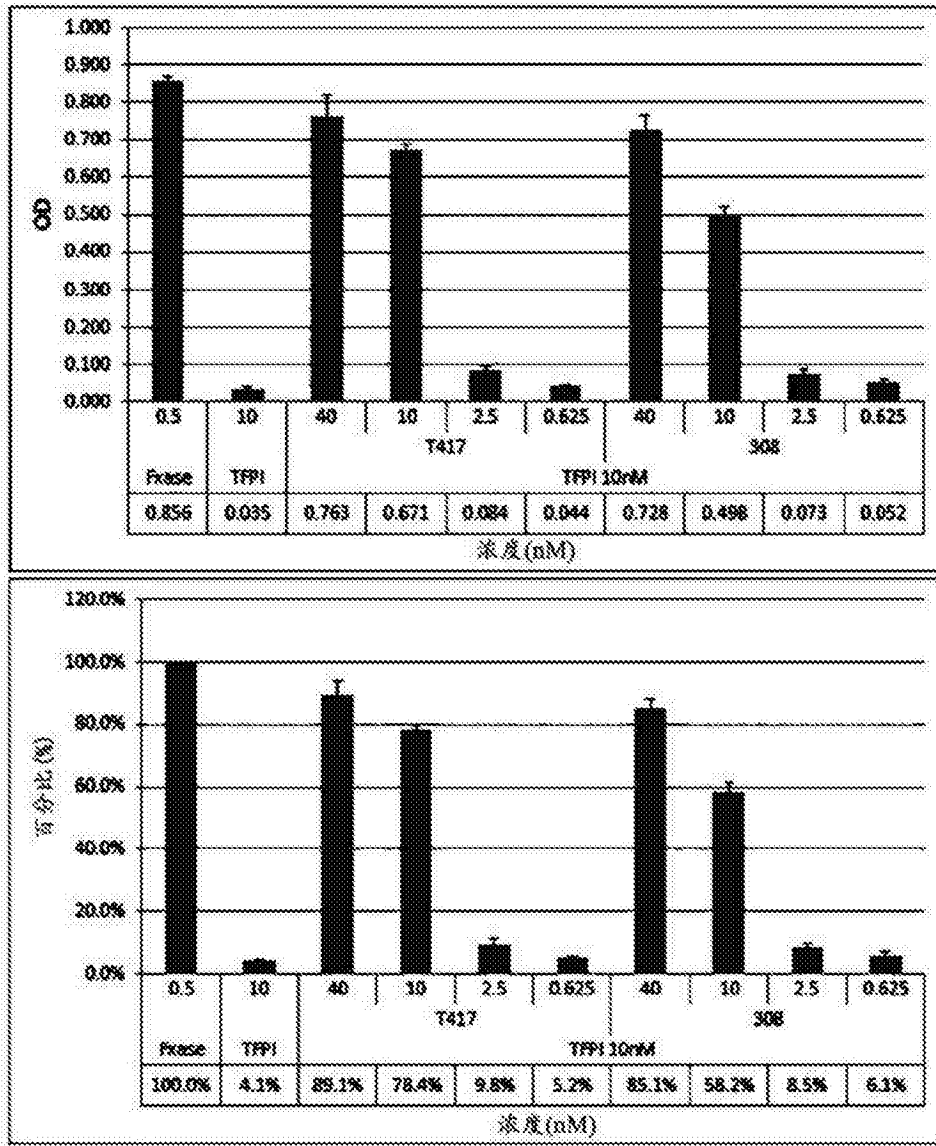


图10

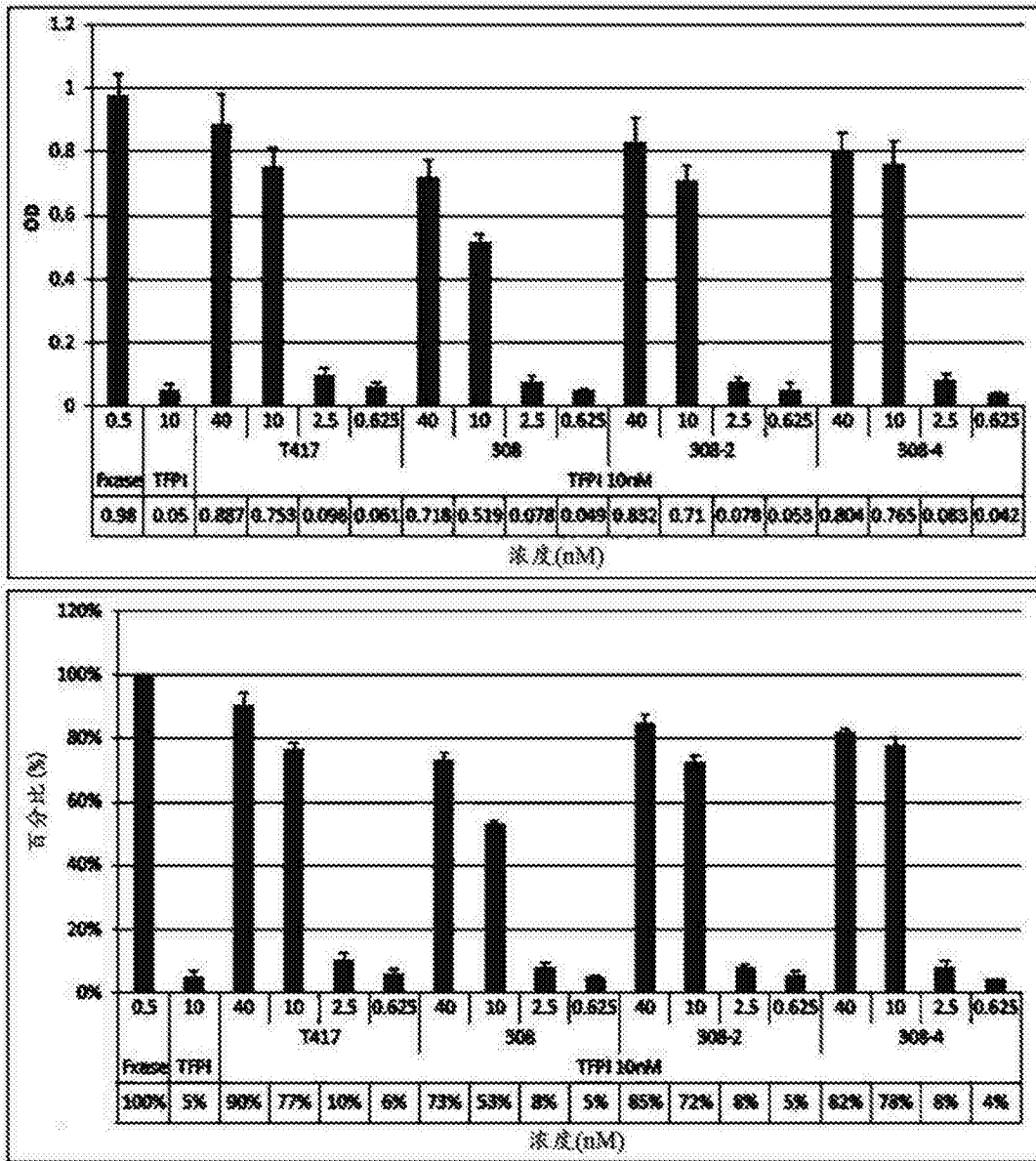


图11

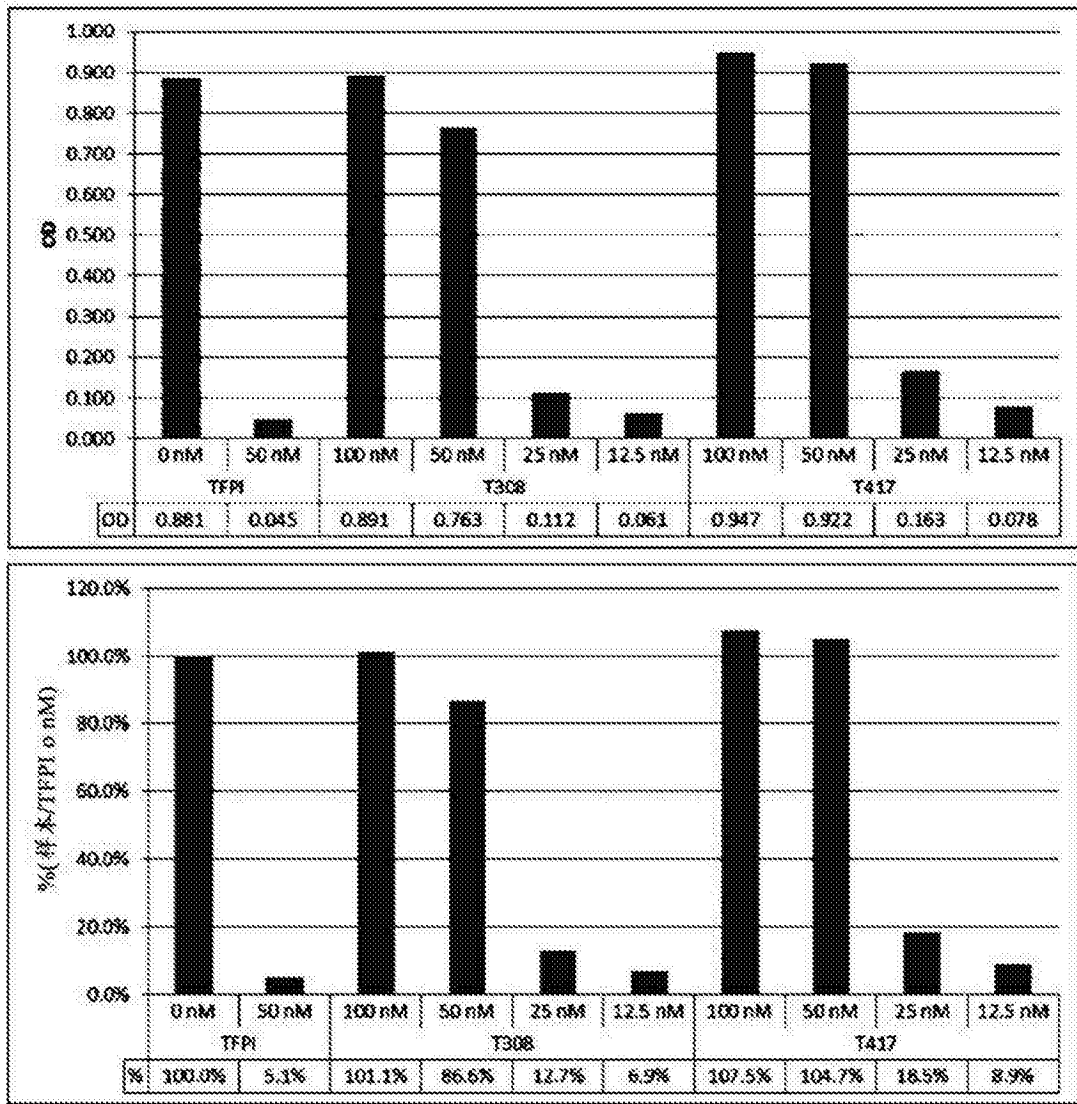


图12

