



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201429992 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102143366

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 28 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/40 (2006.01)**
A61P7/04 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/29 美國 61/731,294
2013/03/15 美國 61/786,472

(71)申請人：拜耳保健有限責任公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)
美國

(72)發明人：王卓智 WANG, ZHUOZHI (CN)；趙曉燕 ZHAO, XIAO-YAN (US)；顧建明 GU, JIAN-MING (US)；金霽雲 KIM, JI-YUN (US)；鮑森 瑪克辛 BAUZON, MAXINE (US)；墨菲 約翰 MURPHY, JOHN (US)；麥克萊恩 柯克 MCLEAN, KIRK (US)；金芳 JIN, FANG (US)；馬奎特 托比斯 MARQUARDT, TOBIAS (DE)；王新泉 WANG, XINQUAN (CN)；威爾曼 安德里亞斯 WILMEN, ANDREAS (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：17 共 141 頁

(54)名稱

抗活化蛋白 C (aPC) 的單株抗體

MONOClonal antibodies against activated protein C (APC)

(57)摘要

本文提供關於以對其酶原蛋白 C(PC)有最低結合之對抗人類活化蛋白 C(aPC)的抗體、抗原-結合抗體片段(Fab)以及其他蛋白質骨架。此外，此等 aPC 結合蛋白可阻斷 aPC 的抗凝血活性以誘導凝血。此等結合體的治療用途係如本文所述為淘選以及篩選特異性抗體的方法。



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201429992 A

(43)公開日：中華民國 103 (2014) 年 08 月 01 日

(21)申請案號：102143366

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 11 月 28 日

(51)Int. Cl. : **C07K16/40 (2006.01)**
A61P7/04 (2006.01)

A61K39/395 (2006.01)

(30)優先權：2012/11/29 美國 61/731,294
2013/03/15 美國 61/786,472

(71)申請人：拜耳保健有限責任公司 (美國) BAYER HEALTHCARE LLC (US)
美國

(72)發明人：王卓智 WANG, ZHUOZHI (CN)；趙曉燕 ZHAO, XIAO-YAN (US)；顧建明 GU, JIAN-MING (US)；金霽雲 KIM, JI-YUN (US)；鮑森 瑪克辛 BAUZON, MAXINE (US)；墨菲 約翰 MURPHY, JOHN (US)；麥克萊恩 柯克 MCLEAN, KIRK (US)；金芳 JIN, FANG (US)；馬奎特 托比斯 MARQUARDT, TOBIAS (DE)；王新泉 WANG, XINQUAN (CN)；威爾曼 安德里亞斯 WILMEN, ANDREAS (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希；何愛文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：17 共 141 頁

(54)名稱

抗活化蛋白 C (aPC) 的單株抗體

MONOClonal antibodies against activated protein C (APC)

(57)摘要

本文提供關於以對其酶原蛋白 C(PC)有最低結合之對抗人類活化蛋白 C(aPC)的抗體、抗原-結合抗體片段(Fab)以及其他蛋白質骨架。此外，此等 aPC 結合蛋白可阻斷 aPC 的抗凝血活性以誘導凝血。此等結合體的治療用途係如本文所述為淘選以及篩選特異性抗體的方法。

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

抗活化蛋白C (aPC)的單株抗體

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ACTIVATED PROTEIN C
(aPC)

【技術領域】

本發明提供優先結合人類蛋白C之活化形式(aPC)的單株抗體及其片段。

【先前技術】

【0001】 本申請案主張於2012年11月29日申請之美國臨時專利申請案第61/731,294號以及於2013年3月15日申請之美國臨時專利申請案第61/786,472號的優先權，其揭示內容以其整體併入本文做為參考資料。序列表呈交

【0002】 與本申請案相關的序列表是以電子形式經由EFS-網路申請並藉此方式以其整體併入本說明書做為參考資料。

【0003】 人類蛋白C (PC)酶原是以461個胺基酸殘基前驅物在肝臟中被合成且被分泌至血液中(如SEQ ID NO : 1中所示)。在分泌之前，單鏈多肽前驅物藉由移除二肽(Lys156-Arg157)以及一個42個胺基酸殘基的前原引導序列被轉成一個雜二聚體。雜二聚體形式(417個殘基)是由經雙硫橋聯結之輕鏈(155aa，21 kDa)以及重鏈(262aa，41 kDa)所組成(如SEQ ID NO : 2中所示)。PC酶原含有凝血酶切割位點，造成”活化肽”的移除並且將PC活化成活化PC (aPC)形式(405個殘基)，顯示於SEQ ID NO : 3中。第1圖提供人類PC及其活化形式(aPC)的漫畫說明。人類PC含有9個Gla殘基以及4個用於N連結糖化的可能位點。輕鏈含有Gla域以及2個EGF樣域。重鏈帶有活性絲胺

