200813085

發明專利說明書

（本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫）

※ 申請案號：96107755

※ 申請日期：96.03.07 ※IPC 分類：C07K 14/81 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
A61K 38/55 (2006.01)

一、發明名稱：（中文/英文）

嵌合之庫尼茲(Kunitz)功能部位及其用途

CHIMERIC KUNITZ DOMAINS AND THEIR USE

二、申請人：（共 1 人）

姓名或名稱：（中文/英文）

拜耳保健股份有限公司

BAYER HEALTHCARE AG

☐ 指定　　為應受送達人

代表人：（中文/英文）（簽章）

1.弗蘭克/BURKERT, FRANK

2.費迪南德/KOEHLER, FERDINAND

住居所或營業所地址：（中文/英文）

德國利佛可生城拜耳工業區 D 51368

51368 LEVERKUSEN, GERMANY

國　籍：（中文/英文）

德國/GERMANY

三、發明人：（共 8 人）

姓　名：（中文/英文）

1. 歐何米/ OEHME, FELIX
2. 艾伯勒/ APELER, HEINER
3. 笛特瑪/ DITTMER, FRANK
4. 法蘭茲/ FRANZ, JUERGEN
5. 何倫葛/ HARRENGA, AXEL
6. 思伯茲/ SPERZEL, MICHAEL

7. 葛曼恩/ GREVEN, SIMONE

8. 利恩茲/ LENZ, JUERGEN

國　籍：（中文/英文）

1.-8.均為德國/GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

歐洲專利公約；西元 2006 年 3 月 8 日；06004693.5

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

7. 葛曼恩/ GREVEN, SIMONE

8. 利恩茲/ LENZ, JUERGEN

國　籍：（中文/英文）

1.-8.均為德國/GERMANY

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項☐第一款或☐第二款規定之事實，其事實發生日期為：　年　月　日。

☑ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號　順序註記】

☑ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

歐洲專利公約；西元 2006 年 3 月 8 日；06004693.5

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號　順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料　【格式請依：寄存機構、日期、號碼　順序註記】

國外生物材料　【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼　順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明有關於帶有天然或非天然(non-natural)庫尼茲功能部位(Kunitz domains)的人類組織因子抑制劑功能部位1之嵌合體(chimeras)，以及它們的製備與用途。

【先前技術】

庫尼茲功能部位是抑制多數不同效力(potency)之絲胺酸蛋白酶(serine protease)的多肽。它們包含有三個穩定蛋白質並且決定其三維結構的雙硫橋(disulphide bridge)。與各個絲胺酸蛋白酶的交互作用(interaction)主要地經由一個大約9個胺基酸長並且位在庫尼茲功能部位之N-端區域的套環(loop)來發生。此套環結合蛋白酶的觸媒中心(catalytic centre)並且因而防止適當的蛋白酶受質(protease substrates)之分裂(cleavage) (Laskowski and Kato [1980]; Bode and Huber [1992])。

抑肽酶(aprotinin) (BPTI；第1圖；序列辨識編號6)被視為庫尼茲功能部位的原型(prototype) (Fritz and Wunderer [1983])。這是一種帶有長度為58個胺基酸的鹼性蛋白質，它可被分離自各種不同的牛器官(尤其是胰臟、肺臟、肝臟以及心臟)。抑肽酶是藉由三個雙硫橋(Cys5-Cys55；Cys14-Cys38；Cys30-Cys51)而被穩定並且尤其是一種胰蛋白酶(trypsin)、胞漿素(plasmin)與血漿胰舒血管素(plasma

kallikrein)的有效抑制劑。

在抑肽酶以及牛胰蛋白酶之間之複合物能夠藉由 X 射線結構分析所顯現的是：抑肽酶與蛋白酶之觸媒中心之間的接觸區域基本上地透過由胺基酸 11 至 19 所構成的一套環來形成(參見 Bode and Huber [1992]以及其中所引用的參考文獻)。對於抑肽酶的抑制效果來說，胺基酸 Lys 15 是最為重要的並且是特別地緊密接觸該蛋白酶的觸媒活性絲胺酸殘基。因此該胺基酸 Lys 15 藉由定義被指為 P1 殘基(Schechter and Berger [1967])。該 P2、P3 等等殘基是位在 Lys-15 的 N 端，而坐落自 Lys-15 之 C 端的胺基酸被指涉為 P1'、P2'等等。因為 Lys-15 直接地被坐落於抑肽酶之第二個半胱胺酸旁的 C 端，其它庫尼茲功能部位於此位置的對應胺基酸是同樣地被指涉為 P1 殘基。較早先被顯示：抑肽酶的抑制效果可透過標靶交換(targeted exchange)來自殘基 11 至殘基 19 的區域之胺基酸來被修飾(Otlewski et al. [2001], Apeler et al. [2004], Krowarsch et al. [2005])。此外，胺基酸 36-39 對於抑肽酶的活性來說是重要的(Fritz and Wunder [1983], Krowarsch et al. [2005])。

抑肽酶現在主要地以特斯樂(Trasylol)為專用名被應用於心臟外科手術中，由於臨床研究發現到，以抑肽酶治療顯著地降低在此類手術中有關於輸血的需要以及造成續發性出血的減少(Royston [1992])。其臨床效果歸因於抑制內因性的血液凝固[接觸啟動]、抑制纖維蛋白溶解(fibrinolysis)以及降低凝血酶形成(Blauhut et al. [1991], Dietrich et al.

[1995].)。因此，抑制胞漿素與血漿胰舒血管素兩者對於抑肽酶的止血效果來說是重要的。

作為牛蛋白的抑肽酶導致人類的抗體形成。特斯樂的重複給藥將造成嚴重的過敏反應[過敏性休克(anaphylactic shock)]。此風險為 2.8%，並且因此多重使用抑肽酶的可能性將大為受到限制(Dietrich et al. [2001], Beierlein et al. [2005])。因而針對相較於抑肽酶具有一類似或更佳的臨床效果並且顯示明顯較低的過敏反應之活性成分有一極大的醫用需求。

藉由外因性路徑(extrinsic pathway)(例如組織的受傷)之血液凝固的活化是透過組織因子(從內皮細胞而來)釋放所引發(Lindahl [1997], Lwaleed and Bass [2005])。當組織因子進入血液，它結合至因子Ⅶa。所形成的複合物藉以活化因子X(外因性血液凝固)以及因子Ⅸ(內因性血液凝固)兩者。在生理狀態下，組織因子是藉由組織因子抑制劑(tissue factor inhibitor, TFPI)而被抑制。人類組織因子抑制劑(hTFPI)是一個具有長度為 276 個胺基酸且分子量為 42 kDa 的蛋白質。它首先抑制了因子Xa 並且接著結合至因子Ⅶa/組織因子複合物。TFPI 由三個庫尼茲功能部位所構成，並且在血漿中是主要結合至脂蛋白(lipoproteins)。它因而也被指稱為“脂蛋白-相關聯的凝血抑制劑”(lipoprotein-associated coagulation inhibitor, LACI)。TFPI 首次被純化自人類 HepG2 細胞的上澄液(Broze et al. [1987])並且稍後自人類血漿中被純化出(Novotny et al. [1989])。hTFPI 的 cDNA

於 1988 被選殖出(Wun et al. [1998])。Sprecher 等人描述了組織因子抑制劑之又一個異構型(isoform)的選殖以及特性(hTFPI2; Sprecher et al. [1994])。

在 hTFPI 的各個庫尼茲功能部位中，藉由標靶交換 P1 位置的胺基酸，可顯示庫尼茲功能部位 2(D2)是抑制因子 Xa 的原因，而庫尼茲功能部位 1(D1)以及 2 對於結合至因子 VIIa /組織因子複合物來說是必需的(Girard et al. [1989])。有關於個別表現之 hTFPI 的庫尼茲功能部位的研究顯示：因子 Xa 可僅受到庫尼茲功能部位 2 抑制，而庫尼茲功能部位 1 亦抑制胞漿素(Petersen et al. [1996])。Markland 等人描述利用噬菌體表現(phage display)的方法透過 hTFPI D1 的變異(variation)來製備蛋白質存庫。它們也可以經由在胺基酸 10 至 21 以及 31 至 39 的區域中之突變來修飾 hTFPI D1 的特性，以使自其而來之庫尼茲功能部位是高度有效的，選擇性的胞漿素抑制劑(Markland et al. [1996a])，或者高度有效的、選擇性的血漿胰舒血管素抑制劑(Markland et al. [1996a])。Baja 等人探討供 hTFPI D1 之抑制活性的胺基酸 8 至 20 以及 31 至 39 的重要性(Bajaj et al. [2001])。

以高度效力並且專一地抑制胞漿素之庫尼茲功能部位的變異體(variants)被描述於 US 6,010,880；EP 0 737 207；US 6,071,723 以及 US 6,953,674 中。US 5,795,865；EP 0 739 355;以及 US2004/0038893 揭示以高度效力並且專一地抑制血漿胰舒血管素之庫尼茲功能部位的變異體。US 6,783,960

描述由 hTFPI1 和/或 hTFPI2 之各種不同庫尼茲功能部位所構成的嵌合蛋白質。庫尼茲型的血漿胰舒血管素抑制劑被揭露於 US 5,786,328；US 5,780,265 以及 EP 0 832 232。

【發明內容】

本發明之目的在於製備具有一活性的人類組織因子抑制劑 1 功能部位 1(hTFPI D1)的變異體，其活性比得上或優於抑肽酶所具有者並且具有顯著較低的致免疫性(immunogenicity)。所欲的特性可透過交換 hTFPI D1 之活性中心(active center)的胺基酸成為從其它天然或非天然庫尼茲功能部位之活性中心而來的對應胺基酸而達成。因此產生的嵌合體會以高效力抑制胞漿素與血漿胰舒血管素兩者。

在本發明的上下文之中，庫尼茲功能部位是具有 55 至 62 個胺基酸的抑肽酶之同源物(homologues)，其包含有六個半胱胺酸殘基(cysteine residues)以及三個雙硫橋。該等胺基酸是如表 1 中所顯示的，根據抑肽酶的 58 個胺基酸來被編號。因此 Cys 1 是胺基酸 5，Cys 6 是胺基酸 55。在表 1 中，“x” 表示任何胺基酸而 “X” 表示在每個情況中被詳細指明之胺基酸中的一者。在各個情況下，雙硫橋是形成於位置 Cys 5-Cys 55；Cys 14-Cys 38 以及 Cys 30-Cys 51。

迄今，庫尼茲抑制劑已經被發現，尤其是在各種不同脊椎動物(例如人類、牛)中以及在某些無脊椎動物(蛞蝓、海葵)中(Laskowski and Kato [1980]以及其中所引用的參考

文獻)。在本申請案中，此種天然存在的庫尼茲功能部位被指涉為“天然庫尼茲功能部位(natural Kunitz domains)”。天然庫尼茲功能部位的實例尤為抑肽酶、人類胎盤 bikunin 功能部位 1(human placental bikunin domain 1)、人類胎盤 bikunin 功能部位 2(human placental bikunin domain 2)、人類類澱粉貝他 A4 蛋白質前驅物(human amyloid beta A4 protein precursor)的庫尼茲功能部位以及人類副睪蛋白酶抑制劑前驅物(human Eppin precursor)的庫尼茲功能部位。一些天然的庫尼茲功能部位的序列是如表 2 中所詳列的。

透過基因工程的方法能夠製備在一個或多個胺基酸上不同於天然庫尼茲功能部位的庫尼茲功能部位之重組型變異體。在本申請案中，由胺基酸的交換而來的庫尼茲功能部位被意指為“非天然庫尼茲功能部位。”各種不同的非天然庫尼茲功能部位已被描述於文獻中(Dennis et al. [1995], Markland et al. [1996a], Markland et al. [1996b], Apeler et al. [2004], EP 0307592)。一些非天然的庫尼茲功能部位的序列是顯示在表 3 中。

本發明之目的在於製備一種庫尼茲功能部位，其具有比得上或優於抑肽酶的臨床效果，但相較於抑肽酶，在人類中明顯地引起較低的免疫反應。hTFPI D1 是一種具有該序列的人類庫尼茲功能部位。

MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

(序列編號 2)

因為人源(human origin)，相較於抑肽酶所具有者，在應用 hTFPI D1 於人類中，不預期有無過敏反應。

抑肽酶是一種胞漿素與血漿胰舒血管素的有效抑制劑(表 4)，其臨床效果是歸因於內因性血液的凝固(接觸啟動)、抑制纖維蛋白溶解以及降低凝血酶形成(Blauhut et al. [1991], Dietrich et al. [1995].)。相對於抑肽酶，hTFPI D1 是一種認為是較弱的胞漿素抑制劑並且更甚者對於血漿胰舒血管素不顯示抑制性效果(表 4)。因而本發明之目的在於製備帶有最低致免疫性能力(immunogenic potential)的 hTFPI D1 變異體並且其額外地以高的效力抑制胞漿素與血漿胰舒血管素兩者。根據本發明，被偏好的變異體以< 100 nM 的 IC50 來抑制胞漿素，但較佳地以一為< 10 nM 的 IC50。透過根據本發明的被偏好之變異體，血漿胰舒血管素是以一為< 100 nM 的 IC50 受到抑制，但較佳地以一為< 10 nM 的 IC50。

根據本發明，hTFPI D1 的變異體是透過於 hTFPI D1 以及其它天然或非天然庫尼茲功能部位之間形成嵌合體而被製造出。該等嵌合體的形成是藉由交換 hTFPI D1 之活性中心的一個或多個胺基酸成為從其它天然或非天然庫尼茲功能部位之活性中心而來的對應胺基酸而發生。該活性中心包括對應庫尼茲功能部位的胺基酸 10 至 21 以及 31 至 39。令人驚訝地發生：藉此所製造出的 hTFPI D1 變異體不僅顯現比得上抑肽酶所具有的特性，且在某些情況下更是明顯地為佳。因此顯露出：例如根據本發明的 hTFPI D1 變