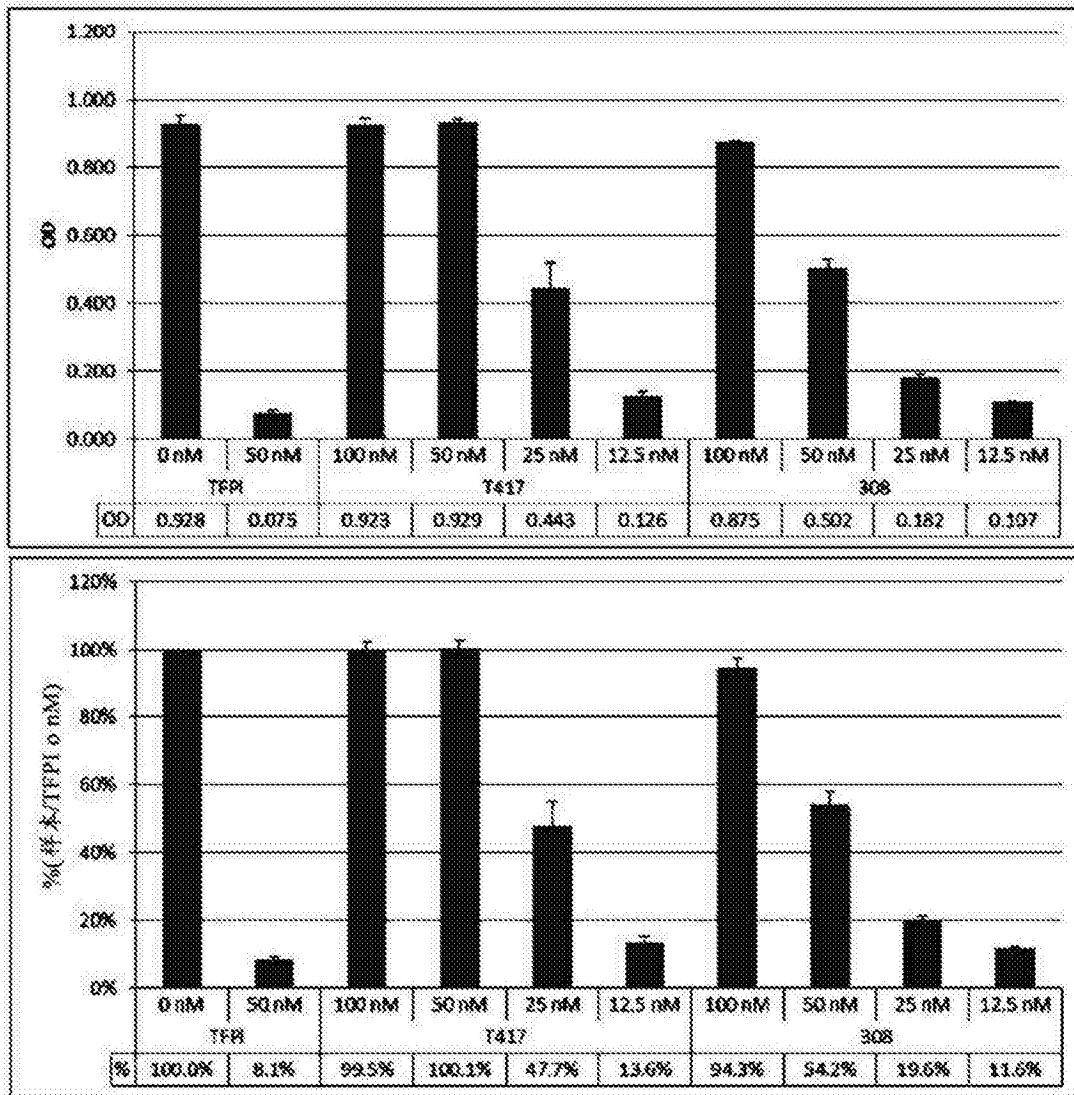


图13

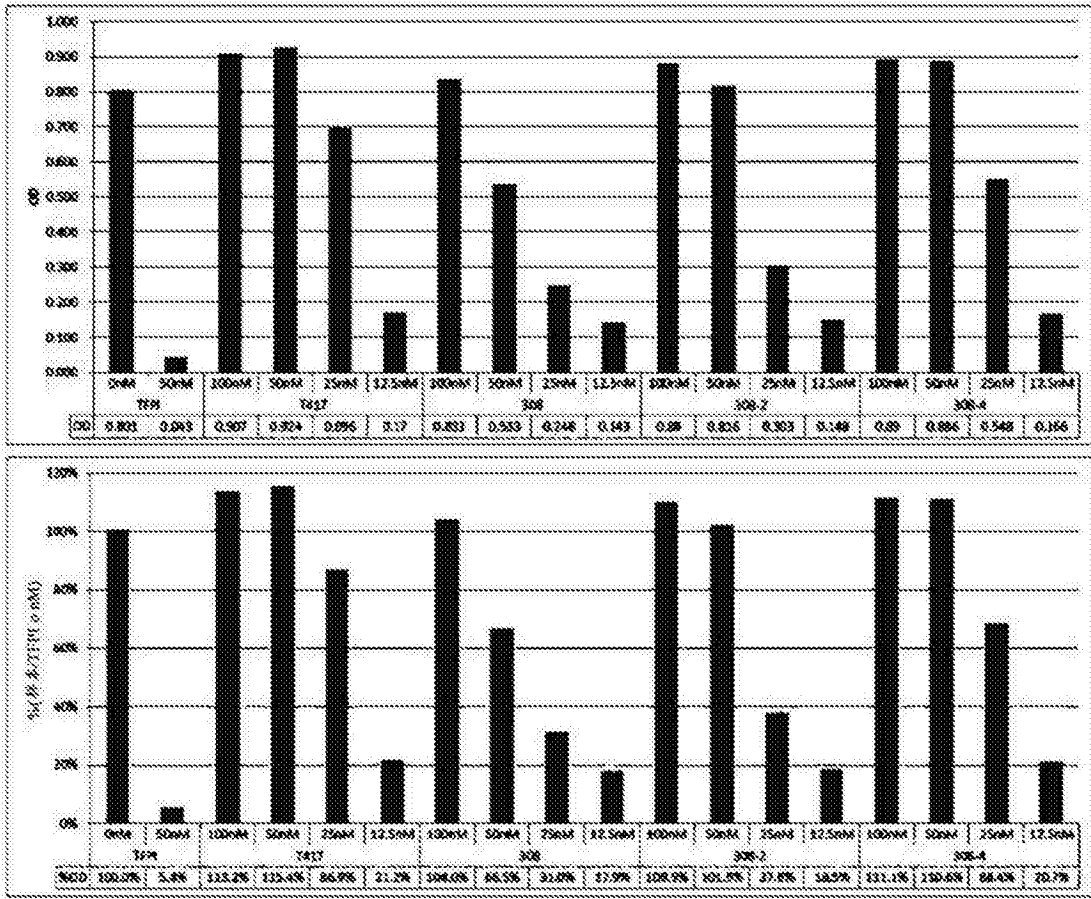


图14

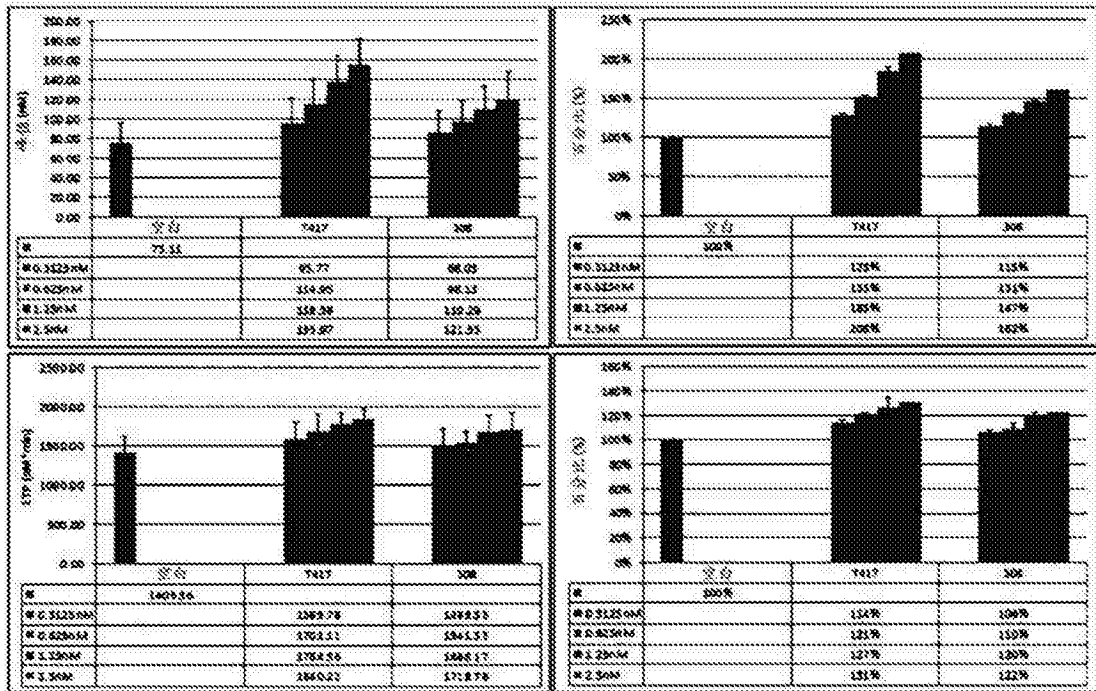


图15