酸蛋白酶域。

【0004】 PC通常以3-5 ug/ml (~65 nM)在健康人類血液中循環且其半衰期為6-8小時。循環型PC酶原的主要形式為雜二聚體形式。PC的輕鏈含有一個富含 γ -羧基麩氨酸(Gla)的結構域(45個aa)、兩個EGF樣結構域(46個aa)以及一個連接子序列。PC的重鏈帶有一個12-aa的高度極性”活化肽”以及具有典型絲氨酸蛋白酶催化三分子的催化域。

【0005】 人類PC歷經多方面的轉譯後修飾，包括糖化、維生素K依賴性 γ -羧基化，以及 γ -羥基化(1-2)。其含有23%碳水化合物(以重量計)以及4個可能N連結糖化位點(一個在輕鏈Asn97而三個在重鏈Asn248/313/329)。其Gla域含有9個Gla殘基且是PC鈣依賴性結合至帶負電磷脂膜的原因。Gla域也可結合至內皮蛋白C受體(EPCR)，其在PC活化期間與內皮膜上的凝血酶以及凝血酶調節素密切合作。

【0006】 蛋白C酶原通常被轉變成其活性酶-活化蛋白C (aPC)以具有生物效力。PC路徑的活性是由PC活化以及aPC不活化的比率所控制。PC活化以兩步驟程序發生在內皮細胞表面。其需要(經由Gla域)PC結合至內皮細胞上的EPCR，接著是透過凝血酶/凝血酶調節素複合體來蛋白分解活化PC。在人類PC重鏈Arg12處的單一切割(其是由內皮細胞表面上的凝血酶/凝血酶調節素所催化)會釋出12-aa的AP並且將酶原PC轉變成aPC，一種活化的絲氨酸蛋白酶。因此，在PC以及aPC胺基酸序列之間的主要差異為在PC中存在有一個12-aa活化肽，其在APC中不存在。PC活化成aPC也會導致構形改變；因此僅有aPC(而非PC)可藉由在其酶活性位點中被苯甲脒或以氯甲基酮(CMK)肽抑制劑所標記。近來已解析無Gla-域aPC在與CMK-抑制劑之複合體中的結晶結構。人類血漿中的主要aPC去活劑為以100nM存在於人類血漿中的蛋白C抑制劑(PCI)，其為絲氨酸蛋白酶抑制劑(serpin)超家族的一個成員。在生理條件下，aPC以極低濃度(1-2 ng/ml或40 pM)循環於人類血液中，半衰期為20-30 min。

【0007】蛋白C路徑充作對抗血栓的天然防禦機制。其不同於其他抗凝血劑，因為它是一種有求必應的系統(on-demand system)，當凝血反應增強時其能夠放大抗凝血反應。在受傷之後，產生凝血酶供凝血之用。同時，凝血酶也藉由結合至排列在血管表面上的凝血酶調節素而觸發抗-凝血反應，而這促使蛋白C活化。因此，aPC生成大體上與凝血酶濃度以及PC含量成比例。

【0008】蛋白C路徑作為凝血過程的一個主要調解者的生理學重要性是根據三個臨床研究結果而被證明：(a)與蛋白C缺乏症相關的嚴重血栓併發症以及能夠藉由蛋白C補充矯正缺乏；(b)與蛋白C輔因子(蛋白S)缺乏症相關的家族性血栓形成體質；以及(c)與在其受質(因子V Leidei R506Q)中的遺傳性突變有關的血栓風險，使其對於被aPC切割變得具有抗性(Bernard, GR et.al. N Engl J Med 2001, 344:699-709 review)。

【0009】相對於其他維生素K依賴性凝血因子，aPC有如抗凝血劑藉由蛋白分解不活化兩種凝血輔因子(因子Va以及VIIIa)來發揮作用，從而抑制凝血酶生成。由於凝血酶含量降低，減低了由凝血酶所誘發的發炎性、促凝血性以及抗纖維蛋白分解反應。aPC也是藉由與胞漿原活化因子抑制劑(PAI)形成複合體而增強纖維蛋白分解反應的直接主因。

【0010】除了抗凝血功能以外，aPC引起細胞保護效用，包括抗發炎以及抗細胞凋亡活性，以及內皮屏障功能的保護。aPC對細胞的這些直接細胞保護效用需要EPCR以及G蛋白偶合受體，蛋白酶活化受體-1 (PAR-1)。因此，aPC會促使纖維蛋白分解並抑制血栓與發炎。aPC的抗凝血以及細胞保護功能似乎是可分開的。大多數的細胞保護效用主要與aPC的抗凝血活性無關，且已生成帶有最小抗凝血活性以及正常細胞保護活性的aPC突變體。同樣地，已報導高抗凝血但卻非細胞保護性aPC突變體。