異體在血漿胰舒血管素上具有基本上較抑肽酶為強的抑制效果(表 4)。此外，依據本發明的 TFPI 變異體被發現到具有一類似或相較於抑肽酶顯著增進的抗凝劑效果(anticoagulant effect)(第 3 圖，第 8 圖)。在人類血漿中的纖維蛋白溶解是受到依據本發明之 TFPI 變異體所抑制，其帶有比的上抑肽酶所具有者的效力(第 2 圖，第 7 圖)。

依據本發明之TFPI變異體的止血效果在各種不同的動物模型中被試驗。在一大鼠出血模型(rat bleeding model)中，根據本發明之 TFPI 變異體顯示可比得上抑肽酶所具有者的效果(第 4 圖，第 9 圖)。大鼠腸繫膜出血時間(mesenteric bleeding time)是藉由抑肽酶以及帶有比得上之效果的根據本發明之 TFPI 變異體所降低(第 11 圖，第 12 圖)。

根據本發明之 TFPI 變異體的抗栓塞效果(antithrombotic effect)在一大鼠動靜脈分流模型(rat arteriovenous shunt model)中被檢驗。在這情況中，根據本發明之TFPI變異體顯示可比得上抑肽酶所具有者的抗栓塞效果(第 10 圖)。

在心血管系統(cardiovascular system)上，根據本發明之 TFPI 變異體的可能非所欲效果在麻醉的大鼠中被檢驗。根據本發明之TFPI變異體在一至高達50 mg/kg的劑量之靜脈內(intravenous)投藥上，對於血壓與 ECG 並無效果(表 8)。

外傷(trauma)、再灌流(reperfusion)以及體外循環(extracorporeal circulation)是複合發炎過程(complex inflammatory process)，加上活化體液性與細胞性串級系統

(humoral and cellular cascade systems)的原因。這些尤其造成白血球與血小板的活化，其造成臨床上可被觀察到的副作用[諸如水腫形成(oedema formation)以及器官受損](Hess PF Jr. [2005])。各種不同的研究顯示：抑肽酶在繞道病患(bypass patient)的發炎狀態上的可能效果(Asimakopoulos G. et al. [2000])。根據本發明之 TFPI 變異體在發炎過程上的可能影響在各種不同細胞測試系統中被檢驗。因此，根據本發明之 TFPI 變異體以比得上或略優於抑肽酶所具有者的效力來抑制 IL-8 以及 C5a-誘發噬中性球的趨化性(chemotaxis)(第 13 圖，表 6)。CAP-37 誘發的在通透性上之增加可能是藉由根據本發明之 TFPI 變異體以比得上或略優於抑肽酶所具有者的效力而受到抑制(第 14 圖，表 7)。

依據本發明之 hTFPI D1 的變異體具有通式

$$MHSFCAFKAX_{10}X_{11}GPCX_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}FNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD$$

或

$$EAMHSFCAFKAX_{10}X_{11}GPCX_{15}X_{16}X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}FNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD.$$

其中，“X”是依據顯示於表 1 中之編號的一庫尼茲功能部分的胺基酸。此胺基酸可以是從表 2 與 3 中所詳述之 hTFPI D1 或另一種天然或非天然庫尼茲功能部位衍生來的。依據本發明的變異體是藉由交換 hTFPI D1 的至少一胺基酸成為對應天然或非天然庫尼茲功能部位之另一胺基酸而被製造出。從天然或非天然庫尼茲功能部位而來的胺基

酸(其可較佳地被交換成為從 hTFPI D1 而來的對應胺基酸)藉著表 5 中的例示方式被歸納。

hTFPI D1 的下列變異體是特別地被偏好的：

MHSFCAFKAETGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

(序列辨識編號 4)

MHSFCAFKAETGPCRAAHPRWWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

(序列辨識編號 5)

EAMHSFCAFKAETGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

(序列辨識編號 19)

EAMHSFCAFKAETGPCRAAHPRWWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

(序列辨識編號 20)

一些依據本發明之 hTFPI D1 變異體的有關於抑制胰蛋白酶、胞漿素與血漿胰舒血管素的 IC50 數值被歸納在表 4 中。

再者依據本發明之 hTFPI D1 變異體被顯示於第 1 圖中。

本發明亦有關於醫藥品，其包含有一種或多種依據本發明之 hTFPI D1 變異體。

描述的新穎庫尼茲功能部位適於治療下列病理學狀態：

與具有升高之出血風險的手術有關的出血(blood loss)；治療血栓栓塞病況(thromboembolic condition)(例如手術後、意外)、中風(shock)、多發傷(polytrauma)、休克(sepsis)、散播性血管內凝血(disse 分 ated intravascular coagulation, DIC)、多重器官衰竭(multiorgan failure)、不穩定的狹心症(unstable angina)、心肌梗塞(myocardial infarction)、中風(stroke)、栓塞症(embolism)、深靜脈血栓(deep vein thromboses)、發炎性疾病(inflammatory disease)[例如風濕(rheumatism)、氣喘(asthma)]、侵襲性腫瘤生長與轉移(invasive tumour growth and metastasis)、治療疼痛與水腫[腦部水腫(cerebral oedema)、脊椎水腫(spinal cord oedema)]、預防透析治療的止血活化、治療皮膚老化的症狀[纖維組織增生(elastosis)、萎縮(atrophy)、皺紋(wrinkling)、血管變質(vascular alterations)、色素變質(pigment alterations)、日光性角化病(actinic keratosis)、黑頭面皰(blackheads)、囊腫(cysts)]、皮膚癌、治療皮膚癌的症狀[日光性角化病、基底細胞瘤(basal cell carcinoma)、鱗狀上皮細胞瘤(squamous cell carcinoma)、惡性黑色腫瘤(malignant melanoma)]、多發性硬化症(multiple sclerosis)、纖維變性(fibrosis)、腦出血(cerebral haemorrhage)、腦部與脊椎發炎、腦部的感染。

【實施方式】

實施例 1

選殖人類組織因子抑制劑功能部位 1[組織因子路徑抑制劑(hTFPI, tissue factor pathway inhibitor)以及產生 TFPI 變異體

商業上可獲得的大腸桿菌(E. coli)/釀酒酵母菌(S. cerevisiae)穿梭載體(shuttle vector) pYES2 (Invitrogen)被修飾(參見 Apeler [2005])並且作為供建構酵母菌分泌載體(yeast secretion vectors) pIU10.10.W 以及 pIU3.12.M 的起始材料。

pIU10.10.W

MFa1 啟動子 - **MFa1-Met1-Arg2**... **前序列** (presequence)... **Ala17-Leu18-Ala19 | 訊息肽酶**(signal peptidase)

pIU3.12.M

MFa1 啟動子 - **MFa1-Met1-Arg2**...**前原序列**(preprosequence)... **Asp83-Lys84-Arg85 | KexⅡ蛋白酶**

天然發生之人類 TFPI 功能部位 1(hTFPI D1，acc. P10646，胺基酸 Met49-As9107，此處：Met1-Asp58)是像合成基因(最佳化以供釀酒酵母菌密碼子使用)被融合(fused)成酵母菌分泌載體 pIU10.10.W 的 Ala19(經由限制切割位址 BsaBI 與 XhoI)或至酵母菌分泌載體 pIU3.12.M 的 Arg85(經

由 PCR 以及限制切割位址 HindⅢ以及 BamHI)。

選殖 hTFPI D1 至酵母菌分泌載體 pIU10.10.W

有關 hTFPI D1(序列辨識編號 2)的合成製備的基因是藉由限制酶 BsaBI (5')與 XhoI (3')的方法被次選殖(subcloned)至酵母菌分泌載體 pIU10.10W(第 5 圖)且核苷酸序列是透過 DNA 序列分析而被確認。在酵母菌中製備 hTFPI D1 是藉由 pIU10.10.W 的轉形(transformation)而致使帶有 N 端胺基酸序列 MHSF 之 hTFPI D1 變異體表現。

選殖 hTFPI D1 至酵母菌分泌載體 pIU3.12.M

hTFPI D1(序列辨識編號 2)是透過聚合酶鏈反應(polymerase chain reaction, PCR)以及帶有適當限制切割位址(PCR 引子 1/HindⅢ，5'以及 PCR 引子 2/ BamHⅠ，3')的適當 PCR 引子之方法被次選殖至酵母菌分泌載體 pIU3.12.M(第 6 圖)，且核苷酸序列是透過 DNA 序列分析而被確認。

下列 PCR 引子 1 以及 2 是被應用於次選殖 hTFPI D1 至酵母菌分泌載體 pIU3.12.M。有關於被應用於次選殖之限制酶辨識序列(recognition sequences)(HindⅢ與 BamHⅠ)是被標示底線的。

HindⅢ

PCR 引子 1： 5'- GGTAAGCTTGGATAAAAGAGAAGCTATGCATTTTTTTTGTGCTTTTAA -3'

BamH I

PCR 引子 2： 5'- TAGTGGATCCCGAGCTTGCTTATTAATCTCTAGTACACATT -3'

藉由 pIU3.12.M 的轉形來製備 hTFPI D1 變異體使得帶有 N 端胺基酸序列 EAMHSF 之 hTFPI D1 變異體表現。

產生 hTFPI D1 變異體

變異體 1：TFPI mut1(序列辨識編號 1)

透過與 hTFPI D1 比較，TFPI mut1 具有下列胺基酸交換：K15R、I17A、M18H、K19P、F21W。

TFPI mut1 是藉著 PCR 以及適當修飾的 PCR 引子(PCR 引子 3 與 4)之方法而被產生。

PCR 引子 3：

NsiI

5' -CTATGCATTCTTTTTGTGCTTTTAAAGCTGATGATGGTCCATGTAGAGCTGGTTTCATGCCAAGATGGTTTTTT
CAATATTTTTACAAGACA- 3'

XhoI

PCR 引子 4： 5' -TCCCTCGAGTTATTAATCTCTAGTACACAT- 3'

造成對應胺基酸交換的核苷酸交換以粗體並且帶有灰色背景被顯示於 PCR 引子 3 中。

以 PCR 引子 3 以及 4 所放大的 DNA 片段是經由限制切割位址 NsiI (5')以及 XhoI (3')而被選殖到酵母菌分泌載體 pIU10.10.W。在段落 2 中所描述的 PCR 引子(PCR 引子 1 與 PCR 引子 2)被用於次選殖 TFPI mut1 至酵母菌分泌載體 pIU3.12.M。在各個情況下，核苷酸序列是透過 DNA 序列

分析而被確認。

變異體 2：TFPI mut3 (序列辨識編號 4)

透過與 hTFPI D1 以及 TFPI mut1 比較，TFPI mut3 又更具有下列胺基酸交換：D10E、D11T、K15R、I17A、M18H、K19P、F21W(序列辨識編號 4)。

TFPI mut3 是透過活體外突變誘發(in vitro mutagenesis)(使用 Quick-change Ⅱ XL site-directed mutagenesis kit，從 Stratagene 而來)，從使用突變誘發引子 1 與 2 來起始而被產生。

TFPI mut1 被突變的起始序列(局部的序列)為：

5'....-TTTGTGCTTTTAAAGCTGATGATGGTCCATGTAGAGCTGCTC-.... 3'
C A F K A D D G P C R A A

突變誘發引子 1： 5'-TTTGTGCTTTTAAAGCTGAAACTGGTCCATGTAGAGCTGCTC- 3'

突變誘發引子 1 包含有以經修飾的三聯組(triplet) GAA 與 ACT 取代三聯組 GAT/D10 以及 GAT/D11 並且因而使得胺基酸交換成 D10E 與 D11T。

突變誘發引子 2：

(5'-GAGCAGCTCTACATGGACCAGTTTCAGCTTTAAAAGCACAAA- 3')

是互補於突變誘發引子 1。

突變誘發是依據操作人員資訊而被實行，並且核苷酸序列是透過 DNA 序列分析而接著被確認。

實施例 2

啤酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)的轉形

例如品系 JC34.4D 的酵母菌細胞(MAT□, ura3-52, suc2)是生長在 10 ml 的 YEPD (2%葡萄糖；2%蛋白　；1% Difco 酵母抽出物)中並且於一 $OD_{600\,nm}$ 為 0.6 至 0.8 下被收獲。細胞以 5 ml 的溶液 A [1M 山梨醇(sorbitol)；10 mM 二羥乙甘胺酸(bicine) pH 8.35；3%乙二醇(ethylene glycol)]予以洗滌，懸浮於 0.2 ml 的溶液 A 之中並且儲存於-70℃中。

包含有編碼 TFPI mut3EA 的質體 DNA(5 μg)以及鯡魚精子 DNA 的載體 DNA(50 μg)被加入冷凍細胞中。細胞接著藉由於 37℃下震盪歷時 5 分鐘而被解凍。在加入 1.5 ml 的溶液 B(40% PEG 1000；200 mM 二羥乙甘胺酸 pH 8.35)之後，細胞被培養於 30℃下歷時 60 分鐘並且，在沉澱(pelleting)之後，以 1.5 ml 的溶液 C(0.15 M NaCl；10 mM 二羥乙甘胺酸 pH 8.35)洗滌並且在懸浮於 100 μl 的溶液 C 中。平板展開(plating out)發生在具有 2%瓊脂的選擇培養基(selection medium)中。於 30℃下培養歷時 3 天後的轉形體(transformands)被獲得。

實施例 3

透過酵母菌細胞發酵製備 TFPI mut3EA

培養液(nutrient solutions)