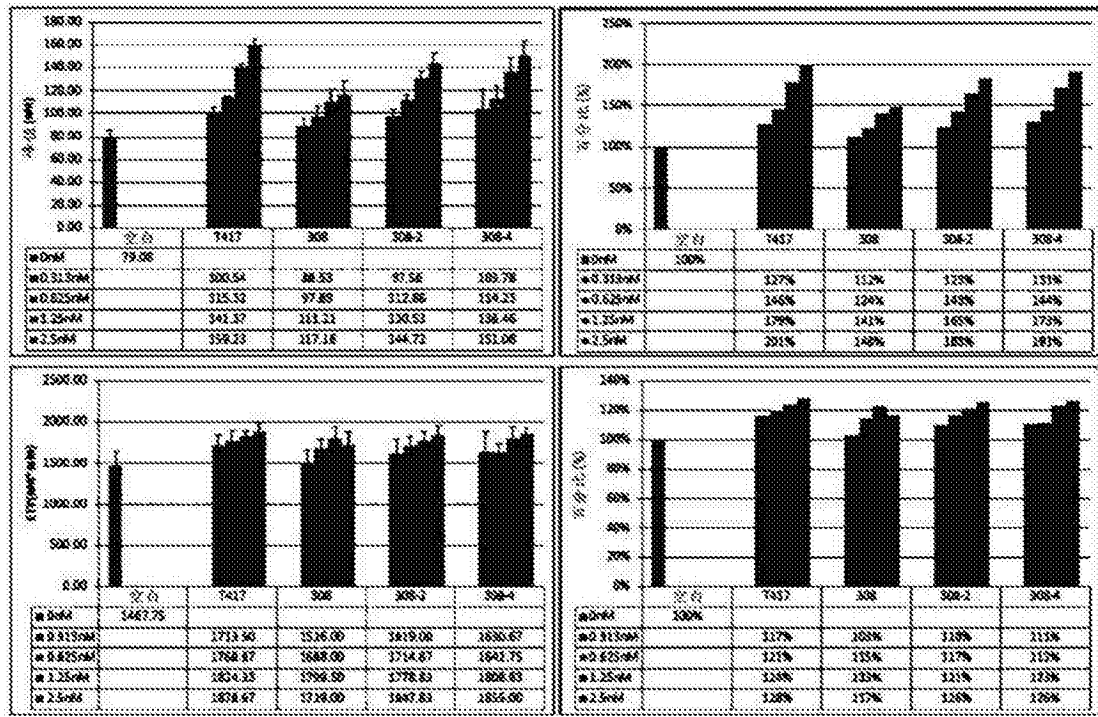


图16

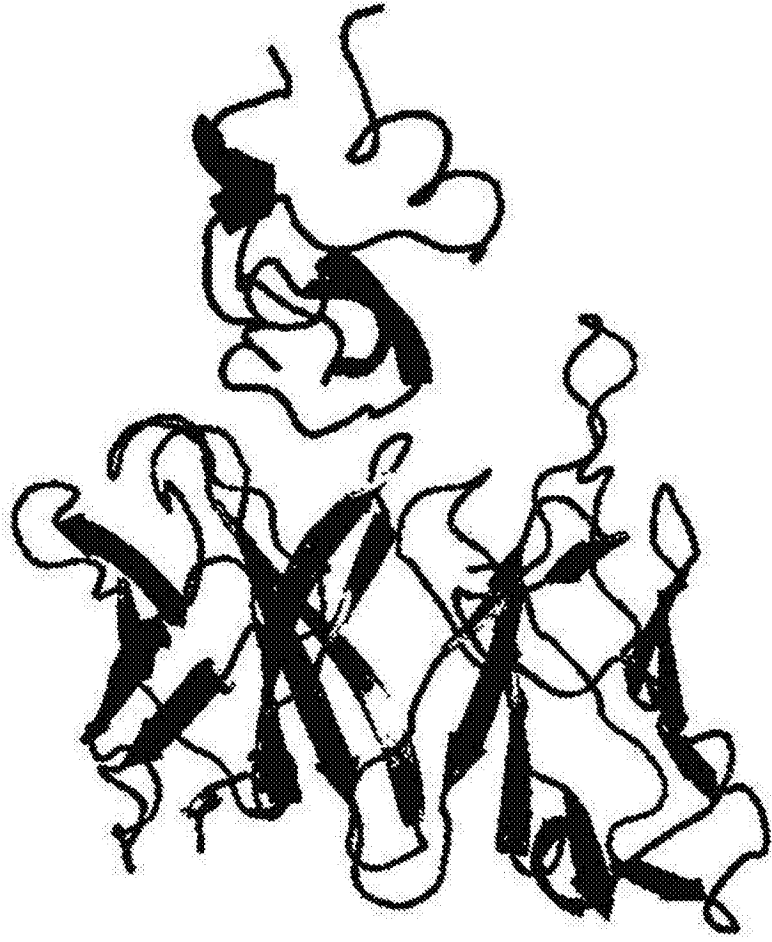
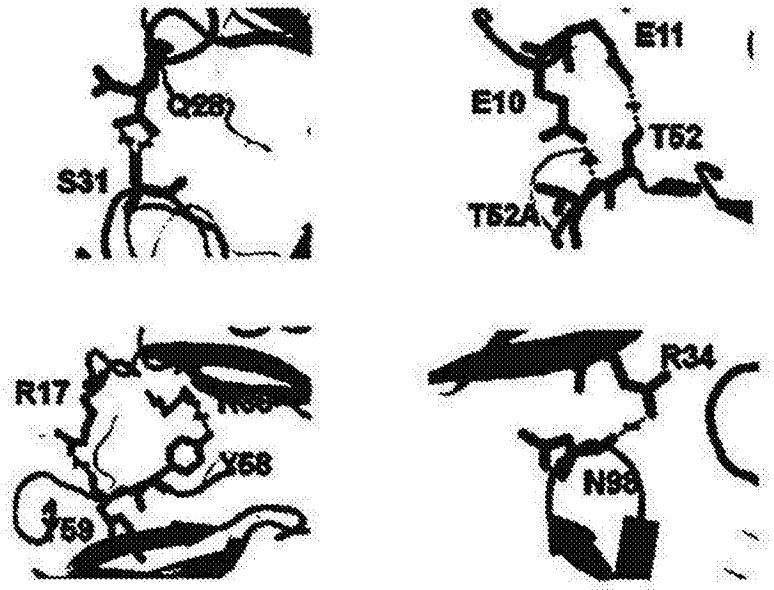
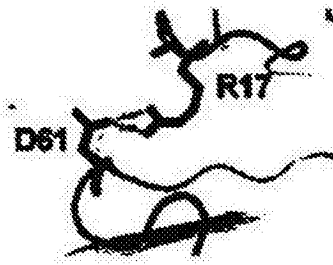