【0011】aPC輕鏈的C端也是帶有極高電荷的區域，其在蛋白酶結構域中的活性位點的相反側上含有殘基Gly142-Leu155。E149A-aPC具有難以

與野生型aPC區別的醯胺分解活性，但於活化部分凝血活素時間(aPTT)凝血分析中因為對蛋白S輔因子活性的敏感性增加而在抗凝血活性方面增加超過3倍。E149A-aPC顯示在血漿凝血分析中有過度抗凝血活性以及在活體內有過度抗血栓效力。這個突變體在LPS誘發的致死內毒血症鼠模型中已降低細胞保護以及死亡率降低活性。這暗示著，需要aPC的細胞保護活性來降低鼠模型中的死亡率。相反地，aPC的抗凝血活性對於降低死亡率而言既非必要亦非足夠的。aPC已用於治療敗血症，一種危及生命之與高凝血性以及綜合性發炎反應相關的病況。在敗血症中，aPC療法的嚴重副作用為在2%患者中所發生的大出血。這個嚴重的副作用限制其臨床使用。

【發明內容】

【0012】 提供針對人類活化蛋白C (aPC)的單株抗體。在至少一個具體例中，該抗-aPC單株抗體對蛋白C表現最小結合，蛋白C為aPC的酶原。

【0013】 在一些具體例中，所提供之針對aPC的單株抗體已被最佳化，例如增加親和力、增加功能活性或降低與生殖系序列的差異。

【0014】 亦提供被經單離單株抗體所結合之人類aPC上的特異性抗原決定基。進一步提供編碼該特異性抗原決定基的經單離核酸分子。

【0015】 亦提供包含該抗-aPC單株抗體的醫藥組成物以及治療遺傳性與後天性凝血缺乏症或缺陷(諸如A型及B型血友病)的方法。亦提供藉由將抗-aPC單株抗體投與給有需要的患者而縮短出血時間的方法。亦提供生產結合人類aPC之單株抗體的方法。

詳細說明

【0016】 如上述，本揭示內容提供抗體，包括特異地結合至人類蛋白C活化形式(aPC)，但對人類蛋白C的酶原形式(PC)表現相較之下少許反應性或無反應性的單株抗體以及其他結合蛋白。

【0017】 以在下面所列定義使用下列術語供本專利文件之用。

定義

【0018】 若適當的話，以單數形使用的術語也包括複數形且反之亦然。在下面所列舉任何定義與任何其他文件(包括併入本文做為參考資料的任何文件)中的單字用法相衝突的情況下，除非明確為相反意思(例如在術語最初使用的文件中)，否則就解釋本說明書及其相關申請專利範圍來說，下面所列舉的定義應永遠佔優勢。除非另有說明，否則使用”或”表示”及/或”。除非另有說明或若使用”一或多”為明確不恰當的，否則使用”一”在此表示”一或多”。”包含”以及”包括”可交互使用且不具限制性。舉例而言，術語”包括”應表示”包括，但不限於”。

【0019】 術語”蛋白C”或”PC”如本文所用意指呈其酶原形式之蛋白C的任一種變體、同型異構體，及/或物種同系物，其被細胞天然地表現並存在於細胞質中，且與蛋白C的活化形式不同。

【0020】 術語”活化蛋白C”或”aPC”如本文所用意指蛋白C的活化形式，其特徵在於沒有存在於蛋白C中的12個胺基酸活化肽。

【0021】 如本文所用，”抗體”意指完整抗體及其任何抗原結合片段(亦即”抗原-結合部分”)或單鏈。該術語包括天然的或由正常免疫球蛋白基因片段重組過程所形成的全長免疫球蛋白分子(亦即IgG抗體)，或是免疫球蛋白分子的免疫活性部分，諸如抗體片段，其保有特異結合活性。不論結構為何，抗體片段與全長抗體所辨識的相同抗原結合。舉例而言，抗-aPC單株抗體片段結合至aPC的抗原決定基。抗體的抗原-結合功能可以由全長抗體的片段來執行。被術語抗體之”抗原-結合部分”所涵括的結合片段實例包括：(i) Fab片段，由V_L、V_H、C_L，與C_{H1}結構域組成的單價片段；(ii) F(ab')₂片段，一種包含兩個在樞紐區處由雙硫橋連結之Fab片段的二價片段；(iii) 由V_H與C_{H1}結構域組成的Fd片段；(iv)由抗體單臂之V_L與C_H結構域組成的Fv片段；(v) dAb片段(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)，其由V_H結構域組成；(vi)經單離的互補決定區(CDR)；(vii)微抗體、雙鏈抗體、三鏈抗體、

四鏈抗體及κ抗體(參見，例如Ill et al., Protein Eng 1997;10:949-57)；(viii)駱駝IgG；以及(ix)IgNAR。此外，儘管Fv片段的兩個結構域(V_L 與 V_H)是由個別基因所編碼，但它們可以使用重組方法、藉由合成連結子而被連結，使它們變成單一蛋白質鏈，其中 V_L 與 V_H 區配成對以形成單價分子(已知為單鏈Fv (scFv)；參見，例如Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。該等單鏈抗體亦意欲被含括在術語抗體之”抗原-結合部分”中。此等抗體片段是使用習於技藝者所熟知的習知技術獲得，且以與完整抗體相同的方式來分析該等片段的效用。