下列培養液是被應用於酵母菌的發酵以表現 TFPI mut3EA：

	培養液	
成分	SD2	SC5
Bacto-酵母氮鹼 (bacto-yeast nitrogen base)	6.7 g/l	-
Difco bacto-酵母抽出物	-	20.0 g/l
葡萄糖	20.0 g/l	20.0 g/l
KH_2PO_4	6.7 g/l	6.7 g/l
$(NH_4)_2SO_4$	-	2.0 g/l
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	-	1.0 g/l
微量元素溶液 4	-	1.0 ml/l
經滴定 NaOH 後的 pH	6	6

微量元素溶液 4(SL4 solution)：

三乙酸基氨Ⅲ(Titriplex Ⅲ)	(Merck 8418)	5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck 3965)	2 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	(Merck 8883)	0.1 g
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	(Merck 5927)	30 mg
H_3BO_3	(Merck 165)	0.3 g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	(Merck 2553)	0.2 g
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	(Merck 2733)	10 mg
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	(Merck 6717)	20 mg
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	(Merck 6521)	30 mg

SL4 溶液中的成分被溶解於去礦質水(de 分 eralized

water)且 pH 以 NaOH 被調整至 pH 3-4。培養液以以去礦質水補滿至 1000 ml 並且呈分量(aliquot)被儲存於-20℃下。

培養液的成分 SD2 以及 SC5 被補入去礦質水中且 pH 被調整至 pH5.5。滅菌於 121℃下發生歷時 20 分鐘。葡萄糖呈 1/5 的所需體積被溶解於去礦質水中，個別地滅菌並且，在冷卻之後，被添加至剩餘的培養液中。

品系原液(strain stocks)

所有酵母菌轉形體的品系原液是藉由混合 1 ml 分量的預培養(preculture)以及 1ml 之 80%的甘油溶液且儲存於-140℃下而被建立。

預培養

預培養發酵在 50 ml(供小體積的主要培養)或 1 升的震盪燒瓶中(供中等程度體積的主要培養)，個別地加入 10 或 100 ml 的 SD2 培養液。以一品系原液或以從一 SD2 瓊脂平盤而來的一單一菌落予以接種。培養物以連續震盪(240 rpm)於 28-30℃下被培育歷時 2-3 天。

主要培養發酵(main culture fermentations)

呈小規模的主要培養發酵以使用具有 100 ml 之 SC5 培養液的震盪燒瓶來發生。接種通常以 3 ml 之如上面所述的預培養而發生。培養物接著以連續震盪(240 rpm)於 28-30℃下被培育歷時 4 天。

當主要培養發酵呈中等規模的情況下，生物反應器系統(從 Wave Biotech 而來，Tagelswangen, CH)被採用。特別地，1000 ml 的 SC5 基質被接種以 30 ml 的預培養並且於 Wavebag 中以盪動速率(rocking rate)為 32/分地培育歷時 4 天(角度：10°；空氣供應：0.25 升/分)。培養物的 pH 於第 1 至 3 天被監測並且若需要時以 5M NaOH 調整至 pH 5-6。於第 1 至 3 天，1 ml 的 50%強度的酵母抽出物溶液以及 4 ml 的 4M 葡萄糖溶液被加入各個 100 ml 的培養物中。

在 1000 ml 培養物的情況下，大約 10 或 40 ml 的培養液被連續地加入整天。為監測生長，培養物的 $OD_{600\ nm}$ 於各種不同時間被決定。

在 4 天後，無細胞的上澄液藉由離心(以 6000 rpm 在 JA14 轉子中 15 分鐘)被獲得。

實施例 4

從發酵過的酵母菌細胞的上澄液純化 TFPI mut3EA

將 1M 的 NaOH 加入含有 TFPI mut3EA 的無細胞上澄液(從主要培養發酵中所製備)直到 pH 為 7.8。出現在上澄液中之經懸浮的顆粒透過以 2000 rpm 於 4℃下離心(15 分鐘；Beckman-Allegra 6KR)而被沉澱。上澄液以 1 ml/分被加入 10 ml 的胰蛋白酶-瓊脂糖管柱(trypsin-agarose column)(Sigma-T1763)中。該管柱接而被洗滌以 70 ml 的 50 mM Tris pH7.8、250 mM NaCl 並且以 50 ml 的 50 mM Tris pH 7.8、600 mM NaCl。TFPI mut3EA 接著被沖提(eluted)以 180

ml 的 50 mM KCl/10 mM HCl pH 2.0。2 ml 的部分被收集於管中(其各個包含供中和的 500 µl 之 200 mM Tris pH 7.6、2M NaCl)。含有 TFPI mut3EA 的部分經由如下面所描述的分析之胰蛋白酶抑制而被鑑別。

胰蛋白酶抑制部分被收集並且於一具有臨界(cutoff)為 1000 道耳吞的透析管(Spectra-POR6)中相對於每次 2 升的 50 mM Tris pH 7.5 被透析兩次。透析物(dialysate)透過一超過濾膜(具有臨界為 1000 道耳吞)在一個 Amicon 8200 攪拌細胞中被濃縮。蛋白質濃度接而使用一 Coomassie plus test(Pierce, 23236)依照製造商所說明的被測定。測量的蛋白質濃度是典型地介於 0.1 至 6 mg/ml。

另擇地，在胰蛋白酶-瓊脂糖的純化後，該胰蛋白酶抑制部分被收集並且混合以相同體積的 0.1% TFA，並被加至一個 Source 15 RPC 管柱中。該管柱被洗滌以 6 ml 的 0.1% TFA (HPLC-A 緩衝液)以及接著 TFPI mut3EA 被沖提以 25 ml 梯度的 50% HPLC-B 緩衝液(0.1% TFA, 60%乙腈)並且又另一個 5 ml 梯度的 100% HPLC-B 緩衝液。含有 TFPI mut3EA 的洗出液被凍乾並且該凍乾物被加入每部分 250 µl 的 50 M Tris pH 7.5 之中。

實施例 5

測定有關於胰蛋白酶、胞漿素以及血漿胰舒血管素的 TFPI mut3EA 之抑制效力

TFPI mut3 在胰蛋白酶、胞漿素以及血漿胰舒血管素之

酵素活性上的抑制效力是在生化分析中藉由螢光基質協助下來被測定(在白色 384-井微量盤)。分析緩衝液是由 50 mM Tris/Cl，pH 7.4，100 mM NaCl，5 mM $CaCl_2$、0.08% (w/v) BSA 所組成。分析條件是特別地如下面的：

酵素	最終酵素濃度	訂購編號	受質	最終受質濃度	訂購編號
胰蛋白酶	5 ng/ml	T-6424 (Sigma)	Boc-Ile-Glu-Gly-Arg-AMC	5 μM	I-1100 (Bachem)
胞漿素	50 ng/ml	Hplas (Enzyme research)	MeOSuc-Ala-Phe-Lys-AMC	50 μM	I-1275 (Bachem)
血漿胰舒血管素	1 nM	420307 (Calbiochem)	Boc-Val-Pro-Arg-AMC	80 μM	ES-011 (R&D)

10 μl 的 TFPI mut3EA 連續稀釋被導入各個井中並且以 20 μl 的酵素於室溫下被預培養歷時 5 分鐘。該反應接著透過加入 20 μl 的受質至各井中來起始。於 60-90 分鐘之後，測量在以一具有 360 nm 的激發波長以及 465mm 的發射波長之 Tecan reader 中發生。劑量-活性做圖(dose-activity plots)以及半-最大抑制常數(IC50 數值)是使用 GraphPad Prism 軟體(版本 4.02)來被測定。

實施例 6

透過 hTFPI D1 變異體抑制纖維蛋白溶解

hTFPI D1 變異體的效果是在一活體外纖維蛋白溶解模

型中被測試並且與特斯樂(抑肽酶)的效果相比較。人類血漿(添加檸檬酸)混合 0.13 pM 的組織因子(TF)以及 164 U/ml 的組織胞漿素原活化物(tPA)以及於不同濃度(0.06 μM 至 15 μM)之 hTFPI D1 變異體或抑肽酶，並且培養於 37℃下歷時 40 分鐘。生理食鹽水被用作為對照。藉由 TF 形成凝血(clot)以及隨後藉由 tPA 的凝血溶解是透過以一 Tecan Safire 的光學密度($OD_{405\ nm}$)測量來被決定。從其衍生而來的按照曲線之面積(AUC)被計算並且相對於受質濃度來被做圖。在 AUC 上的降低代表抑制纖維蛋白溶解。在後者實驗中，纖維蛋白溶解被定義為在凝血形成後，在 OD 方面的相對降低。在 OD 上的相對降低之抑制是測量抗纖維蛋白溶解活性。TFPI mut3EA 以及 TFPI mut4EA 的抗纖維蛋白溶解活性是與特斯樂所具有者比較。

實施例 7

透過 hTFPI D1 變異體抑制凝血

hTFPI D1 變異體的效果是在一活體外凝血模型中被測試並且與特斯樂(抑肽酶)的效果相比較。人類血漿(添加檸檬酸)混合 12 mM $CaCl_2$ 以誘發凝血以及於不同濃度(0.1 μM 至 25 μM)之 hTFPI D1 變異體或抑肽酶。生理食鹽水被用作為對照。於 37℃下培養歷時 90 分鐘的期間，於 405 nm 的 OD 被測量作為凝血的測定。半-最大凝血時間(half-maximum coagulation time)自其被算出。半-最大凝血時間的延長表示抑制凝血。透過與特斯樂比較，TFPI

mut3EA的凝血活性增加而TFPI mut4EA所具有者略微地增加。

實施例 8

hTFPI D1 變異體在大鼠出血模型中的止血效果

經麻醉大鼠的兩條頸靜脈(jugular vein)被插管(canulated)以一聚乙烯導管(polyethylene catheter)。為延長正常出血時間，在整個實驗中，大鼠們被注入 tPA (組織胞漿素活化物)(8 mg/kg/h)。於 tPA 灌注開始的十分鐘後，藉由灌注或以組合食團投藥(combined bolus administration)，動物們被處理以 hTFPI D1 變異體或特斯樂(抑肽酶)，並且隨後維持灌注(maintenance infusion)。在第 1 個實驗中，TFPI mut3EA 或特斯樂是呈一為 6 mg/kg/h 的劑量，藉著連續灌注而被給藥。在第 2 個實驗中，動物們被處理以呈 1.5 mg/kg(食團)以及 3 mg/kg/h(灌注)至高達 5 mg/kg 與 10 mg/kg/h 之劑量的 TFPI mut4EA 或特斯樂予以處理。生理食鹽水在兩個實驗中被用作為對照。在灌注開始後的 15 分鐘，尾部的橫切(transaction)(2 mm)被施行，尾部的端點於 37℃下被浸潤在生理食鹽水中，並且出血時間被決定。出血時間被定義為：橫切與出血的可見終點之間的時間間隔。出血時間的縮短是止血效果的測量方法。TFPI mut3EA 以及 TFPI mut4EA 的止血效果是比的上特斯樂所具有者。

實施例 9

TFPI mut4EA 在大鼠動靜脈(AV)分流模型中的抗栓塞效果

TFPI mut4EA 的抗栓塞效果在一大鼠動靜脈分流模型中被研究。經麻醉大鼠的頸動脈(carotid artery)以及頸靜脈被插管以一聚乙烯導管，且該導管是透過一個小管(分流器)被連結一起。經粗糙處理的尼龍套環被引入小管中並且作為致栓塞性表面(thrombogenic surface)。栓塞形成是在血管的體外循環通過該分流器歷時 15 分鐘之後。所形成的栓塞接著自小管被移除，且栓塞重量被決定。藉由食團投藥以及接續的維持灌注，大鼠被處理以 TFPI mut4EA 或特斯樂(抑肽酶)。所使用的劑量為 0.15 mg/kg(食團)以及 0.3 mg/kg/h(灌注)至高達 5 mg/kg 以及 10 mg/kg/h。生理食鹽水被用作為對照。在栓塞重量上的降低是抗栓塞效果的測量方法。TFPI mut4EA 顯示可比的上特斯樂所具有者之抗栓塞效果。

實施例 10

特斯樂與 TFPI mut4EA 在大鼠的相對腸繫膜出血時間上的影響

韋斯大鼠(Wistar rats)(250-300 g)被腹膜內地(intraperitoneally)麻醉[硫戊巴比特鈉(thiopental Na)，100 mg/kg]並且被設置(provided)一靜脈導管。在打開腹部之後，一個小腸套(a loop of small intestine)被轉移到外側。以溫暖的鹽水溶液清洗，一小腸繫膜動脈在立體顯微鏡

(stereomicroscope)下藉由微剪刀(microscissors)的協助被切斷。在該物質被投藥之前的三個對照切口，以及在該測試物質的投藥後之出血時間被測定。於各個實驗中，在以該物質處理後的出血時間是獨立地與在該物質投藥之前的對照出血時間相關。

特斯樂是劑量依賴地(dose-dependently)降低腸繫膜出血時間(第 11 圖)。1.5 mg/kg 特斯樂作為食團的投藥加上隨後的灌注(3 mg/kg/h)在出血時間上不具有顯著效果。5 mg/kg 的一較高劑量作為食團加上 10 或 30 mg/kg/h 作為灌注對應地降低出血時間達 28.5±7.4%以及 42.7±4.2%。

TFPI mut4EA(第 12 圖)以一類似於特斯樂的方式降低腸繫膜出血時間。5 mg/kg 的 TFPI mut4EA 做為食團之投藥以及 10 mg/kg/h 作為灌注縮短出血時間達 23.6%。TFPI mut4EA 的最大效果在 5 mg/kg 作為食團的投藥以及 30 mg/kg/h 作為灌注之後被發現。於此劑量，TFPI mut4EA 降低出血時間達 31.7%。