图17

重链可变区
氢键



盐桥



疏水相互作用

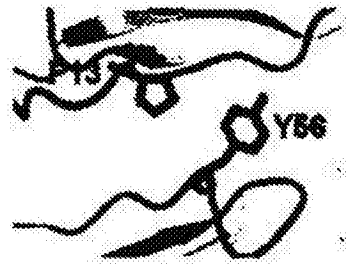


图18

轻链可变区
氢键

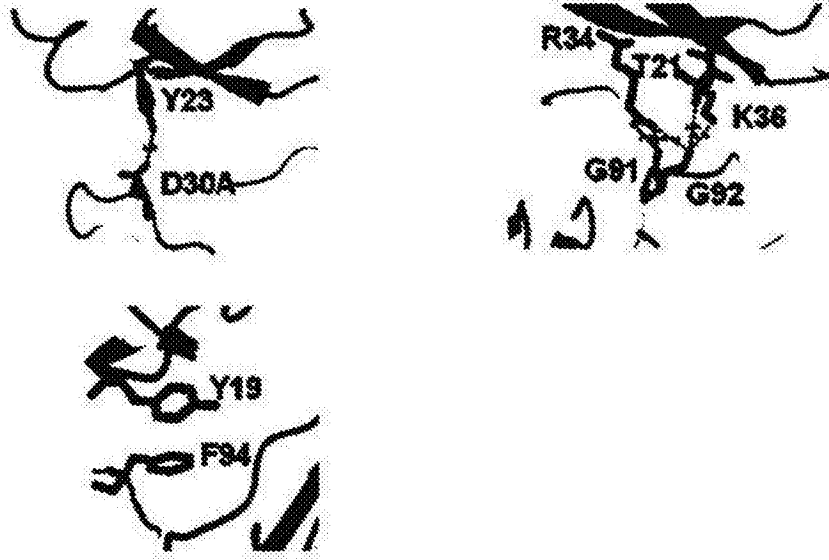


图19

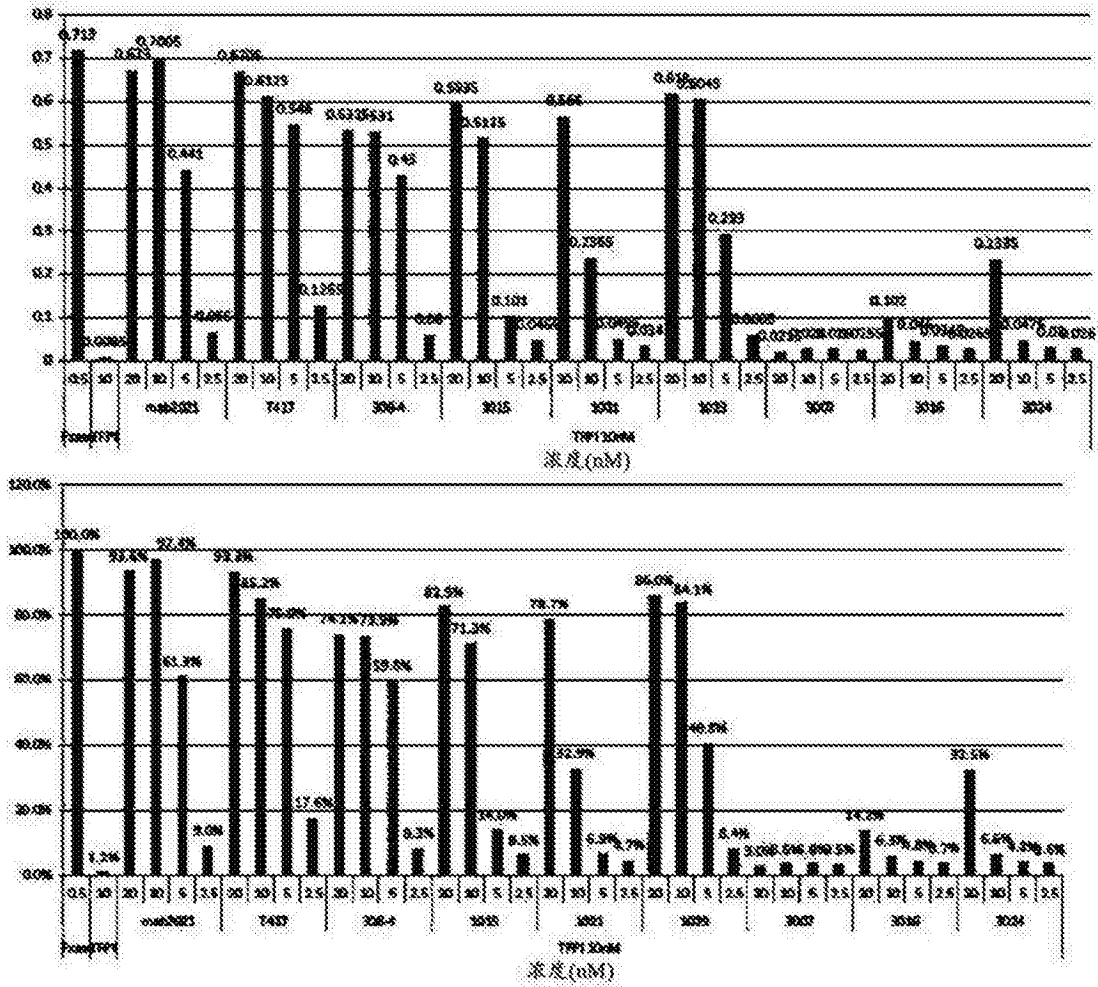