【0022】 另外，預期抗原結合片段可含括在抗體擬似物中。術語”抗體擬似物”或”擬似物”如本文所用表示表現與抗體類似結合但卻是一個較小的替代性抗體或非抗體蛋白的蛋白質。抗體擬似物可包含於骨架中。術語”骨架”意指一種用於將帶有訂製功能與特性之新產物工程化的多肽平台。

【0023】 如本文所用，術語”抗-aPC抗體”意指特異地結合至aPC之抗原決定基的抗體。當在活體內結合至aPC的抗原決定基時，本文所揭示的抗-aPC抗體放大血液凝結級聯的一或多個方面。

【0024】 如本文所用，術語”抑制結合”及”阻斷結合”(例如參見抑制/阻斷aPC受質結合至aPC)可交替使用並含括部分與完全抑制或阻斷蛋白質與其受質，諸如抑制或阻斷達至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%或約100%。如本文所用，”約”表示指定數值的+/- 10%。

【0025】 提及抑制及/或阻斷aPC受質結合至aPC時，術語抑制與阻斷也包括當與抗-aPC抗體接觸時，aPC對生理受質的結合親和力當與aPC不與抗-aPC抗體接觸時相比有可測得的降低，例如阻斷aPC與其受質(包括因子Va或因子VIIIa)接觸達至少約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%，或約100%。

【0026】 術語”單株抗體”或”單株抗體組成物”如本文所用意指單一分子組成物的抗體分子製劑。單株抗體組成物對特定抗原決定基表現單一結合特異性以及親和力。因此，術語”人類單株抗體”意指表現單一結合特異性的抗體，其具有衍生自人類生殖系免疫球蛋白序列的可變區與恆定區。人類抗體可包括不被人類生殖系免疫球蛋白序列所編碼的胺基酸序列(例如因為在活體外隨機或定點突變或因為活體內體突變而引入的突變)。

【0027】 ”經單離抗體”，如本文所用，欲意指基本上不含其他生物分子的抗體，包括具有不同抗原特異性的抗體(例如結合至aPC的經單離抗體基本上不含結合aPC以外之抗原的抗體)。在一些具體例中，經單離抗體依據乾重為至少約75%、約80%、約90%、約95%、約97%、約99%、約99.9%或約100%純。在一些具體例中，純度可藉由諸如管柱層析、聚丙烯醯胺凝膠電泳，或HPLC分析的方法來測量。但是，結合至人類aPC之抗原決定基、同型異構體或變體的經單離抗體可能對其他相關抗原(例如來自其他物種，例如aPC物種同系物)具有交叉反應性。此外，經單離抗體基本上可不含其他其他細胞物質及/或化學品。如本文所用，”特異性結合”意指結合至預定抗原的抗體。典型地，表現”特異性結合”的抗體以至少約 10^5 M^{-1} 的親和力結合至抗原且以比不相干抗原(例如BSA、酪蛋白)的結合親和力還高(例如)至少兩倍的親和力結合至該抗原。片語”辨識抗原的抗體”以及”對抗原具有特異性的抗體”在本文可與術語”特異地結合至抗原的抗體”交替使用。

【0028】 如本文所用，術語”最低結合”意指不結合至指定抗原及/或對特定抗原表現低親和力的抗體。典型地，對抗原具有最低結合的抗體以低於約 10^2 M^{-1} 的親和力結合至那個抗原，且不以比其結合至不相干抗原還高的親和力結合至預定抗原。

【0029】 如本文所用，術語”高親和力”對抗體(諸如IgG抗體)而言意指至少約 10^7 M^{-1} 的結合親和力，在至少一個具體例中至少約 10^8 M^{-1} 、在一些具體例中至少約 10^9 M^{-1} 、 10^{10} M^{-1} 、 10^{11} M^{-1} 或更高，例如至高 10^{13} M^{-1} 或

更高。但是，”高親和力”結合對其他抗體同型來說可能會改變。舉例而言，對IgM同型的”高親和力”結合意指至少約 10^7 M^{-1} 的結合親和力。如本文所用，”同型”意指由重鏈恆定區基因所編碼的抗體類型(例如IgM或IgG1)。

【0030】 ”互補決定區”或”CDR”意指抗體分子之重鏈可變區或輕鏈可變區內三個超變區中的一者，其形成與被結合抗原的三維結構互補的N端抗原-結合面。從重鏈或輕鏈的N端開始，這些互補決定區分別被表示為”CDR1”、”CDR2”以及”CDR3” [Wu TT, Kabat EA, Bilofsky H, Proc Natl Acad Sci U S A. 1975 Dec;72(12):5107 and Wu TT, Kabat EA, J Exp Med. 1970 Aug 1;132(2):211]。CDR涉及抗原-抗體結合，且CDR3包含對抗原-抗體結合具有特異性的特有區域。因此，抗原-結合位點可包括六個CDR，其包含由重鏈與輕鏈V區每一者之CDR區。