實施例 11

研究 hTFPI D1 變異體在麻醉大鼠之心血管系統上的效果

大鼠們被麻醉以戊巴比妥鈉(pentobarbital Na)。在實驗期間，大鼠們同時地吸入，且體溫藉由加熱毯(heating mat)被維持於恆定。動脈血壓是使用一壓力轉換器(pressure transducer)以及一壓力測量橋樑(pressure measurement bridge)經由位在頸動脈中的導管來被測量。ECG 透過一

ECG 放大器的方法以 3 個標準肢導(standard extremity leads)而被記錄。測量的訊號藉由一軟體被取得、評估並且儲存。收縮、舒張以及平均血壓，與心率(heart rate)是從血壓訊號來被計算。在實驗之後，ECG 被額外地用手確認以及評估。此外還有血壓與 ECG 訊號的類似紀錄。

在導管被設置以及一個連續期(course phase)(恆定的血壓以及心率)之後，TFPI mut3EA 以及 TFPI mut4EA 被 i.v.(靜脈內)地投藥作為食團注射或連續灌注。在一個固定的觀察期間之後，實驗藉由透過一麻醉過量來犧牲動物而被終止。

實施例 12

藉由 hTFPI D1 變異體抑制 IL-8-以及 C5a-誘發之嗜中性球的趨化性

嗜中性球是依據標準方法從血液中被分離。嗜中性球的趨化性是在一雙-腔室系統(two-chamber system)中被施行。一 HUVEC 單層被培養於使用的膜(孔徑 3 μm，聚碳酸酯，從 Falcon 而來)上歷時 24 小時。

配於 RPMI 1640 培養基中的 1×10^5 嗜中性球(其已預先被載以螢光染料)被放入上腔室(upper chamber)中。下腔室含有各種不同刺激濃度或一恆定刺激濃度(IL-5：5 nM 或 C5a：10 nM)，以及各種不同濃度之測試物質特斯樂(抑肽酶)、TFPI mut3EA 或 TFPI mut4EA。要被研究的物質是存在於兩個腔室中。測試混合物被培養於 37℃下以及 5% CO_2 歷時 45 分鐘。在培養之後，移入下腔室的細胞被決定(螢光

測量法，計數)。

實施例 13

藉由 hTFPI D1 變異體抑制 CAP-37 誘發的通透性增加

HUVEC 的一匯聚單層(confluent monolayer)被培養於雙腔室系統(Falcon)之嵌入物(insert)的膜上。為了這個目的，每個嵌入物中種植 2×10^5 細胞並且被培養歷時 18-20h(37℃/5% CO_2)。單層的連續性(continuity)是透過與綴合台酚藍之白蛋白溶液(trypan blue-conjugated albumin solution)在實驗起始之前被確認。接而 CAP37(5 μM)被放入上腔室。通透性的變化是在各種不同濃度(10 μM -0.01 μM)之測試物質特斯樂(抑肽酶)、TFPI mut3EA 或 TFPI mut4EA 存在下歷時 3 小時來被決定。在這個情況下，綴合台酚藍之白蛋白溶液的流出(efflux)作為在通透性上的變化指標。OD 是在 590 nm 下被測量。

參考文獻

Apeler et al. [2004]	Apeler, H. et al. (2004). Arzneimittelforschung **54**, 483-497.
Apeler [2005]	Apeler, H. in: J.Knäblein (Ed.), Modern Biopharmaceuticals, WILEY-VHC, Weinheim, **2005**, pp.1021-1032
Bajaj et al. [2001]	Bajaj, M.S. (2001). Thromb Haemost **86**, 959-972.
Beierlein et al. [2005]	Beierlein, W. et al. (2005). Ann Thorac Surg **79**, 741-748.
Blauhut et al. [1991]	Blauhut, B. et al. (1991). J Thorac Cardiovasc Surg **101**, 958-967.
Bode und Huber [1992]	Bode, W., und Huber, R. (1992). Eur J Biochem **204**, 433-451.
Broze et al. [1987]	Broze, G.J. et al. (1987). Thromb Res **48**, 253-259.
Dennis et al. [1995]	Dennis, M.S. et al. (1995). J Biol Chem **270**, 25411-25417.
Dietrich et al. [2001]	Dietrich, W. et al. (2001). Anesthesiology **95**, 64-71.
Dietrich et al. [1995]	Dietrich, W. et al. (1995). Anesthesiology **83**, 679-689.
Fritz und Wunderer [1983]	Fritz, H., und Wunderer, G. (1983). Arzneimittelforschung **33**, 479-494.
Girard et al. [1989]	Girard, T.J. et al. (1989). Nature **388**, 518-520.
Hess [2005]	Hess, P.J. Jr (2005). Am J Health Syst Pharm **62** (18Suppl 4), 6-9.
Krowarsch et al. [2005]	Krowarsch, D. et al. (2005). Protein Pept Lett **12**, 403-407.
Laskowski und Kato [1980]	Laskowski, M., und Kato, I. (1980). Ann Rev Biochem **49**, 593-626.
Lindahl [1997]	Lindahl, A.K. (1997). Cardiovasc Res **33**, 286-291.
Lwaleed und Bass [2005]	Lwaleed, B.A., und Bass, P.S. (2005). J Pathol, DOI: 10.1002/path.1871
Markland et al. [1996a]	Markland, W. et al. (1996). Biochemistry **35**, 8045-8057.
Markland et al. [1996b]	Markland, W. et al. (1996). Biochemistry **35**, 8058-8067.
Novotny et al. [1989]	Novotny, W.F. et al. (1989). J Biol Chem **264**, 18832-18837.
Otlewski et al. [2001]	Otlewski, J. et al. (2001). Acta Biochim Pol **48**, 419-428.
Petersen et al. [1996]	Petersen, L.C. et al. (1996). Eur J Biochem **235**, 310-316.
Royston [1992]	Royston, D. (1992). J Cardiothorac Vasc Anesth **6**, 76-100.
Schechter und Berger [1967]	Schechter, I., und Berger, A. (1967). Biochem. Biophys. Res. Commun. **27**, 157-162.
Sprecher et al. [1994]	Sprecher, C.A. (1994). Proc Natl Acad Sci USA **91**, 3353-3357.
Wun et al. [1988]	Wun, T.-C. et al. (1988). J Biol Chem **263**, 6001-6004.

縮寫

AUC	依照曲線的面積
BPTI	牛胰蛋白酶抑制劑
DIC	散播性血管內凝血
DNA	去氧核糖核酸
ECG	心電圖
HepG2	人類肝細胞瘤細胞株
HPLC	高效液相層析法
hTFPI	人類組織因子路徑抑制劑 1
hTFPI D1	人類組織因子路徑抑制劑 1 庫尼茲功能部位 1
HUVEC	人類臍靜脈內皮細胞
IC50	於酵素活性為 50% 抑制時的抑制劑濃度
IL-8	介白素-8
i.v.	靜脈內
kDA	千道耳吞
LACI	脂蛋白-相關聯的凝血抑制劑
M	莫耳濃度(每升的莫耳)
Min	分鐘
MOF	多器官衰竭
OD	吸光值
PEG	聚乙二醇
PCR	聚合酶鏈反應

Rpm	每分鐘轉數
TF	組織因子
TPA	組織胞漿素原活化物
U	單位(酵素活性單位)

表 1 一庫尼茲功能部位的定義

```
          1         2         3         4         5
12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678
xxxxCxxxxxxxGxCxxxxxxxXXXxxxxxxxCxxFxXXGCxXxxXxXxxxxxxCxxxCxxx
```

X21 =苯丙胺酸(Phe)、酪胺酸(Tyr)、色胺酸(Trp)

X22 =酪胺酸(Tyr)、苯丙胺酸(Phe)、色胺酸(Trp)、丙胺酸(Ala)、(His)

X23 =酪胺酸(Tyr)或苯丙胺酸(Phe)

X35 =酪胺酸(Tyr)、苯丙胺酸(Phe)、絲胺酸(Ser)

X36 =甘胺酸(Gly)、絲胺酸(Ser)、精胺酸(Arg)、蘇胺酸(Thr)

X40 =甘胺酸(Gly)、丙胺酸(Ala)、精胺酸(Arg)

X43 = (Asn)或甘胺酸(Gly)

X45 =苯丙胺酸(Phe)或酪胺酸(Tyr)

胺基酸 1、2、3、4 可以是不存在的。

胺基酸 56、57、58 可以是不存在的。

表 2：一些天然庫尼茲功能部位的序列

蛋白質	NCBI 編號	序列
人類類澱粉貝他 A4 蛋白質前驅物；AA 289-344	P05067	EVCSEQAETGPCRAMISRWYFDVTEGKCAPFFYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGSA
抑肽酶；胰蛋白酶抑制劑前驅物；AA 36-94	NP_001001554	RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA
人類副睪蛋白酶抑制劑前驅物；AA 73-127	O95925	KQDVCEMPKETGPCLAYFLHWWYDKKDNTCSMFVYGGCQGNNNNFQSKANCLNTC
人類胎盤 bikunin；AA 36-38(功能部位 1)	O43291	DFCLVSKVVGRCRASMPRWWYNVTDGSCQLFVYGGCDGNSNNYLTKEECLKKC
人類胎盤 bikunin；	O43291	EYCTANAVTGPCRASFPRWYFDVERNSCNNFIYGGCRGNKNSYRSEEACMLRC

AA 131-183(功能部位 1)		
人類類澱粉-相似蛋白質 2 前驅物；AA 310-360	Q06481	CSQEAMTGPCRAVMPRWYFDLSKGKCVRFIYGGCGGNRNNFESEDYCMAVC
WFIKKN；AA 385-437 (功能部位 2)	Q8TEU8	PLAACSLPALQGPCKAYAPRWAYNSQTGQCQSFVYGGCEGNGNNFESREACEESCPF

表 3：一些非天然庫尼茲功能部位的序列

蛋白質	NCBI 編號	序列
抑肽酶變異體 (DesPro2-Ser10-Arg15-Ala17-Asp24-Thr26-Glu31-Asn41-Glu53)	Apeler et al. [2004]	R-DFCLEPPSTGPCRAAIIRYFYDATAGLCETFVYGGCRANRNNFKSAEDCMETCGGA
抑肽酶變異體 (Ala17-Glu52)	EP 0307592	RPDFCLEPPYTGPCKAAIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCERTCGGA
抑肽酶變異體 (Ala15-Glu52)	EP 0238993	RPDFCLEPPYTGPCRARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCERTCGGA
KALI-DY	Dennis et al. [1995]	EVCSEQAEDGHCRAAHPRWYFDVTEGKCAPFVYGGCGGNRNNFDTEEYCMAVCGSA

表 4：一些用以抑制人類胰蛋白酶、胞漿素以及血漿胰舒血管素的庫尼茲功能部位之 IC50 數值

庫尼茲功能部位	胰蛋白酶 IC50 [nM]	胞漿素 IC50 [nM]	血漿胰舒血管素 IC50 [nM]
抑肽酶(BPTI)	9	4	46
hTFPI D1	44	559	>10.000
序列辨識編號 4	5	32	3
序列辨識編號 5	8	24	3
序列辨識編號 7	19	195	11
序列辨識編號 8	266	267	1
序列辨識編號 9	36	497	>10.000
序列辨識編號 10	6	27	48
序列辨識編號 18	20	47	1.480

序列辨識編號 19	5	30	3
序列辨識編號 20	7	24	2
序列辨識編號 25	38	52	1.186
序列辨識編號 26	64	83	194
序列辨識編號 28	17	77	8
序列辨識編號 29	4	19	16
序列辨識編號 30	21	56	2.336
序列辨識編號 31	1	48	75

表 5：從帶有天然或非天然庫尼茲功能部位之抑制活性區域而來的胺基酸，其可被從 hTFPI D1 而來的對應胺基酸所取代

庫尼茲功能部位	NCBI 編號 或參考文獻	X_{10}	X_{11}	X_{15}	X_{16}	X_{17}	X_{18}	X_{19}	X_{20}	X_{21}	X_{22}
人類類蛋白貝他 A4 蛋白質前驅物； AA 289-344	P05067	E	T								
抑肽酶；胰蛋白酶抑制劑前驅物； AS 36-94	NP_001001554	Y	T			R	I	I			
人類副睪蛋白酶抑制劑前驅物； AA 73-127	O95925	E	T								
人類胎盤 bikunin； AA 36-88(功能部位 1)	O43291			R				P		W	W

人類胎盤 bikunin； AA 131-183(功能部位 2)	O43291	V	T	R		S	F	P		W	
人類類澱粉-相似蛋白質 2 前驅物； AA 310-360	Q06481							P		W	
WFIKKN；AA 385-437 (功能部位 2)	Q8TEU8							P		W	
抑肽酶變異體(DesPro2-Ser10-Arg15-Ala17-Asp24-Thr26-Glu31-Asn41-Glu53)	Apeler et al. [2004]	S	T	R		A	I	I			
抑肽酶變異體 (Ala17-Glu52)	EP 0307592	Y	T			A	I	I			
抑肽酶變異體 (Ala15-Glu52)	EP 0238993	Y	T	R		R	I	I			
KALI-DY	Dennis et al. [1995]			R		A	H	P		W	
hTFPI D1	P10646	D	D	K	A	I	M	K	R	F	F

【圖式簡單說明】

第 1 圖顯示依據本發明的 hTFPI D1，一些被偏好之變異體的胺基酸序列，還有抑肽酶(BPTI)與 hTFPI D1 的序列。

第 2 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明 TFPI mut3EA 的變異體(序列辨識編號 19)在人類血漿(活體外)的纖維蛋白溶解上之效果。

第 3 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明 TFPI mut3EA 的變異體(序列辨識編號 19)在人類血漿(活體外)的凝血上之效果。

第 4 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明 TFPI mut3EA 的變異體(序列辨識編號 19)於 TPA 的存在下(活體外)，在大鼠的出血時間上之效果。