图20

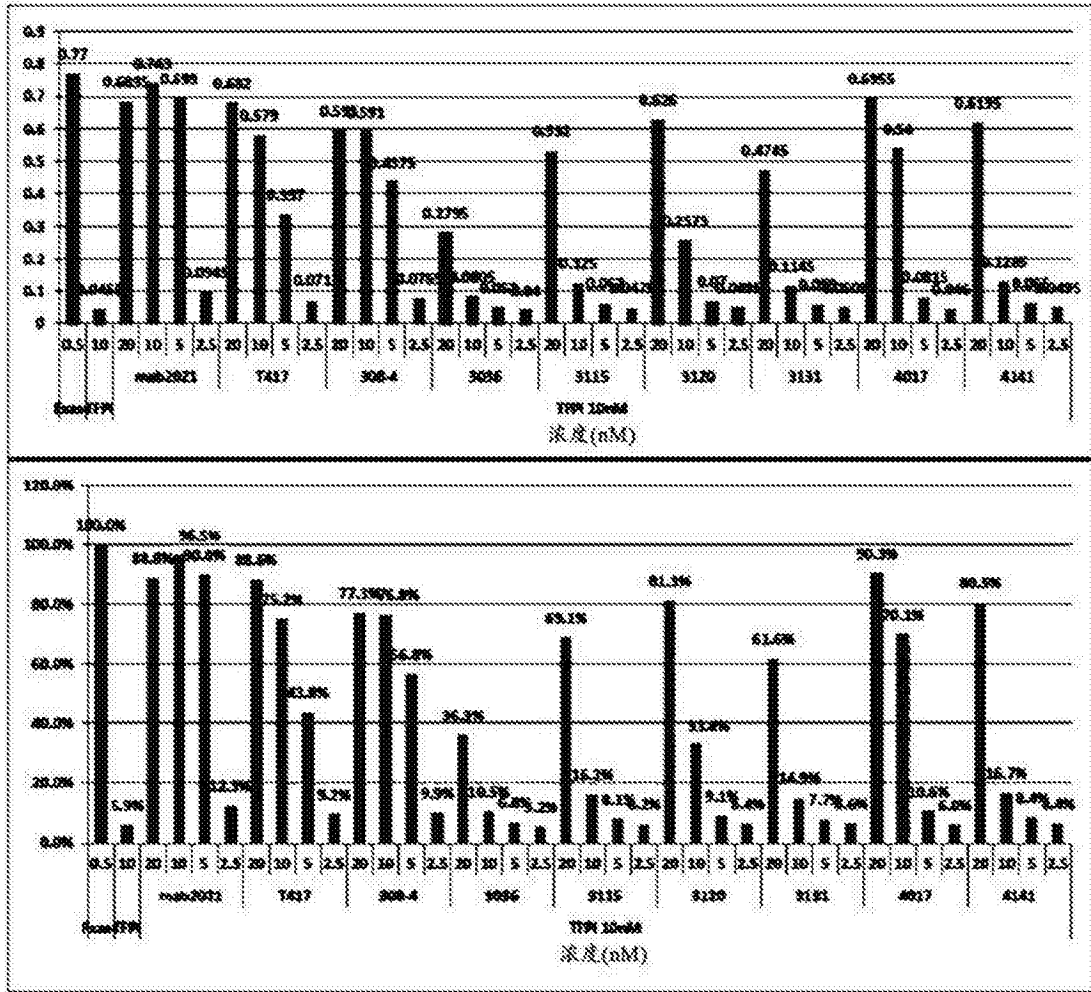


图21

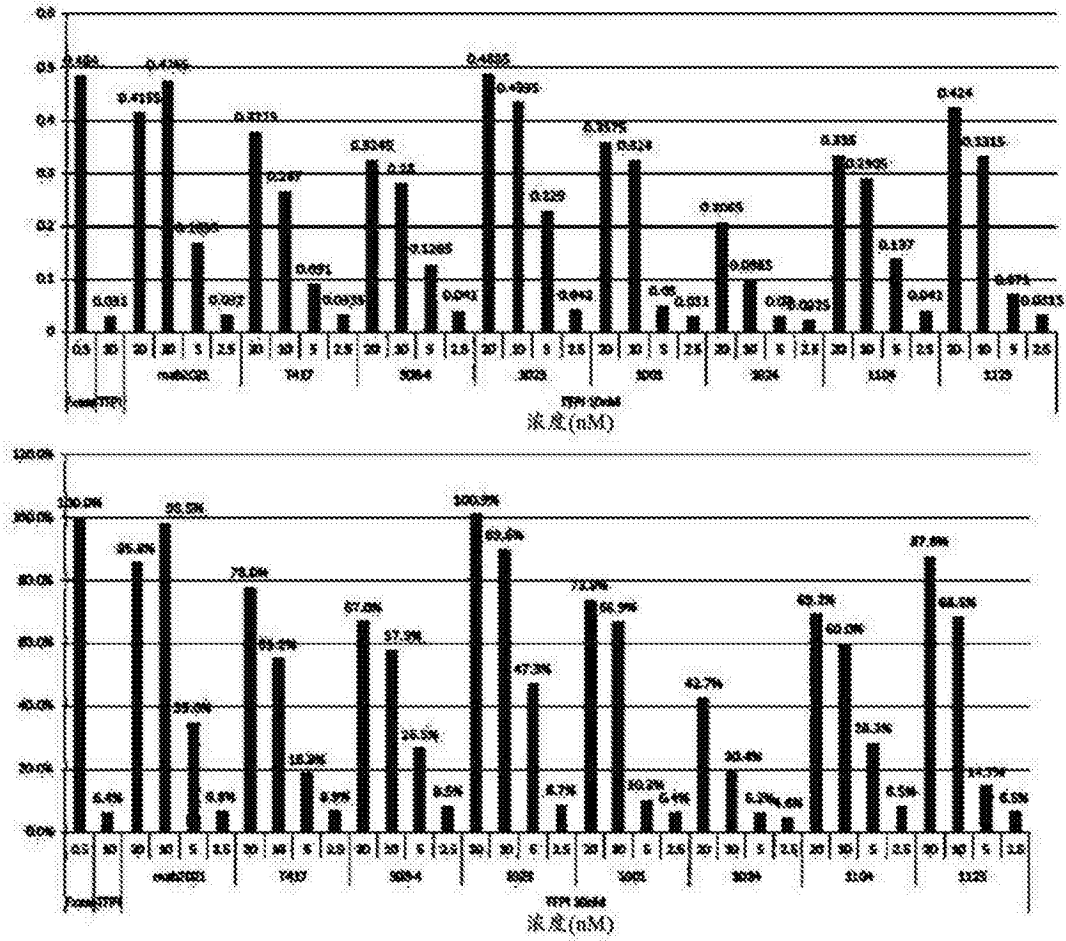


图22

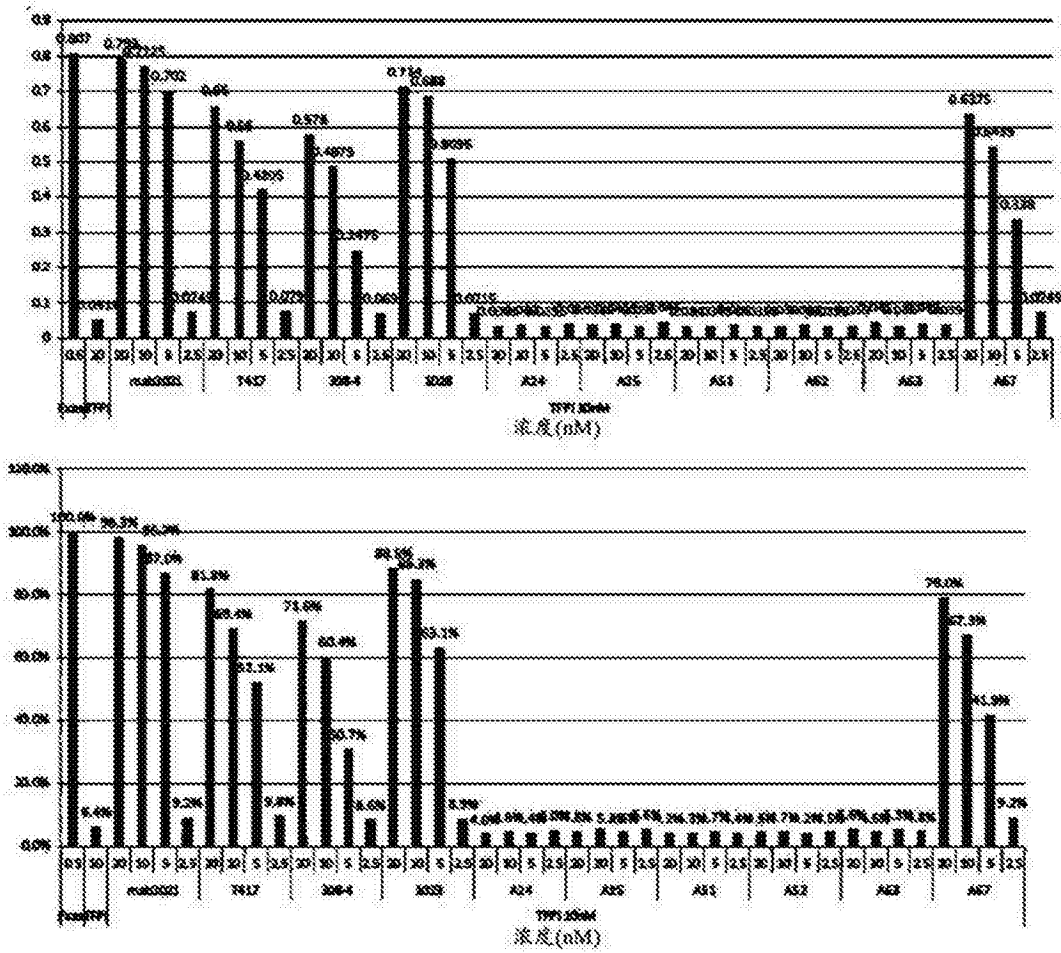


图23