【0031】 術語”抗原決定基”意指抗體特異地結合或交互作用的抗原的範圍或區域，其在一些具體例中指示抗原在物理上與抗體接觸之處。相反地，術語”抗原決定簇(paratope)”意指抗原特異地結合之抗體上的範圍或區域。抗原決定基的特徵在於若對應抗體結合同時是具有排他性的話，亦即某個抗體的結合排除另一個抗體同時結合，競爭結合被認為是重疊的。若抗原能夠容納兩個對應抗體同時結合，則抗原決定基被認為是分散的(獨特)。

【0032】 術語”競爭抗體”，如本文所用，意指結合至與對抗如本文所述aPC之抗體大概，實質上或基本上相同，或甚至相同抗原決定基的抗體。”競爭抗體”包括具有重疊抗原決定基特異性的抗體。因此，競爭抗體能夠有效與如本文所述抗體競爭結合至aPC。在一些具體例中，競爭抗體可結合至與如本文所述抗體相同的抗原決定基。換個角度來看，競爭抗體具有與如本文所述抗體相同的抗原決定基特異性。

【0033】 如本文所述，”保守性置換”意指多肽修飾，其涉及將一或多個胺基酸置換成具有相似生化特性但不會造成多肽的生物或生化功能喪失

的胺基酸。”保守性胺基酸置換”是將胺基酸殘基以具有相似側鏈的胺基酸殘基予以取代。具有相似側鏈的胺基酸殘基家族在本技藝中已經是明確的。此等家族包括下列：具有鹼性側鏈的胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麴胺酸)、不帶電極性側鏈(例如甘胺酸、天冬醯胺酸、麴醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、非極性側鏈(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、 β 分支側鏈(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)，以及芳香族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。本揭示內容的抗體可具有一或多個仍保有抗原結合活性的保守性胺基酸置換。

【0034】 關於核酸以及多肽，術語”實質同源性”表示兩個核酸或兩個多肽，或其指定序列當在有適當核苷酸或胺基酸插入或刪除的情況下最佳比對並比較時是相同的，其中核苷酸或胺基酸插入或刪除佔至少約80%，通常至少約85%，在一些具體例中約90%、91%、92%、93%、94%或95%，在至少一個具體例中至少約96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%的核苷酸或胺基酸。或者，當節段在選定的雜交條件下會與該股的互補股雜交的話，存在有核酸的實質同源性。具有與本文引用的特定核酸序列以及胺基酸序列具有實質同源性的核酸序列以及多肽序列也包括在內。

【0035】 兩個序列之間的同一性百分比是該等序列所共有的相同位置之數目的函數(亦即，%同源性=相同位置數/位置總數×100)，考量空位數，以及各個空位長度，其需要被納入以供兩個序列的最佳比對之用。序列比對以及兩個序列之間的同一性百分比測定可使用數學計算法來達致，在不受到限制的情況下諸如為VectorNTI™的AlignX™模數(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)。就AlignX™而言，多重比對的預設參數為：空位開放罰分：10；空位延伸罰分：0.05；空位分離罰分範圍：8；比對延遲的同一性 % : 40(更 多 詳 細 內 容 見 於

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>)。

【0036】 測定測試序列(本揭示內容的序列)以及目標序列之間的最佳整體匹配的另一個方法(亦意指全局序列比對(global sequence alignment))可使用CLUSTALW電腦程式(Thompson et al., Nucleic Acids Research, 1994, 2(22): 4673-4680)來測定，該電腦程式是以Higgins等人的計算法(Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 1992, 8(2): 189-191)為基礎。在序列比對時，測試序列以及目標序列均為DNA序列。該全局序列比對的結果是以同一性百分比來表示。可用於DNA序列之CLUSTALW比對中以藉由成對比對來計算同一性百分比的參數為：矩陣=IUB、k-元組 = 1、頂對角數目 = 5、空位罰分 = 3、空位開放罰分 = 10、空位延伸罰分 = 0.1。關於多重比對，可使用下列CLUSTALW參數：空位開放罰分 = 10、空位延伸罰分 = 0.05；空位分離罰分範圍 = 8；比對延遲的同一性% = 40

【0037】 核酸可存在於整個細胞中、在細胞溶解物中，或呈部分純化或實質上純的形式。當從在天然環境中與核酸相結合之其他細胞組分被純化出來時，核酸是”經單離”或”使之成為實質上純的”。為了要分離核酸，可使用諸如下列的標準技術：鹼/SDS處理、CsCl帶、管柱層析、瓊脂糖凝膠電泳以及技藝中熟知的其他技術。

對抗活化蛋白C的單株抗體

【0038】 已知aPC的抗凝血特性。在血友病中恆定不受控制或在傷口止血暫時喪失的創傷患者中的出血性病症可藉由aPC抑制劑而被治療。抗體、其抗原-結合片段以及其他aPC特異性蛋白質骨架可用於提供靶定特異性來抑制aPC蛋白質的子集發揮作用，同時保留餘者。若在血漿中aPC濃度(<4 ng/ml)對PC(4 ug/ml)差異為至少1000倍，則任一種潛在aPC抑制劑療法的特異性增加有助於阻斷aPC在高循環過量PC存在下發揮作用。