第 5 圖顯示合成的 hTFPI D1 功能部位(hTFPI D1，粗體)(其被選殖於載體 pIU10.10.W 中)之核苷酸序列以及衍生的胺基酸序列。用於次選殖的限制酶(BsaBI, XhoI)之辨識序列被標示底線。

第 6 圖顯示合成的 hTFPI D1 功能部位(hTFPI D1，粗體)(其被選殖於載體 pIU3.12.M 中)之核苷酸序列以及衍生的胺基酸序列。用於次選殖的限制酶(HindⅢ, BamHI)的辨識序列被標示底線，並且採用的 PCR 引子具有一灰色的背景。

第 7 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明的 TFPI mut4EA 變異體(序列辨識編號 20)在人類血漿(活體外)的纖維蛋白溶解上之效果。

第 8 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明的 TFPI

mut4EA 變異體(序列辨識編號 20)在人類血漿(活體外)的凝血上之效果。

第 9 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明的 TFPI mut4EA 變異體(序列辨識編號 20)於 TPA 的存在下(活體外)，在大鼠的出血時間上之效果。

第 10 圖顯示特斯樂(抑肽酶)以及依據本發明的 TFPI mut4EA 變異體(序列辨識編號 20)在大鼠動靜脈分流模型上的抗栓塞效果。

第 11 圖顯示特斯樂在大鼠的相對腸繫膜出血時間上之效果。出血時間(在測試物質被投藥之後)是與該物質投藥之前的平均對照出血時間相關。數值被顯示為平均值±SEM，n = 8。

*顯著差異於載體，P<0.05；***顯著差異於載體，P<0.001。

第 11 圖顯示依據本發明之 TFPI mut4EA 變異體在大鼠的相對腸繫膜出血時間上之效果。出血時間(在測試物質被投藥之後)是與該物質投藥之前的平均對照出血時間相關。數值被顯示為平均值±SEM，n = 8。

顯著差異於載體，P<0.05；*顯著差異於載體，P<0.001。

第 13 圖顯示藉由依據本發明的 TFPI mut4EA 變異體抑制 IL-8 誘發噬中性球的趨化性。

第 14 圖顯示藉由依據本發明的 TFPI mut4EA 變異體抑制 CAP-37 誘發的通透性增加。

【主要元件符號說明】

無

序列表

<110> Bayer HealthCare

<120> 嵌合的庫尼茲功能部位及其用途

<130> BHC 1 6 022

<150> EP06004693.5
<151> 2006-03-08

<160> 53

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 1

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 2
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 2

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

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

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 3
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 3

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Val Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 4
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 4

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 5
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 5

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 6
<211> 58
<212> PRT
<213> 牛

<400> 6

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 7
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 7

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 8
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 8

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala His Pro Arg Trp Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 9
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 9

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Ile Met Lys Arg Phe Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 10
<211> 58
<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 10

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 11
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 11

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 12
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 12

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Ala Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 13
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 13

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 14
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 14

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 15
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 15

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ser Phe Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 16
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 16

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Ser Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 17
<211> 58
<212> PRT
<213> Homo sapi

<400> 17

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala
1 5 10 15

Ala Met Lys Arg Phe Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 18
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 18

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

Lys Ala Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 19
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 19

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp

50 55 60

<210> 20
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 20

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 21
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sa

<400> 21

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 22
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 22

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala His Pro Arg Trp Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 23
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 23

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Asp Asp Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Ile Met Lys Arg Phe Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 24
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 24

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Glu Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala Met Lys Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 25
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sa

<400> 25

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 26
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 26

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Ala Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 27
<211> 60
<212> PRT
<213> Homo sapi

<400> 27

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 28
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 28

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Tyr Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Arg Ala Ala Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 29
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 29

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

Arg Ala Ser Phe Pro Arg Trp Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 30
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 30

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Ser Thr Gly Pro Cys
1 5 10 15

Lys Ala Arg Ile Ile Arg Phe Phe Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 31
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 31

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

Arg Ala Ala Met Lys Arg Phe Trp Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 32

<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<220>
<221> misc_feature
<223> X = 天然的胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (10)..(11)
<223> Xaa 可以是任何天然出現的胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (15)..(22)
<223> Xaa 可以是任何天然出現的胺基酸

<400> 32

Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa Xaa Gly Pro Cys Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys Glu Glu
20 25 30

Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu Ser Leu
35 40 45

Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55

<210> 33
<211> 60
<212> PRT
<213> 智慧人

<220>
<221> misc_feature
<223> X = 天然的胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (12)..(13)
<223> Xaa 可以是任何天然出現的胺基酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (17)..(24)
<223> Xaa 可以是任何天然出現的胺基酸

<400> 33

Glu Ala Met His Ser Phe Cys Ala Phe Lys Ala Xaa Xaa Gly Pro Cys
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asn Ile Phe Thr Arg Gln Cys
20 25 30

Glu Glu Phe Ile Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gln Asn Arg Phe Glu
35 40 45

Ser Leu Glu Glu Cys Lys Lys Met Cys Thr Arg Asp
50 55 60

<210> 34
<211> 48
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 34
ggtaagcttg gataaaagag aagctatgca ttttttttgt gcttttaa
48

<210> 35
<211> 41
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 35
tagtggatcc cgagcttgct tattaatctc tagtacacat t
41

<210> 36
<211> 88
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 36
ctatgcattc tttttgtgct tttaaagctg atgatggtcc atgtagagct gctcatccaa
60

gatggttttt caatattttt acaagaca
88

<210> 37
<211> 30
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 37
tccctcgagt tattaatctc tagtacacat
30

<210> 38
<211> 42
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 38
tttgtgcttt taaagctgat gatggtccat gtagagctgc tc
42

<210> 39
<211> 42
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 39
tttgtgcttt taaagctgaa actggtccat gtagagctgc tc
42

<210> 40
<211> 42
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 40
gagcagctct acatggacca gtttcagctt taaaagcaca aa
42

<210> 41
<211> 56
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 41

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Thr Gly Pro Cys Arg Ala Met Ile
1 5 10 15

Ser Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Phe
20 25 30

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
35 40 45

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala

50 55

<210> 42
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 42

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Arg Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
35 40 45

Glu Asp Cys Met Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 43
<211> 55
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 43

Lys Gln Asp Val Cys Glu Met Pro Lys Glu Thr Gly Pro Cys Leu Ala
1 5 10 15

Tyr Phe Leu His Trp Trp Tyr Asp Lys Lys Asp Asn Thr Cys Ser Met
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Gln Gly Asn Asn Asn Asn Phe Gln Ser Lys
35 40 45

Ala Asn Cys Leu Asn Thr Cys
50 55

<210> 44
<211> 53
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 44

Asp Phe Cys Leu Val Ser Lys Val Val Gly Arg Cys Arg Ala Ser Met
1 5 10 15

Pro Arg Trp Trp Tyr Asn Val Thr Asp Gly Ser Cys Gln Leu Phe Val
20 25 30

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

Cys Leu Lys Lys Cys
50

<210> 45
<211> 53
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 45

Glu Tyr Cys Thr Ala Asn Ala Val Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ser Phe
1 5 10 15

Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Glu Arg Asn Ser Cys Asn Asn Phe Ile
20 25 30

Tyr Gly Gly Cys Arg Gly Asn Lys Asn Ser Tyr Arg Ser Glu Glu Ala
35 40 45

Cys Met Leu Arg Cys
50

<210> 46
<211> 51
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 46

Cys Ser Gln Glu Ala Met Thr Gly Pro Cys Arg Ala Val Met Pro Arg
1 5 10 15

Trp Tyr Phe Asp Leu Ser Lys Gly Lys Cys Val Arg Phe Ile Tyr Gly
20 25 30

Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Glu Ser Glu Asp Tyr Cys Met
35 40 45

Ala Val Cys
50

<210> 47
<211> 57
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 47

Pro Leu Ala Ala Cys Ser Leu Pro Ala Leu Gln Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Tyr Ala Pro Arg Trp Ala Tyr Asn Ser Gln Thr Gly Gln Cys Gln Ser
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Glu Gly Asn Gly Asn Asn Phe Glu Ser Arg
35 40 45

Glu Ala Cys Glu Glu Ser Cys Pro Phe
50 55

<210> 48
<211> 56
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 48

Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Ser Thr Gly Pro Cys Arg Ala Ala Ile
1 5 10 15

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

Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Asn Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala Glu Asp
35 40 45

Cys Met Glu Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 49
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 49

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Ala Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
35 40 45

Glu Asp Cys Glu Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 50
<211> 58
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 50

Arg Pro Asp Phe Cys Leu Glu Pro Pro Tyr Thr Gly Pro Cys Lys Ala
1 5 10 15

Ala Ile Ile Arg Tyr Phe Tyr Asn Ala Lys Ala Gly Leu Cys Gln Thr
20 25 30

Phe Val Tyr Gly Gly Cys Arg Ala Lys Arg Asn Asn Phe Lys Ser Ala
35 40 45

Glu Asp Cys Glu Arg Thr Cys Gly Gly Ala
50 55

<210> 51
<211> 56
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 51

Glu Val Cys Ser Glu Gln Ala Glu Asp Gly His Cys Arg Ala Ala His
1 5 10 15

Pro Arg Trp Tyr Phe Asp Val Thr Glu Gly Lys Cys Ala Pro Phe Val
20 25 30

Tyr Gly Gly Cys Gly Gly Asn Arg Asn Asn Phe Asp Thr Glu Glu Tyr
35 40 45

Cys Met Ala Val Cys Gly Ser Ala
50 55

<210> 52
<211> 299
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 52
tcaaacaaga agattacaaa ctatcaattt catacacaat ataaacgatt aaaagaatga
60

gattcccatc tatttttact gctgttttgt ttgctgcttc ttctgctttg gctatgcatt
120

ctttttgtgc ttttaaagct gatgatggtc catgtaaagc tattatgaaa agatttttt
180

tcaatatttt tacaagacaa tgtgaagagt ttatctatgg tggttgtgaa ggtaatcaaa
240

atagatttga gtctttggaa gagtgtaaaa aaatgtgtac tagagattaa taactcgag
299

<210> 53
<211> 540
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 53
ttcaaacaag aagattacaa actatcaatt tcatacacaa tataaacgat taaaagaatg
60

agatttcctt caatttttac tgcagtttta ttcgcagcat cctccgcatt agctgctcca
120

gtcaacacta caacagaaga tgaaacggca caaattccgg ctgaagctgt catcggttac
180

tcagatttag aaggggattt cgatgttgct gttttgccat tttccaacag cacaaataac
240

gggttattgt ttataaatac tactattgcc agcattgctg ctaaagaaga aggggtaagc
300

ttggataaaa gagaagctat gcattctttt tgtgctttta aagctgatga tggtccatgt
360

aaagctatta tgaaaagatt ttttttcaat atttttacaa gacaatgtga agagtttatc
420

tatggtggtt gtgaaggtaa tcaaaataga tttgagtctt tggaagagtg taaaaaaatg
480

tgtactagag attaataagc aagctcggga tccactagta acggccgcca gtgtgctgga
540

五、中文發明摘要：

本發明有關於帶有天然或非天然庫尼茲功能部位之人類組織因子抑制劑功能部位 1 的嵌合體，以及它們的製備與用途。

六、英文發明摘要：

The present invention relates to chimeras of human tissue factor inhibitor domain 1 with natural and non-natural Kunitz domains, and their preparation and use.

十、申請專利範圍：

1. 一種具有下列通式的 hTFPI D1 變異體：

MHSFCAFKAX$_{10}$X$_{11}$GPCX$_{15}$X$_{16}$X$_{17}$X$_{18}$X$_{19}$X$_{20}$X$_{21}$X$_{22}$FNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRF
ESLEECKKMCTRD

相較於天然的序列，其在位置 X$_{10}$、X$_{11}$、X$_{15}$、X$_{16}$、X$_{17}$、X$_{18}$、X$_{19}$、X$_{20}$，X$_{21}$ 以及 X$_{22}$ 具有至少一個突變，其中

X$_{10}$ 是胺基酸 D、E、Y，V 或 S，

X$_{11}$ 是胺基酸 D 或 T，

X$_{15}$ 是胺基酸 K 或 R，

X$_{16}$ 是胺基酸 A，

X$_{17}$ 是胺基酸 I、R，S 或 A，

X$_{18}$ 是胺基酸 M、I，F 或 H，

X$_{19}$ 是胺基酸 K，I 或 P；

X$_{20}$ 是胺基酸 R，

X$_{21}$ 是胺基酸 F 或 W，以及

X$_{22}$ 是胺基酸 F 或 W，

不包括下列序列的肽：

序列辨識編號 1(TFPI mut1)。

2. 如申請專利範圍第 1 項的肽，其於 N 端額外地包含有胺基酸 E 以及 A。

3. 如申請專利範圍第 1 項的肽，其選自於下列群組：序列辨識編號 3(TFPI mut13)、序列辨識編號 4(TFPI mut3)、序列辨識編號 5(TFPI mut4)、序列辨識編號 7(TFPI mut2)、序

列辨識編號 8(TFPI mut5)、序列辨識編號 9(TFPI mut6)、序列辨識編號 10(TFPI 隨機)、序列辨識編號 11(TFPI mut7)、序列辨識編號 12(TFPI mut8)、序列辨識編號 13(TFPI mut9)、序列辨識編號 14(TFPI mut10)、序列辨識編號 15(TFPI mut11)，以及序列辨識編號 16(TFPI mut12)。