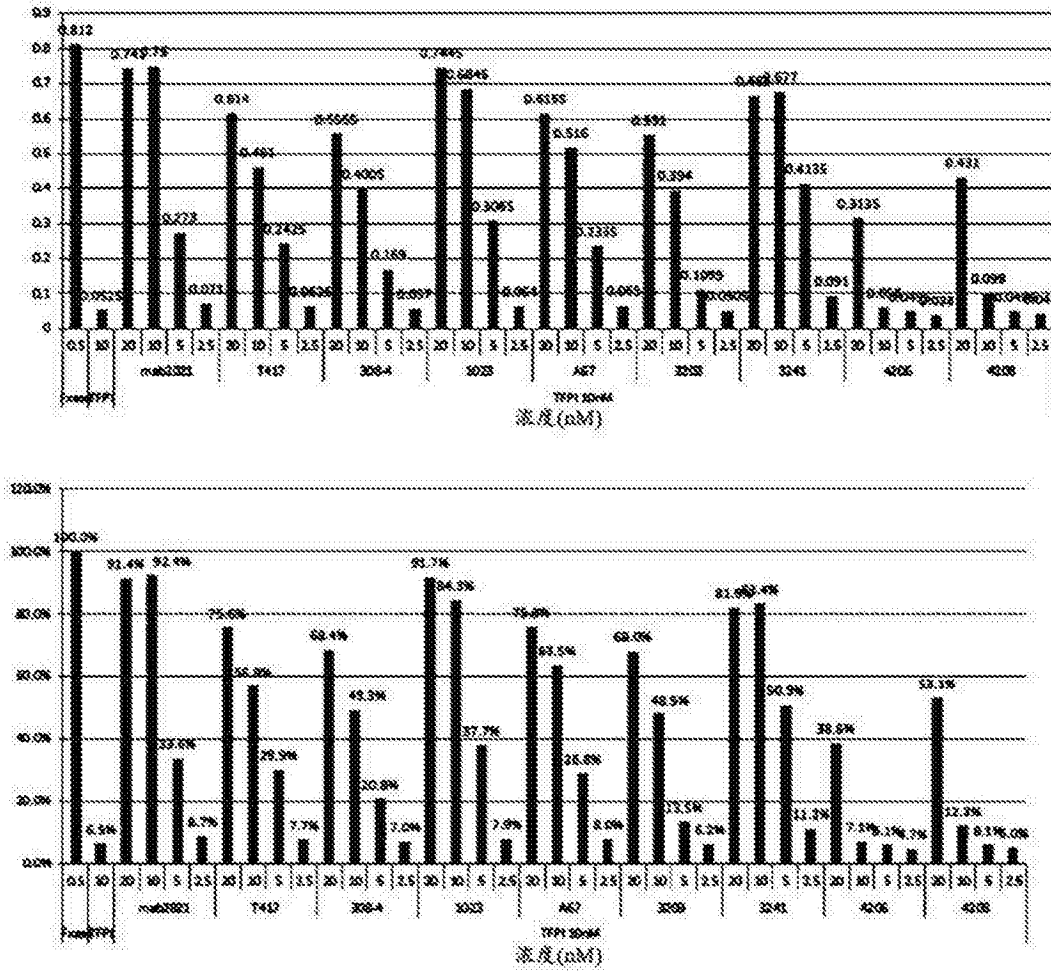


图24

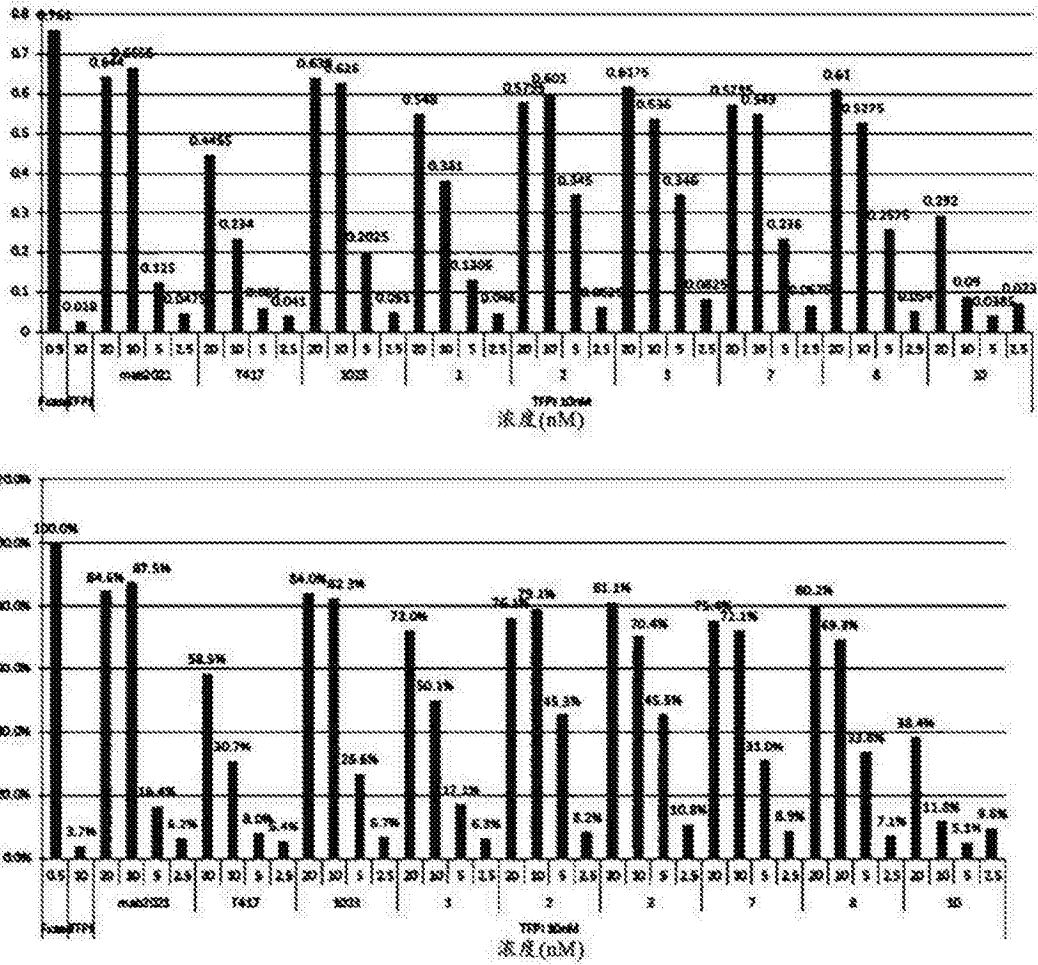


图25

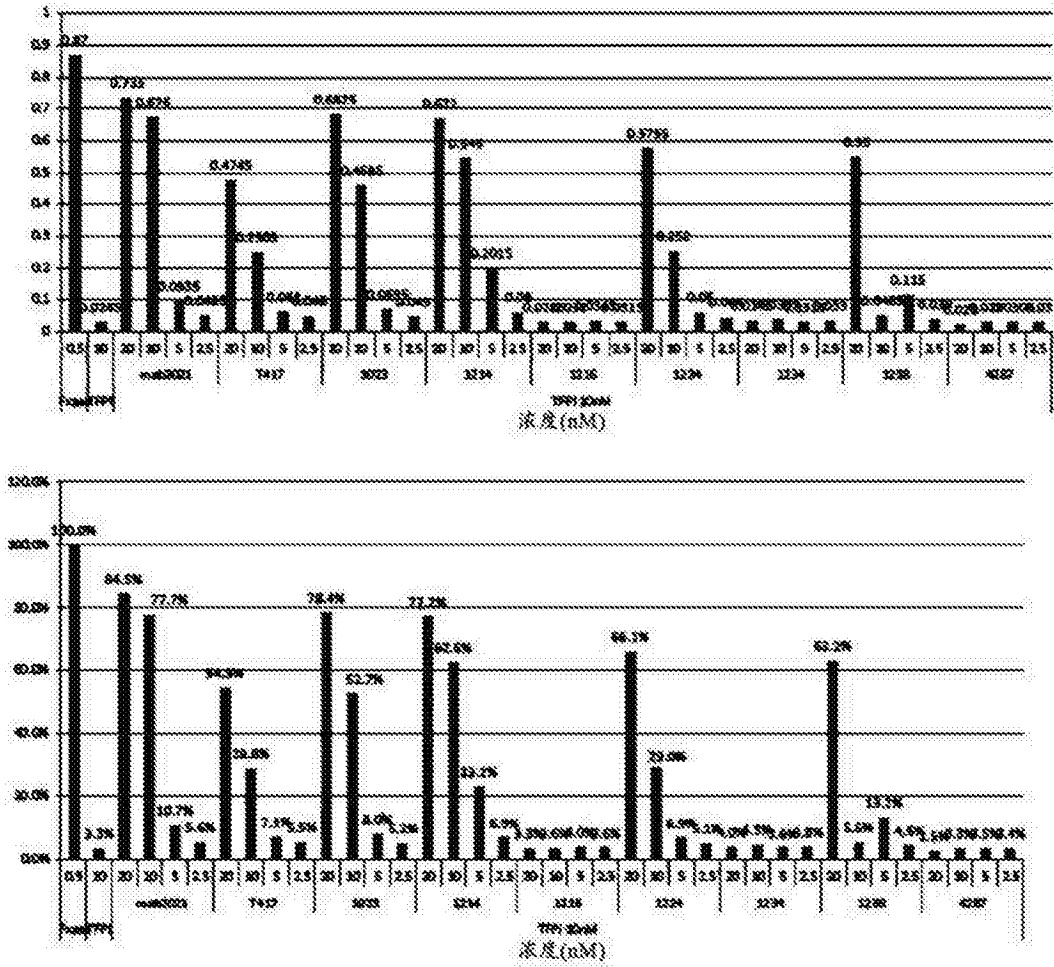


图26

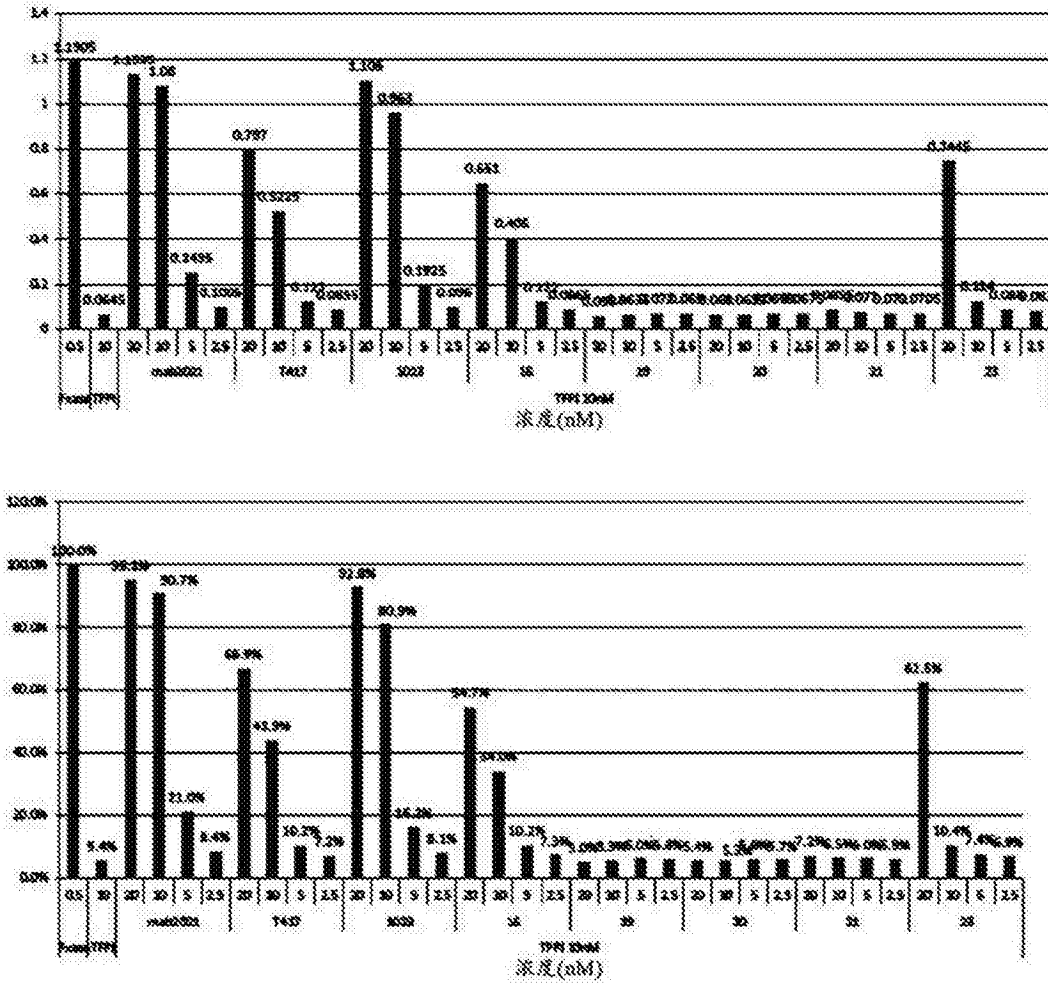