【0039】 阻斷aPC之抗凝血功能的aPC特異性抗體可作為治療劑供患有出血性病症的患者使用，出血性病症包括(例如)血友病、帶有抑制劑的血友病患者、創傷引起的凝血障礙、在藉由aPC治療敗血症期間嚴重出血的患者、因為非急需手術(諸如移植)引起的出血、心臟外科手術、整形外科手術，或經血過多的過度出血。

【0040】 具有長循環半衰期的抗-aPC抗體可用於治療像是血友病的慢性疾病。具有半衰期較短的aPC抗體片段或aPC-結合蛋白質骨架可能對於急性用途(例如在創傷中的治療用途)更為有效。因為aPC是一種多功能蛋白質，包括抗體、抗原-結合抗體片段、aPC-特異性蛋白質骨架之親和性與靶定特異性增加的選擇性aPC功能阻斷劑(SAFB)可選擇性地僅只阻斷aPC功能而不會影響其他aPC功能。

【0041】 藉由淘選以及篩選對抗人類aPC的人類抗體庫來鑑別aPC-結合抗體。經鑑別的抗體表現出不結合或最低結合至人類PC。對各單株抗體的重鏈可變區以及輕鏈可變區進行定序並鑑別其CDR區。對應於aPC-特異性單株抗體每一者的重鏈區與輕鏈區之序列識別號("SEQ ID NO:")歸納於表1中。

表1. 人類抗-aPC抗體

純系	輕鏈可變區	SEQ ID	重鏈可變區	SEQ ID
C7A23	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSGSSSNIGNNYVSWYQQ LPGTAPKLLIYRNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCQSYDSDLS GPYVLFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 4	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFGNHWMTWVR QAPGKGLEWVSGVSWNGSR THYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ALTGRSGWMRFPNWFDPW GQGTLVTVTS	SEQ ID NO: 14
C7I7	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCTGSSSNIGAGYDVHWY QQLPGTAPKLLIYGN SNRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEAAYYCSSYVGS DLVVFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 5	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFGNHWMTWVR QAPGKGLEWVSGVSWNGSR THYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ALTGRSGWMRFPNWFDPW	SEQ ID NO: 15

			GQGTLTVTS	
O3E7	QSVLTQPPSTSGTPGQRVTI SCTGSSSNIGAGFDVHWY QQLPGTAPKLLIYGNSNRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCATWQD TLTGWMFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 6	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYSMWNVRQ APGKGLEWVSAISGSGGTY YADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRRVIRGIYDAFDMWGQGTL VTVTS	SEQ ID NO: 16
C22J13	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSGSDSNIGSNAVNWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCSSYTSSN TVVFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 7	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSNYMSWVRQ APGKGLEWVAVISYDGNSNK YYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAMYYCA LTGRSGWMRFPNWFDPWG QGTLTVTS	SEQ ID NO: 17
C25K23	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCTGSSNIGAAYDVHWY QQLPGTAPKLLIYGNNKRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCQSYDSS LSGSVFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 8	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYWMWSWVRQ APGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA LTGRSGWMRFPNWFDPWG QGTLTVTS	SEQ ID NO: 18
C26B9	QSVLTQPPSASGTPGQRVTI SCSGSSNIRSNTVNWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCQSYDSSL GDVVFGGGTKLTVLG	SEQ ID NO: 9	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSSYGMHWVRQ APGKGLEWVSVIYSGGSTYY ADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCARM GRAFDIWGQGTLTVTS	SEQ ID NO: 19
R41C17	LTQPPSASGTPGQRVTISCT GSSSNIGAGYVVHWYQQL PGTAPKLLIYRNNHRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDSSLN GRVFGGGTKLTVLGQPKA APSRTLFP	SEQ ID NO: 10	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSNYAMSWVRQ SPGKGLEWVAVISYDGREKY YSDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRGRTFDYWQGQGTLTVTS ASTKGPSVF	SEQ ID NO: 20
R41E3	LTQPPSASGTPGQRVTISCS GSSSNIGNNAVNWYQQLP GTAPKLLIYSNNQRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCSSYTSSSTHV VFGGGTKLTVLGQPKAAPS	SEQ ID NO: 11	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFNNYAMTWVRQ APGKGLEWVSGVSWNGSRT HYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RADSSAGRWAGSLDYWGQ	SEQ ID NO: 21