4. 如申請專利範圍第 2 項的肽，其選自於下列群組：序列辨識編號 17(TFPI mut15)、序列辨識編號 18(TFPI mut13EA)、序列辨識編號 19(TFPI mut3EA)、序列辨識編號 20(TFPI mut4EA)、序列辨識編號 21(TFPI mut2EA)、序列辨識編號 22(TFPI mut5EA)、序列辨識編號 23(TFPI mut6EA)、序列辨識編號 24(TFPI 隨機 EA)、序列辨識編號 25(TFPI mut7EA)、序列辨識編號 26(TFPI mut8EA)、序列辨識編號 27(TFPI mut9EA)、序列辨識編號 28(TFPI mut10EA)、序列辨識編號 29(TFPI mut11EA)、序列辨識編號 30(TFPI mut12EA)，以及序列辨識編號 31(TFPI mut15EA)。

5. 一種編碼如申請專利範圍第 1 至 4 項其中之一肽的 DNA。

6. 一種包含如申請專利範圍第 5 項之 DNA 的載體。

7. 一種包含如申請專利範圍第 5 項之 DNA 的微生物。

8. 一種製備如申請專利範圍第 1 至 4 項之肽之方法，其係藉由如申請專利範圍第 5 項的微生物表現。

9. 一種包含有一種或多種如申請專利範圍第 1 至 4 項之肽的醫藥品。

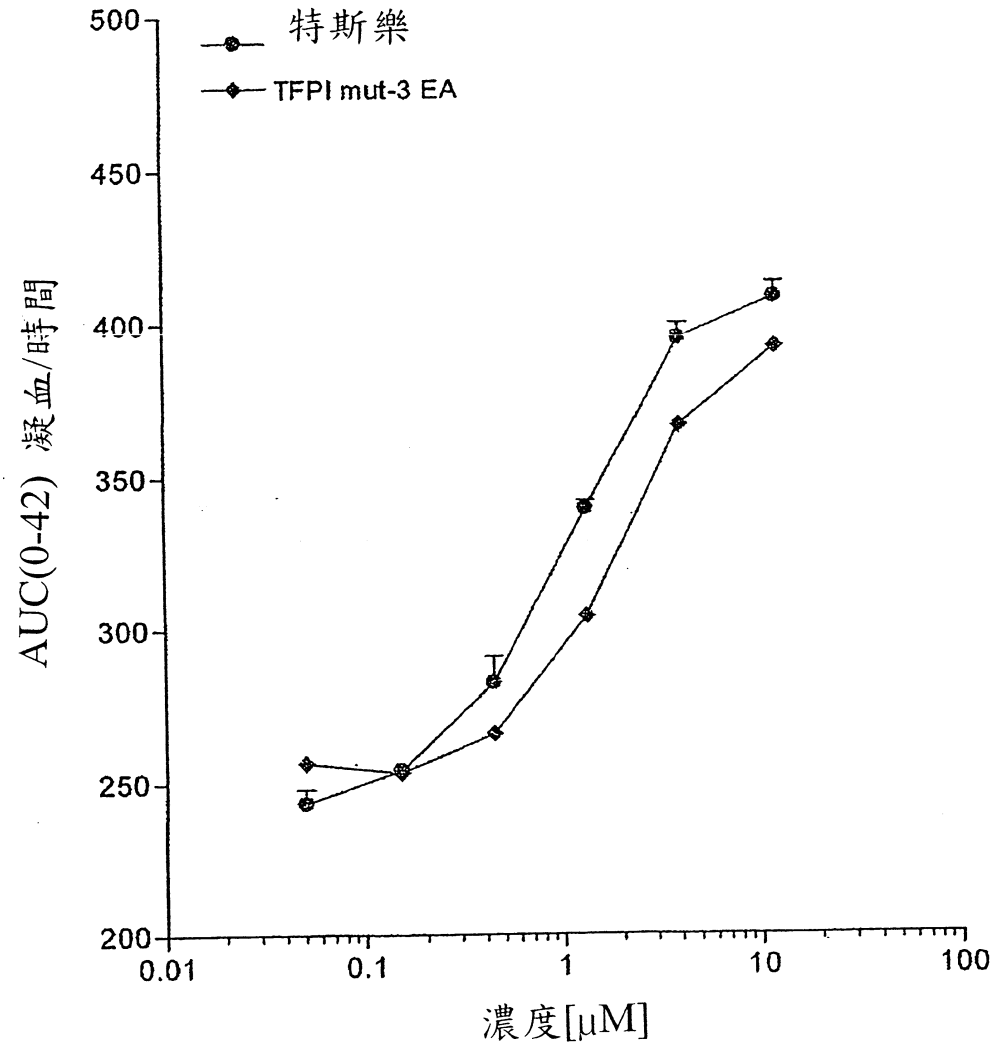
十一、圖式：

第 1 圖

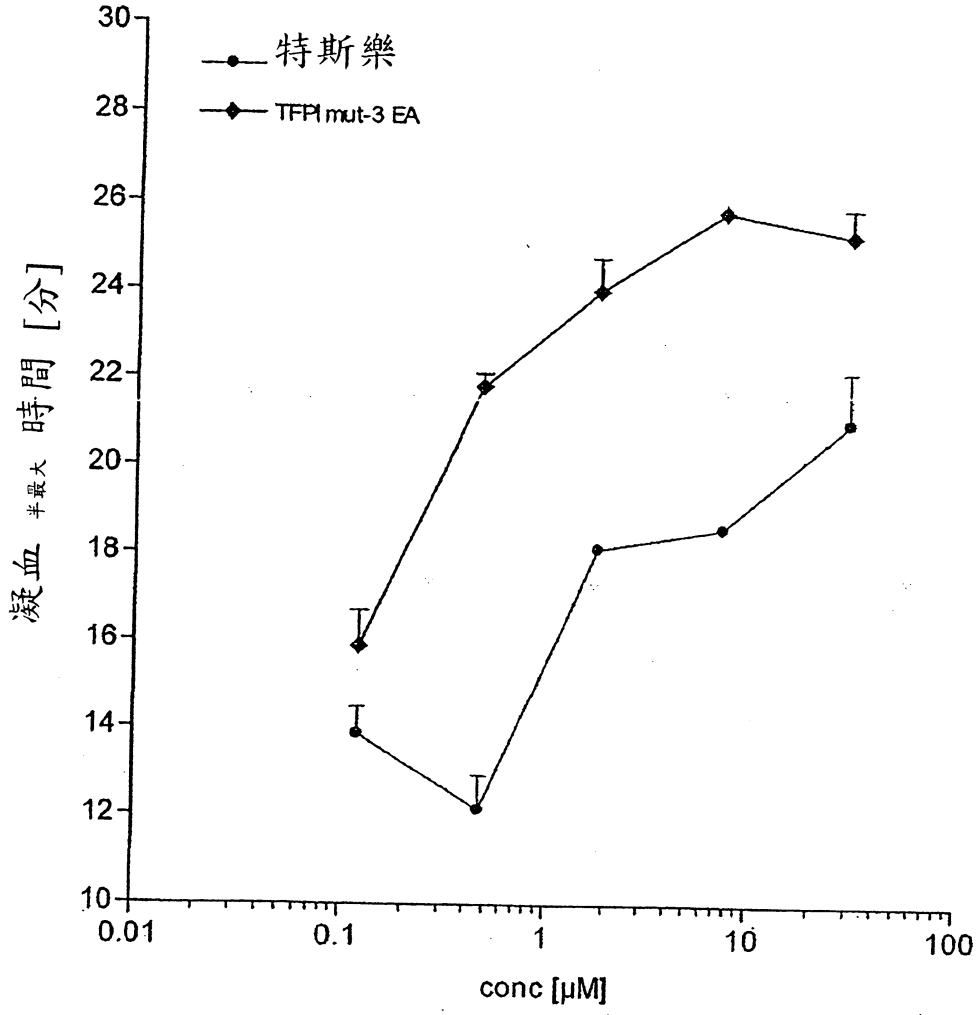
Seq No.	1	(TFPI mut1) MHSFCAFKADDGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	2	(hTFPI D1) MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	3	(TFPI mut13) MHSFCAFKAVTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	4	(TFPI mut3) MHSFCAFKAETGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	5	(TFPI mut4) MHSFCAFKAETGPCRAAHPRWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	6	(Aprotinin) RPDFCLEPPYTGPCKARIIRYFYNAKAGLCQTFVYGGCRAKRNNFKSAEDCMRTCGGA
Seq No.	7	(TFPI mut2) MHSFCAFKADDGPCRAAMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	8	(TFPI mut5) MHSFCAFKADDGPCRAAHPRWWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	9	(TFPI mut6) MHSFCAFKADDGPCKAIMKRFWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	10	(TFPI random) MHSFCAFKAETGPCRAAMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	11	(TFPI mut7) MHSFCAFKAYTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	12	(TFPI mut8) MHSFCAFKAYTGPCKAAIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	13	(TFPI mut9) MHSFCAFKAYTGPCRARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	14	(TFPI mut10) MHSFCAFKAYTGPCRAAIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	15	(TFPI mut11) MHSFCAFKAVTGPCRASFPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	16	(TFPI mut12) MHSFCAFKASTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	17	(TFPI mut15) MHSFCAFKAVTGPCRAAMKRFWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	18	(TFPI mut13EA) EAMHSFCAFKAVTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	19	(TFPI mut3EA) EAMHSFCAFKAETGPCRAAHPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	20	(TFPI mut4EA) EAMHSFCAFKAETGPCRAAHPRWWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	21	(TFPI mut2EA) EAMHSFCAFKADDGPCRAAMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

Seq No.	22 (TFPI mut5EA)	EAMHSFCAFKADDGPCRAAHPRWWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	23 (TFPI mut6EA)	EAMHSFCAFKADDGPCKAIMKRFWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	24 (TFPI randomEA)	EAMHSFCAFKAETGPCRAAMKRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	25 (TFPI mut7EA)	EAMHSFCAFKAYTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	26 (TFPI mut8EA)	EAMHSFCAFKAYTGPCKAAIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	27 (TFPI mut9EA)	EAMHSFCAFKAYTGPCRARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	28 (TFPI mut10EA)	EAMHSFCAFKAYTGPCRAAIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	29 (TFPI mut11EA)	EAMHSFCAFKAVTGPCRASFPRWFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	30 (TFPI mut12EA)	EAMHSFCAFKASTGPCKARIIRFFFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD
Seq No.	31 (TFPI mut15EA)	EAMHSFCAFKAVTGPCRAAMKRFWFNIFTRQCEEFIYGGCEGNQNRFESLEECKKMCTRD

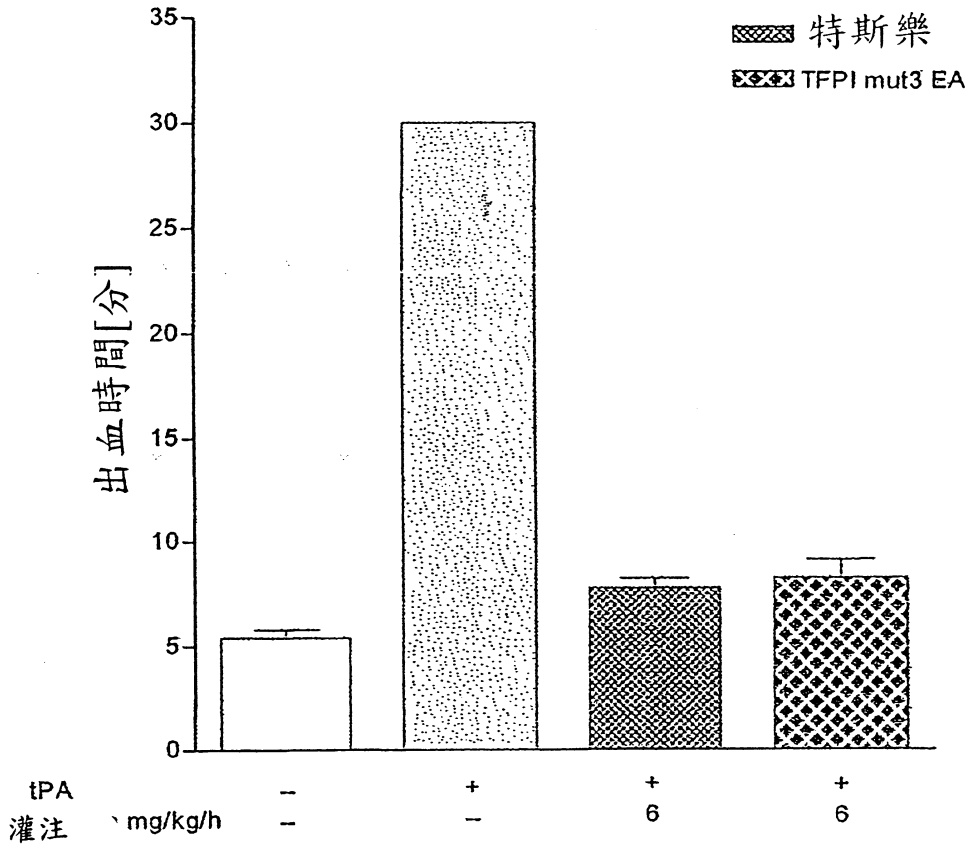
第 2 圖


特斯樂
TFPI mut-3 EA
AUC(0-42) 凝血/時間
500
450
400
350
300
250
200
0.01
0.1
1
10
100
濃度[μM]