图27

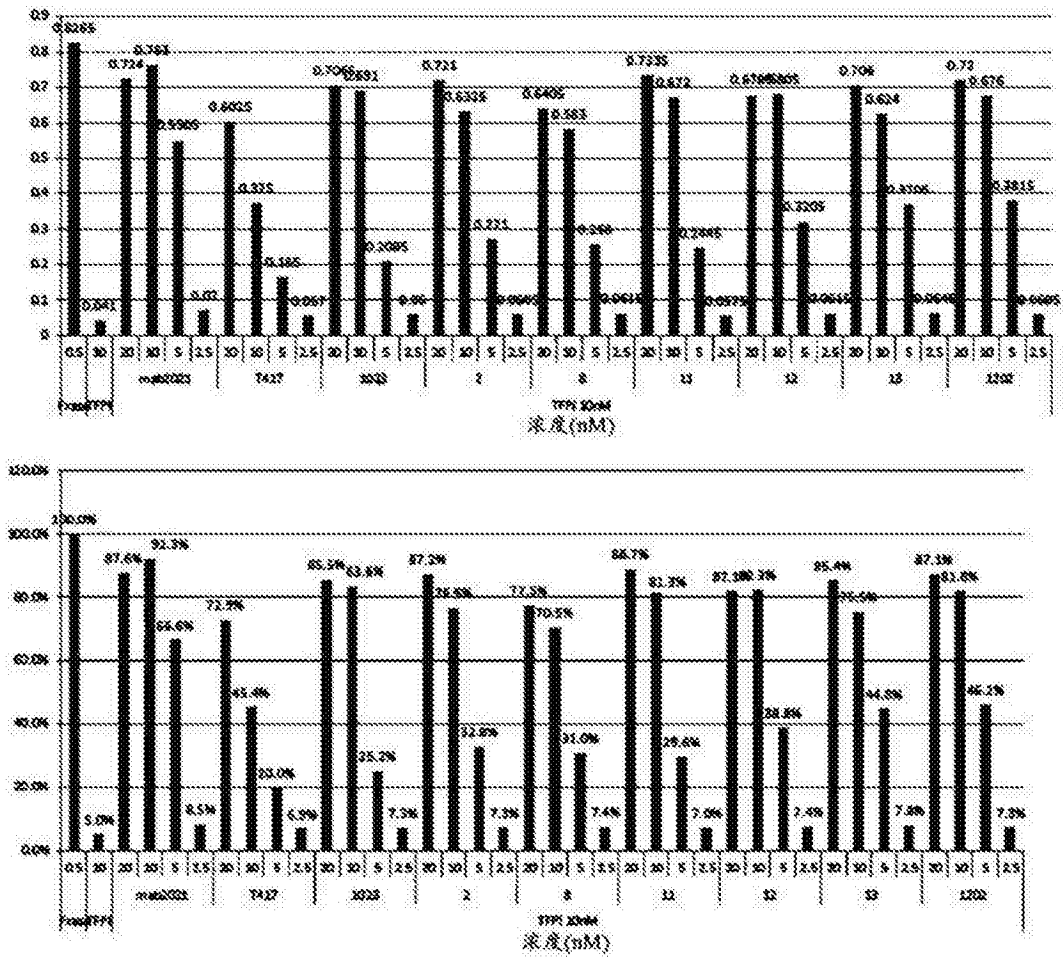


图28

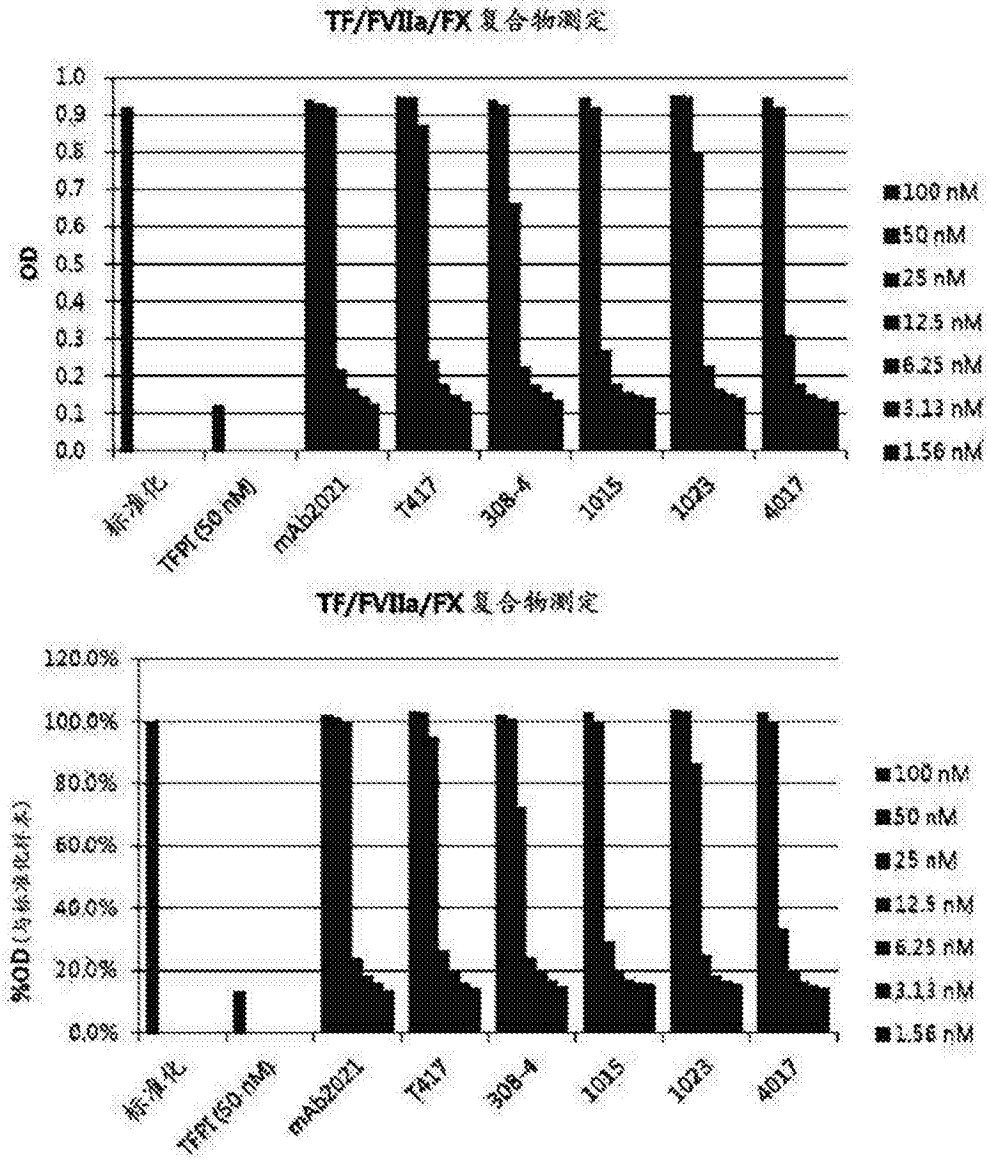


图29

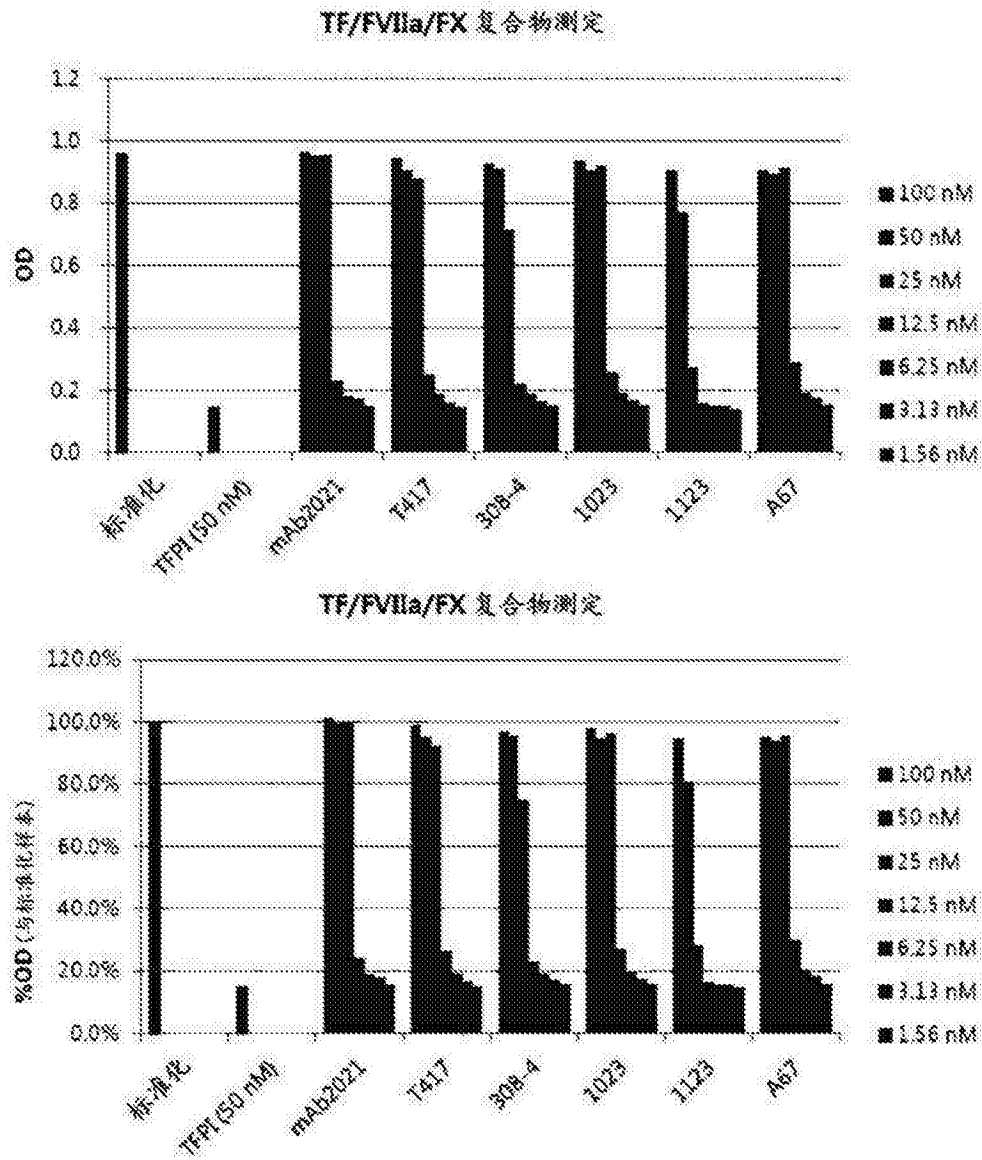


图30