	VTL		GTLVTVTSASTKGPSVF	
T46J23	LTQPPSASGTPGQRVTISCT GTSSNIGAGYDVHWYQQL PGTAPKLLIYDNNNRPSGV PDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLN GVVFGGGTKLTVLGQPKA APS VTLFP	SEQ ID NO: 12	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFGNHWMWTWVR QAPGKGLEWVSGVSWNGSR THYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ALTGRSGWMRFPNWFDPW GQGTLVTVTSASTKGPSVF	SEQ ID NO: 22
T46P19	LTQPPSASGTPGQRVTISCT GSSSNIGAGYDVHWYQQL PGTAPKLLIYGNINRPSGVP DRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYYCSSYTRSATLV FGGGTKLTVLGQPKAAPSV TLFP	SEQ ID NO: 13	EVQLLESGGGLVQPGGSLRL SCAASGFTFSGYGMHWVRQ APGKGLEWVSGINWNGGST GYADSVKGRFTISRDNSKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCA RN RATRSGYYYFDSWGQGT LVTVTSASTKGPSVF	SEQ ID NO: 23

【0042】 在一個具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C (aPC)並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有選自由SEQ ID NO : 14-23組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區。

【0043】 在另一個具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C (aPC)並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有選自由SEQ ID NO : 4-13組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0044】 在另一個具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C (aPC)並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有選自由SEQ ID NO : 14-23組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區，以及具有選自由SEQ ID NO : 4-13組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0045】 在其他具體例中，該抗體包含重鏈可變區以及輕鏈可變區，該重鏈可變區以及輕鏈可變區含有

(a) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 14的胺基酸序列而輕鏈可

變區含有SEQ ID NO : 4的胺基酸序列；

- (b) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 15的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 5的胺基酸序列；
- (c) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 16的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 6的胺基酸序列；
- (d) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 17的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 7的胺基酸序列；
- (e) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 18的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 8的胺基酸序列；
- (f) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 19的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 9的胺基酸序列；
- (g) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 20的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 10的胺基酸序列；
- (h) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 21的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 11的胺基酸序列；
- (i) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 22的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 12的胺基酸序列；以及
- (j) 重鏈可變區含有SEQ ID NO : 23的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO : 13的胺基酸序列。

【0046】 表2中所示為結合至人類aPC之單株抗體的每一重鏈與輕鏈的CDR區("CDR1"、"CDR2"以及"CDR3")的SEQ ID NO歸納。

表2. 人類抗-aPC抗體之CDR區的序列識別碼

純系	輕鏈可變區			重鏈可變區		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
C7A23	44	54	64	74	84	94
C7I7	45	55	65	75	85	95

O3E7	46	56	66	76	86	96
C22J13	47	57	67	77	87	97
C25K23	48	58	68	78	88	98
C26B9	49	59	69	79	89	99
R41C17	50	60	70	80	90	100
R41E3	51	61	71	81	91	101
T46J23	52	62	72	82	92	102
T46P19	53	63	73	83	93	103

【0047】 在一個具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C (aPC)的經單離單株抗體，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO : 94-103組成之群的胺基酸序列的CDR3。此等CDR3是在淘選以及篩選期間由抗體的重鏈鑑別而來。在又一個具體例中，此抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO : 74-83組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO : 84-93組成之群的胺基酸序列的CDR2，或(c)含有選自由SEQ ID NO : 74-83組成之群的胺基酸序列的CDR1以及含有選自由SEQ ID NO : 84-93組成之群的胺基酸序列的CDR2兩者。

【0048】 在另一個具體例中，提供共有在淘選以及篩選期間由抗體的輕鏈之一者鑑別而來的CDR3的抗體。因此，亦提供一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO : 64-73組成之群的胺基酸序列的CDR3。在又一個具體例中，此抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO : 44-53組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO : 54-63組成之群的胺基酸序列的CDR2，或(c)含有選自由SEQ ID NO : 44-53組成之群的胺基酸序列的CDR1以及含有選自由SEQ ID NO : 54-63組成之群的胺基酸序列的CDR2兩者。

【0049】 在另一個具體例中，該抗體含有從篩選以及淘選鑑別而來之抗體的重鏈與輕鏈之CDR3。提供一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至

活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：94-103組成之群的胺基酸序列的CDR3，以及含有選自由SEQ ID NO：64-73組成之群的胺基酸序列的CDR3。在又一個具體例中，此抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO：74-83組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO：84-93組成之群的胺基酸序列的CDR2、(c)含有選自由SEQ ID NO：44-53組成之群的胺基酸序列的CDR1，及/或(d)含有選自由SEQ ID NO：54-63組成之群的胺基酸序列的CDR2。

【0050】 在一些具體例中，該抗體包含重鏈可變區以及輕鏈可變區，該重鏈可變區以及輕鏈可變區含有

- (a) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：44、54與64的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：74、84與94的胺基酸序列；
- (b) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：45、55與65的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：75、85與95的胺基酸序列；
- (c) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：46、56與66的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：76、86與96的胺基酸序列；
- (d) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：47、57與67的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：77、87與97的胺基酸序列；
- (e) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：48、58與68的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：78、88與98的胺基酸序列；
- (f) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：49、59與69的胺基酸