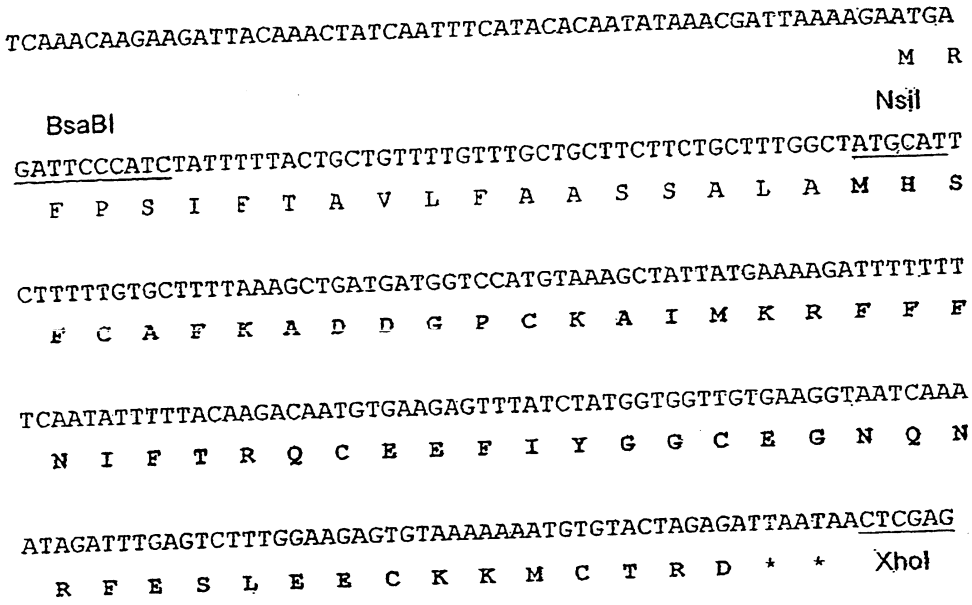
第 3 圖


特斯樂
TFPI mut-3 EA
凝血 半最大 時間 [分]
30
28
26
24
22
20
18
16
14
12
10
0.01
0.1
1
10
100
conc [μM]

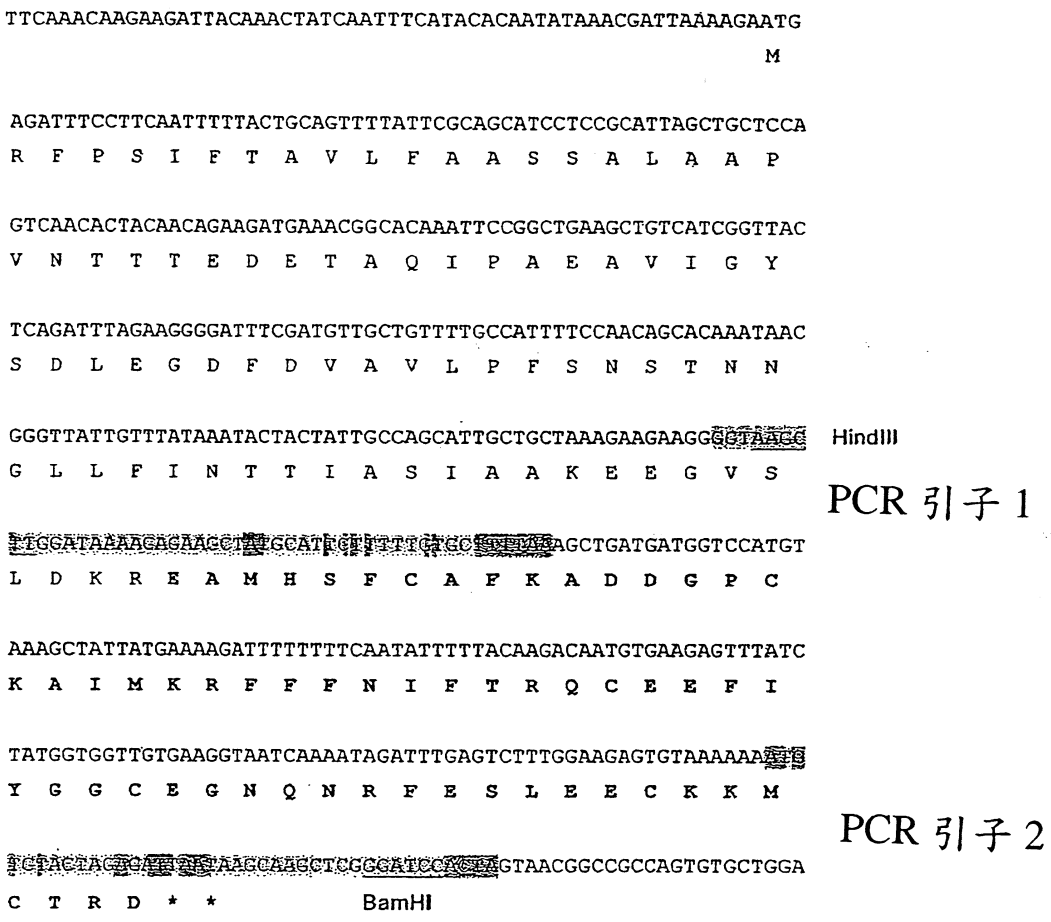
第 4 圖



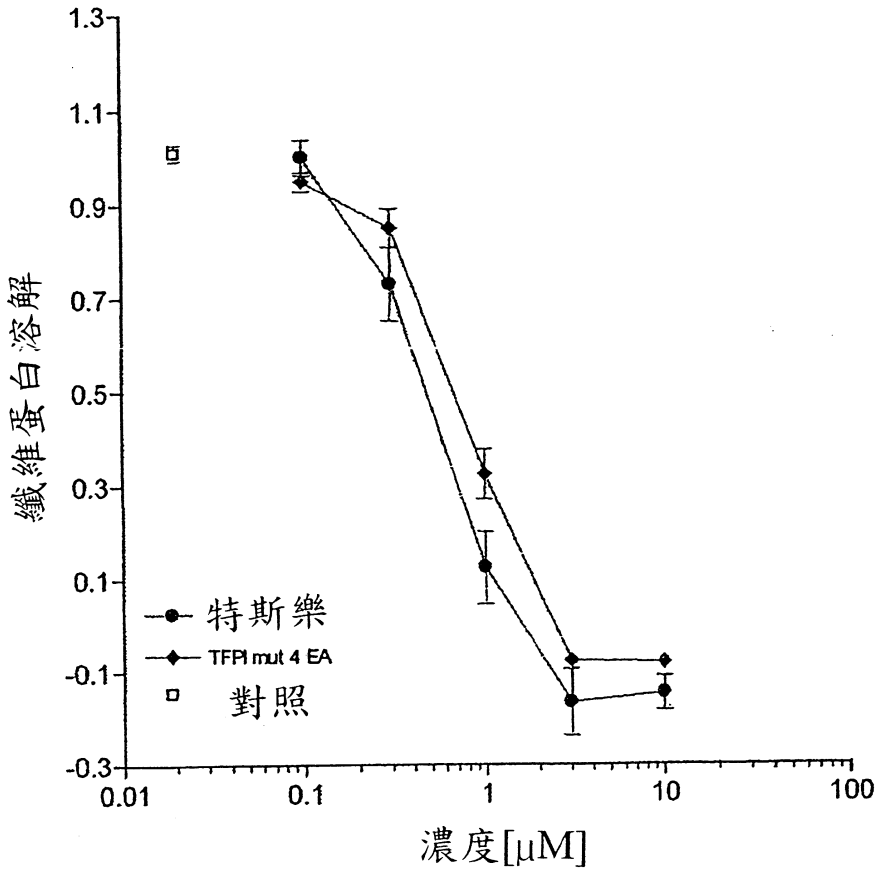
第 5 圖


TCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGATTAAAAGAATGA
M R
NsiI
BsaBI
GATTCCCATCTATTTTTACTGCTGTTTTGTTTGCTGCTTCTTCTGCTTTGGCTATGCATT
F P S I F T A V L F A A S S A L A M H S
CTTTTTGTGCTTTTAAAGCTGATGATGGTCCATGTAAAGCTATTATGAAAAGATTTTTTT
F C A F K A D D G P C K A I M K R F F F
TCAATATTTTTACAAGACAATGTGAAGAGTTTATCTATGGTGGTTGTGAAGGTAATCAAA
N I F T R Q C E E F I Y G G C E G N Q N
ATAGATTTGAGTCTTTGGAAGAGTGTAAAAAAATGTGTACTAGAGATTAATAACTCGAG
R F E S L E E C K K M C T R D * * XhoI

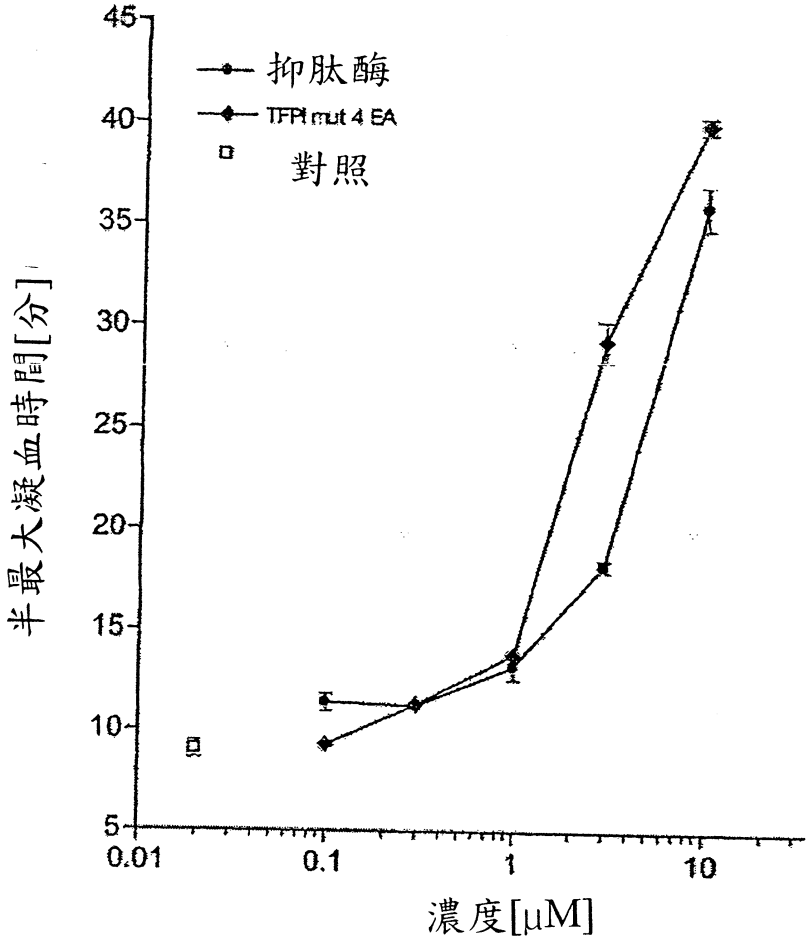
第 6 圖


TTCAAACAAGAAGATTACAAACTATCAATTTCATACACAATATAAACGATTAAAAGAATG
M
AGATTTCCTTCAATTTTTACTGCAGTTTTATTCGCAGCATCCTCCGCATTAGCTGCTCCA
R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P
GTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTAC
V N T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y
TCAGATTTAGAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAAC
S D L E G D F D V A V L P F S N S T N N
GGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAAGGGGTAAGC
HindIII
G L L F I N T T I A S I A A K E E G V S
PCR 引子 1
TTGGATAAAAGAGAAGCTATGCATTCGTTTTTCGCGTTTAAAGCTGATGATGGTCCATGT
L D K R E A M H S F C A F K A D D G P C
AAAGCTATTATGAAAAGATTTTTTTTCAATATTTTTACAAGACAATGTGAAGAGTTTATC
K A I M K R F F F N I F T R Q C E E F I
TATGGTGGTTGTGAAGGTAATCAAAATAGATTTGAGTCTTTGGAAGAGTGTAAAAAAATG
Y G G C E G N Q N R F E S L E E C K K M
PCR 引子 2
TGTACTAGTGCATTTTAAGCAAGCTCGGGATCCAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGA
C T R D * *
BamHI

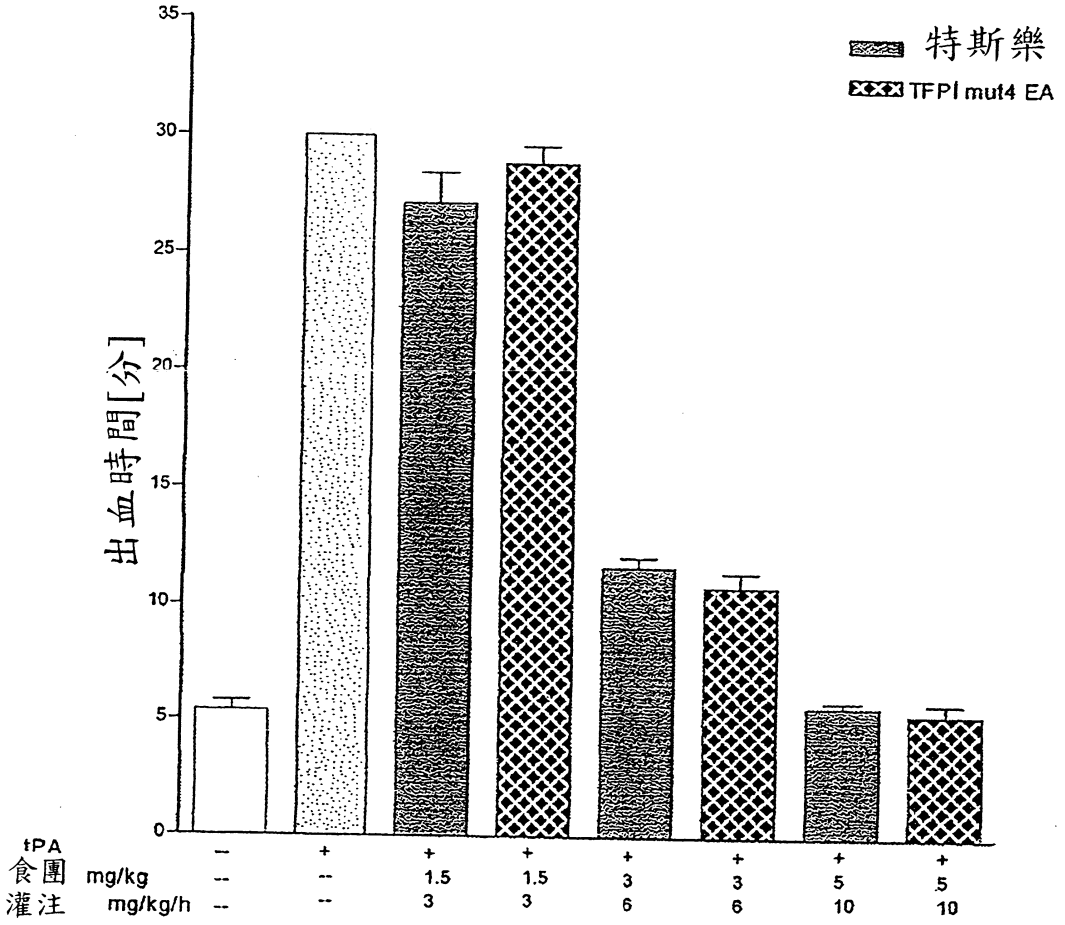
第 7 圖


1.3
1.1
0.9
0.7
0.5
0.3
0.1
-0.1
-0.3
纖維蛋白溶解
特斯樂
TFPI mut 4 EA
對照
0.01
0.1
1
10
100
濃度[μM]