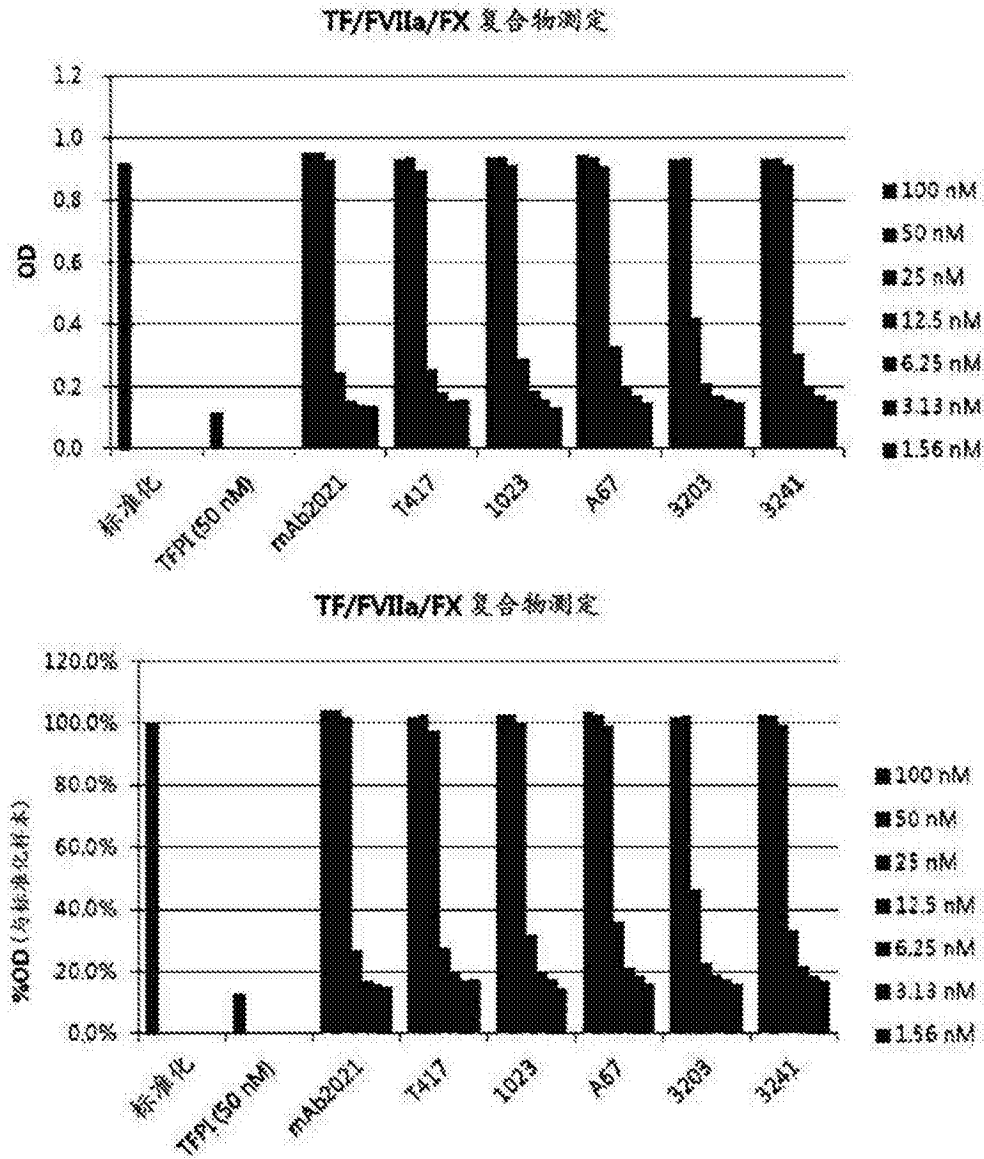


图31

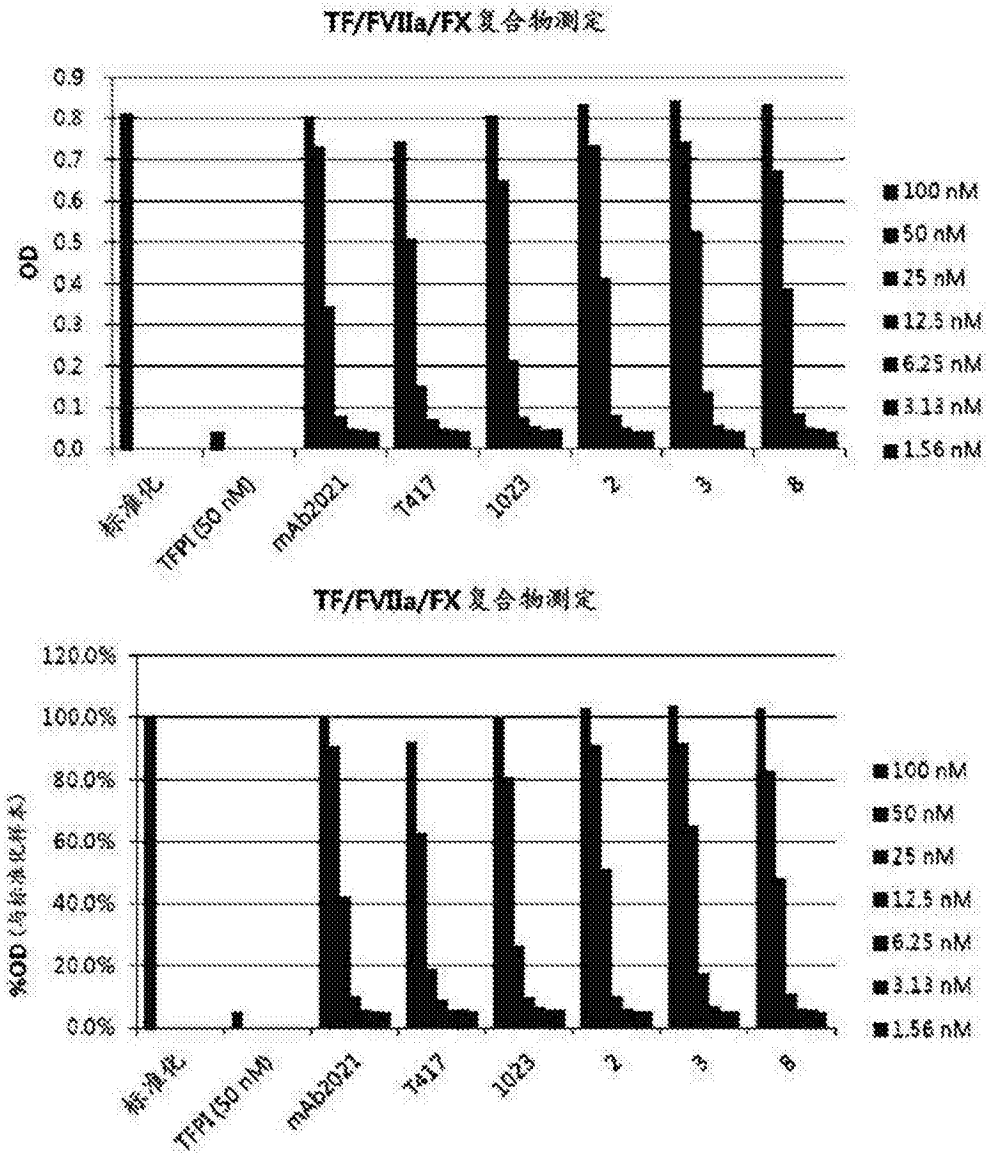


图32

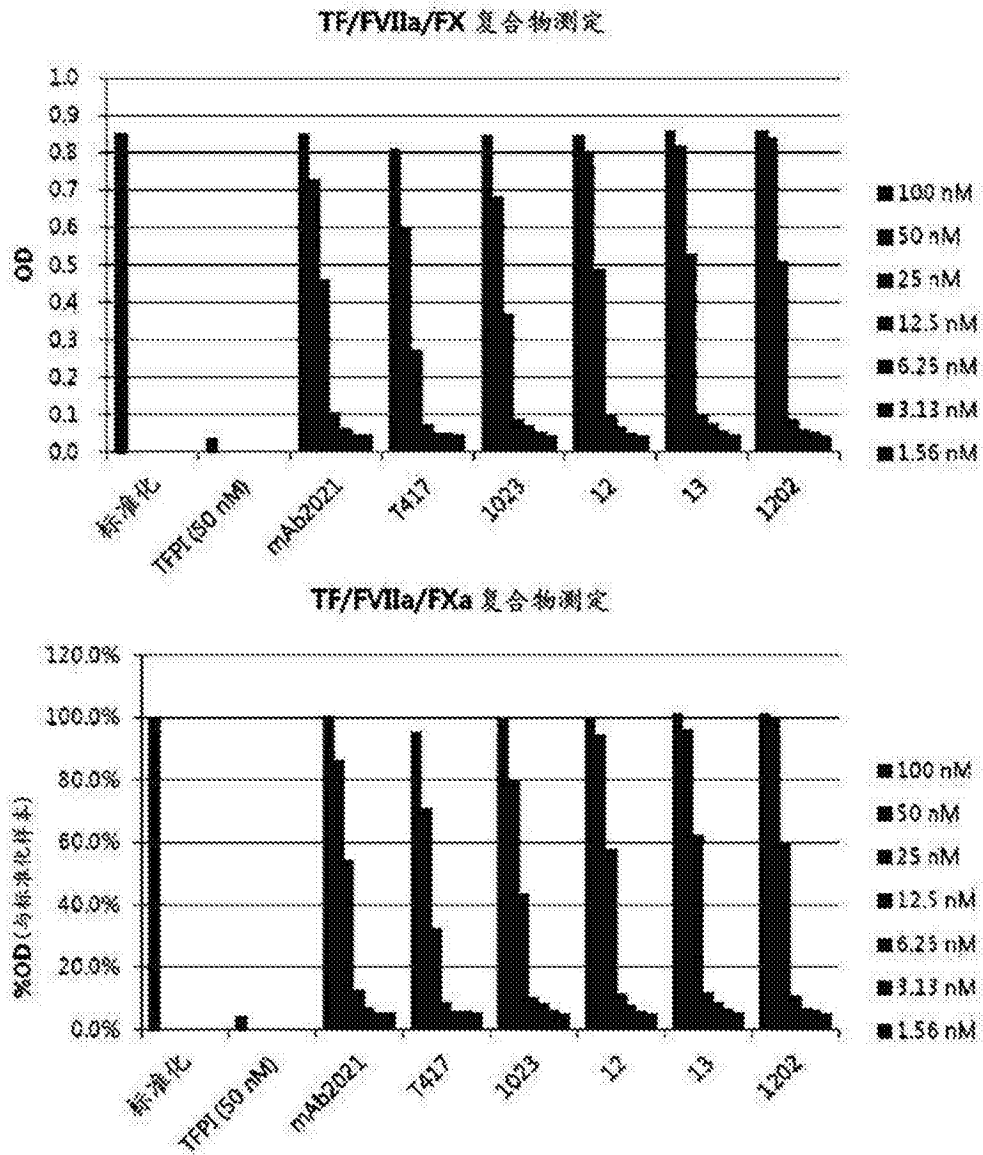


图33

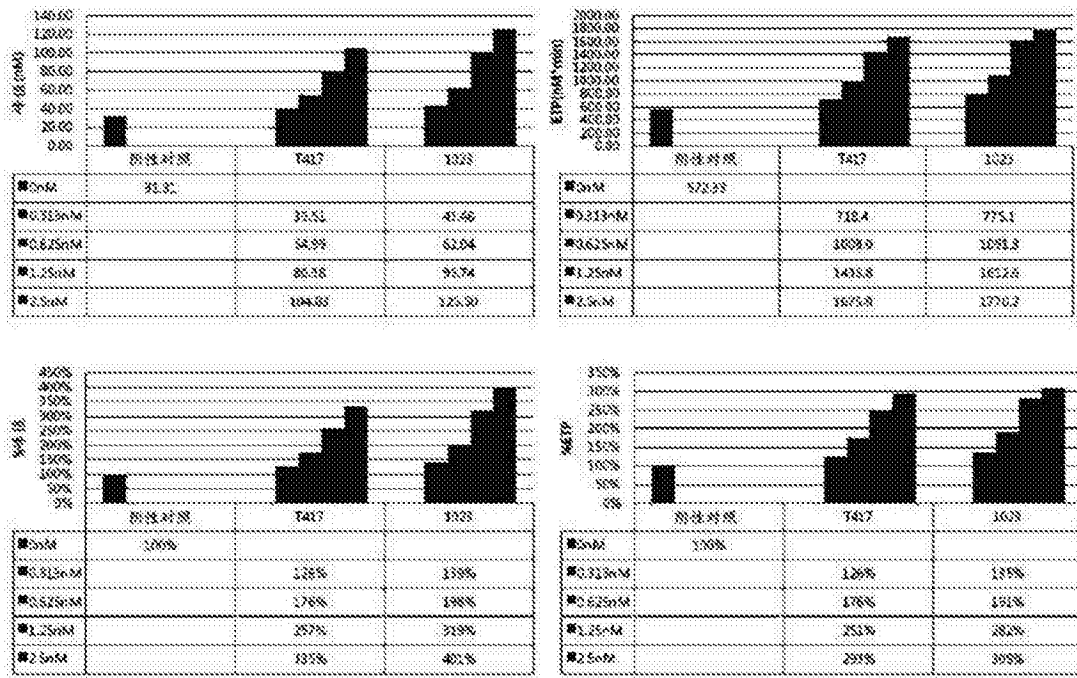


图34