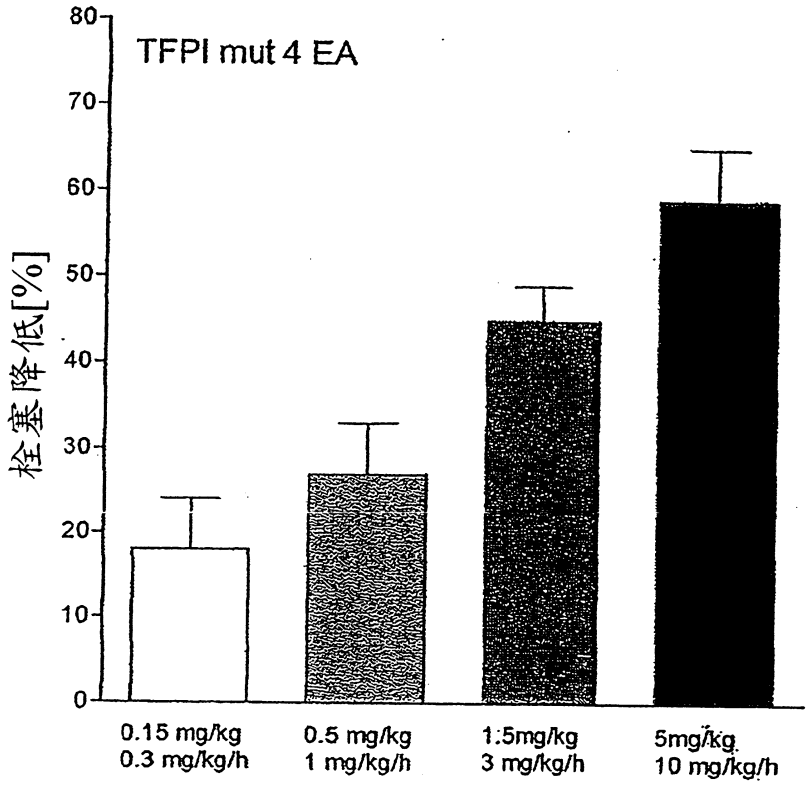
第 8 圖

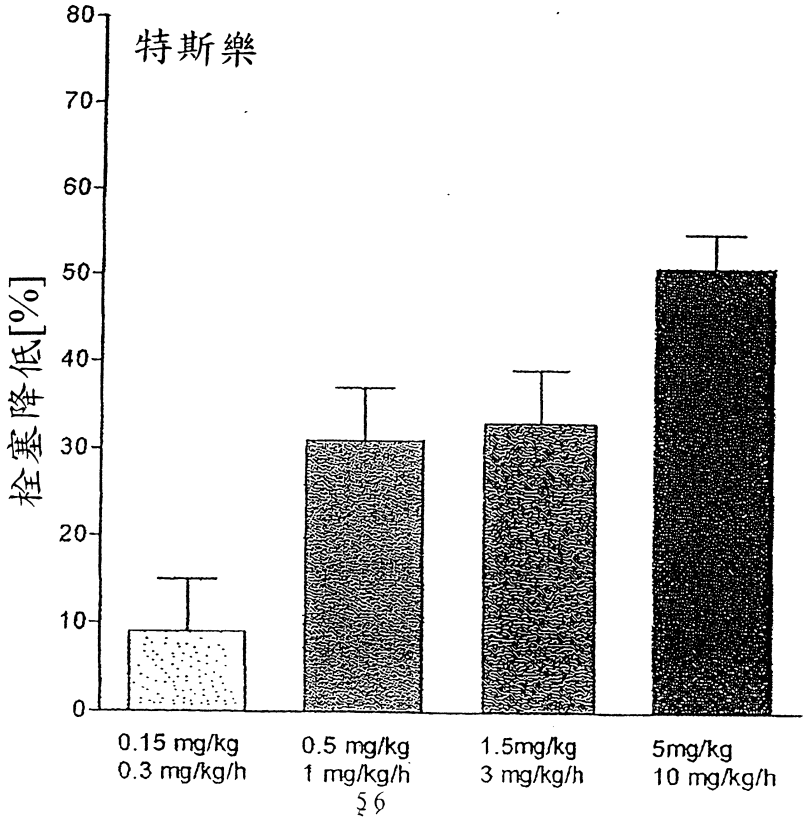

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0.01
0.1
1
10
抑肽酶
TFPI mut 4 EA
對照
半最大凝血時間[分]
濃度[μM]

第 9 圖


特斯樂
TFPI mut4 EA
出血時間[分]
35
30
25
20
15
10
5
0
tPA
食團 mg/kg
灌注 mg/kg/h
-- + + + + + + +
-- -- 1.5 1.5 3 3 5 5
-- -- 3 3 6 6 10 10

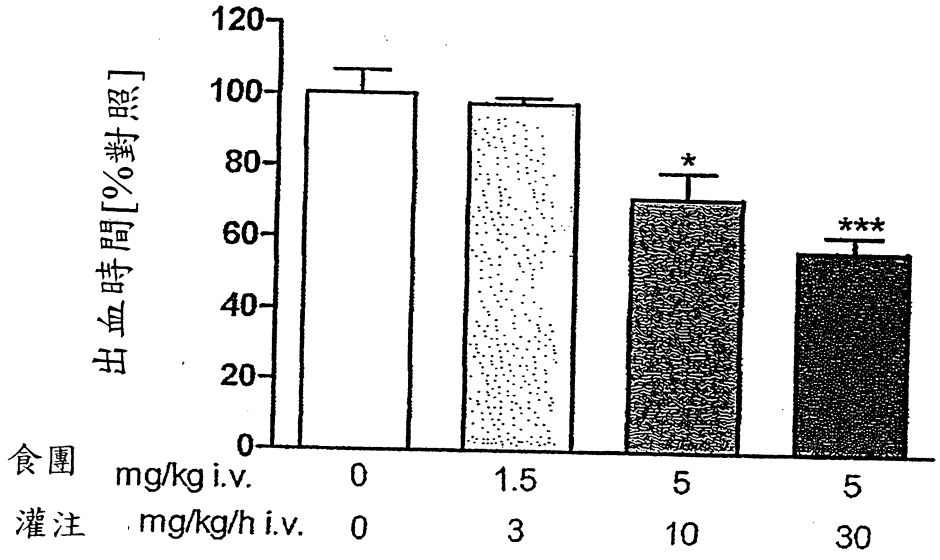
第 10 圖


TFPI mut 4 EA
栓塞降低[%]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.15 mg/kg
0.3 mg/kg/h
0.5 mg/kg
1 mg/kg/h
1.5mg/kg
3 mg/kg/h
5mg/kg
10 mg/kg/h


特斯樂
栓塞降低[%]
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0.15 mg/kg
0.3 mg/kg/h
0.5 mg/kg
1 mg/kg/h
1.5mg/kg
3 mg/kg/h
5mg/kg
10 mg/kg/h

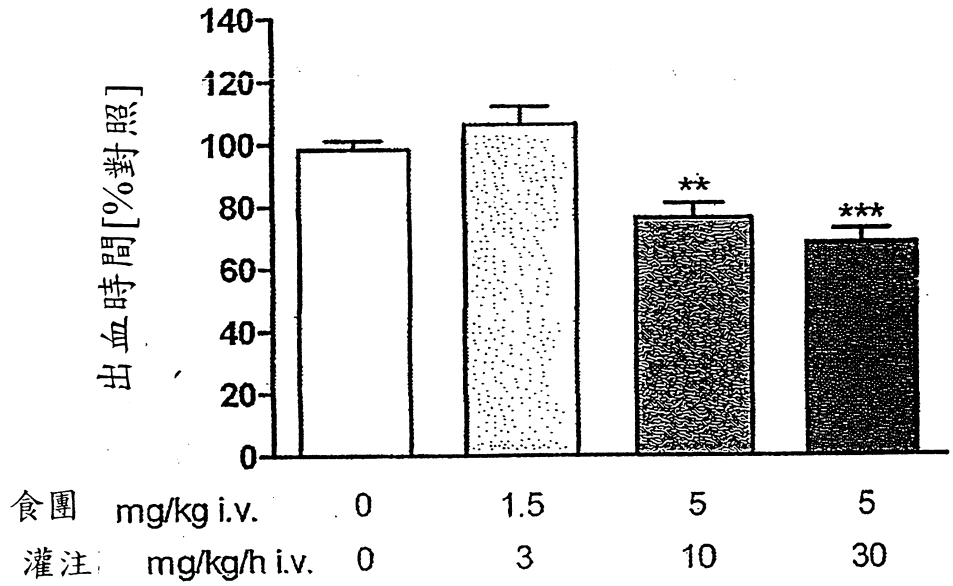
第 11 圖

特斯樂

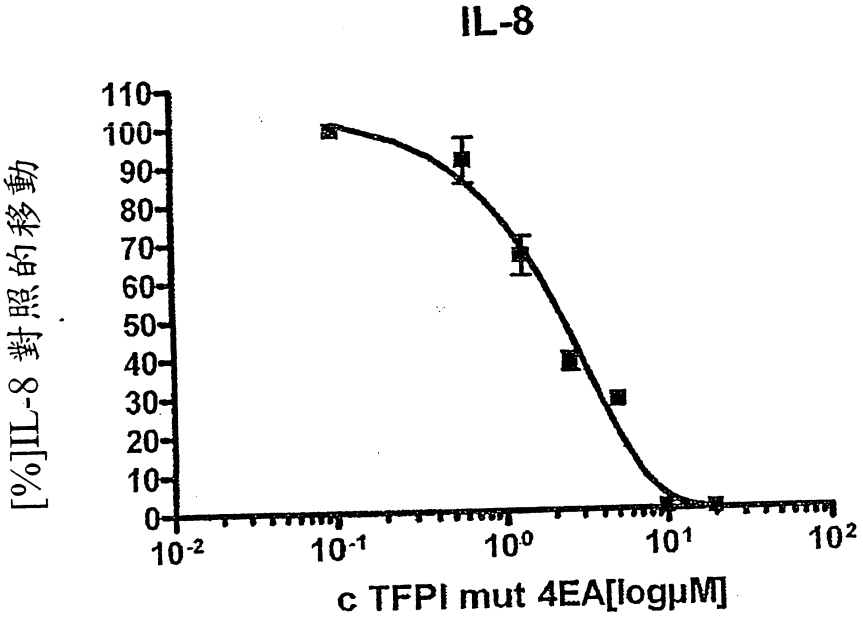


第 12 圖

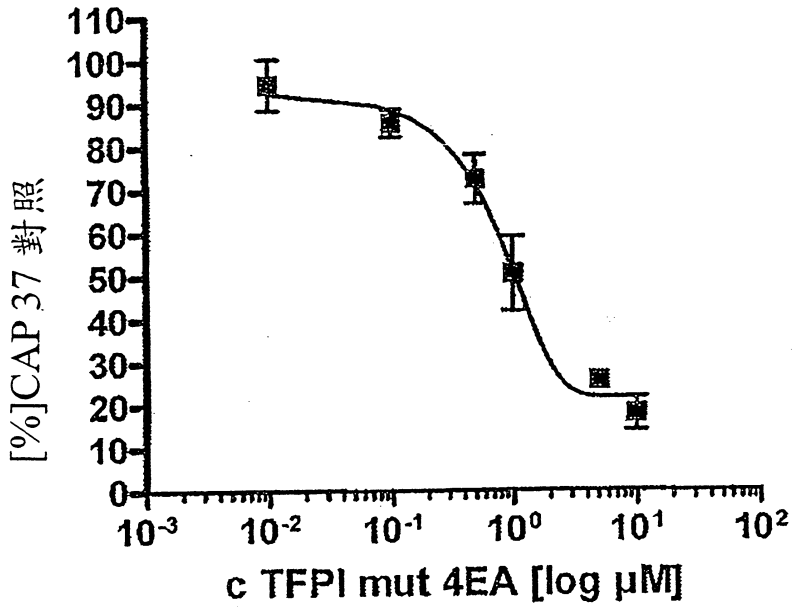
TFPI mut4 EA



第 13 圖


IL-8
[%]IL-8 對照的移動
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10-2
10-1
100
101
102
c TFPI mut 4EA[logμM]

第 14 圖


[%]CAP 37 對照
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
10-3
10-2
10-1
100
101
102
c TFPI mut 4EA [log µM]

七、指定代表圖：

（一）本案指定代表圖為：第（ 2 ）圖。

（二）本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無