序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：79、89與99的胺基酸序列；

- (g) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：50、60與70的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：80、90與100的胺基酸序列；
- (h) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：51、61與71的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：81、91與101的胺基酸序列；
- (i) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：52、62與72的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：82、92與102的胺基酸序列；以及
- (j) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：53、63與73的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：83、93與103的胺基酸序列。

【0051】亦提供一種結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有與選自由SEQ ID NO：4-13中所示胺基酸序列組成之群的胺基酸序列至少89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的胺基酸序列。

【0052】亦提供一種結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有與選自由SEQ ID NO：14-23中所示胺基酸序列組成之群的胺基酸序列至少89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的胺基酸序列。

【0053】該抗體可具有物種特異性或與多種物種交叉反應。在一些具體例中，該抗體可與人類、小鼠、大鼠、兔、天竺鼠、猴、豬、狗、貓或

其他哺乳動物物種的aPC特異地反應或交叉反應。

【0054】 該抗體可為抗體不同類型的任一種，諸如(但不限於) IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌型IgA、IgD，以及IgE抗體。

【0055】 在一個具體例中，提供一種針對人類活化蛋白C的經單離完全人類單株抗體。

抗-aPC抗體的最佳化變體

【0056】 在一些具體例中，經淘選以及篩選的抗體可經最佳化，例如增加對aPC的親和力、進一步降低對PC的任何親和力、增進對不同物種的交叉反應性，或增加aPC的阻斷活性。這樣的的最佳化可以例如藉由使用抗體之CDR或與CDR相近之胺基酸殘基(亦即與CDR相鄰約3或4個殘基)的定點飽和突變來進行。

【0057】 亦提供對aPC親和力增加或親和力高的單株抗體。在一些具體例中，該抗-aPC抗體具有至少約 $10^7 M^{-1}$ 的結合親和力，在一些具體例中至少約 $10^8 M^{-1}$ 、在一些具體例中至少約 $10^9 M^{-1}$ 、 $10^{10} M^{-1}$ 、 $10^{11} M^{-1}$ 或更高，例如至高 $10^{13} M^{-1}$ 或更高。

【0058】 在一些具體例中，可引入其他胺基酸修飾以降低與生殖系序列的差異。在其他具體例中，可引入胺基酸修飾以促使供大規模生產製程用的抗體生產。

【0059】 在一些具體例中，提供特異地結合至人類活化蛋白C的經單離抗-aPC單株抗體，該等抗體包含一或多個胺基酸修飾，在一些具體例中，該抗體包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20或更多個修飾。

【0060】 因此，在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含含有SEQ ID NO：8中所示胺基酸序列的輕鏈，其中該胺基酸序列含有一或多個胺基酸修飾。在一些具體例中，該輕鏈的修飾為置換、插入或刪除。在一些具體例中，該等修飾位在輕鏈的

CDR中。在其他具體例中，該等修飾位在輕鏈的CDR以外。

【0061】 在一些具體例中，SEQ ID NO：8的輕鏈修飾是在選自以下位置處：G52、N53、N54、R56、P57、S58、Q91、Y93、S95、S96、L97、S98、G99、S100以及V101。修飾可以是例如下列置換之一者：G52S、G52Y、G52H、G52F、N53G、N54K、N54R、R56K、P57G、P57W、P57N、S58V、S58F、S58R、Q91R、Q91G、Y93W、S95F、S95Y、S95G、S95W、S95E、S96G、S96A、S96Y、S96W、S96R、L97M、L97G、L97R、L97V、S98L、S98W、S98V、S98R、G99A、G99E、S100A、S100V、V101Y、V101L或V101E。另外，在一些具體例中，該抗體可包含兩個或更多個來自下列的置換：G52S、G52Y、G52H、G52F、N53G、N54K、N54R、R56K、P57G、P57W、P57N、S58V、S58F、S58R、Q91R、Q91G、Y93W、S95F、S95Y、S95G、S95W、S95E、S96G、S96A、S96Y、S96W、S96R、L97M、L97G、L97R、L97V、S98L、S98W、S98V、S98R、G99A、G99E、S100A、S100V、V101Y、V101L或V101E。

【0062】 在一些具體例中，SEQ ID NO：8的輕鏈進一步包含在選自下列的一或多個位置處的修飾：A10、T13、S78、R81以及S82。在一些具體例中，在輕鏈位置A10處的修飾為A10V。在一些具體例中，在輕鏈位置T13處的修飾為T13A。在一些具體例中，在輕鏈位置S78處的修飾為S78T。在一些具體例中，在輕鏈位置R81處的修飾為R81Q。在一些具體例中，在輕鏈位置S82處的修飾為S82A。在一些具體例中，SEQ ID NO：8的輕鏈包含下列修飾的兩者或更多者：A10V、T13A、S78T、R81Q以及S82A。在一些具體例中，SEQ ID NO：8的輕鏈包含所有修飾A10V、T13A、S78T、R81Q以及S82A。

【0063】 在其他具體例中，提供特異地結合至人類活化形式之蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：18中所示胺基酸序列的重鏈，其中該胺基酸序列含有一或多個胺基酸修飾。在一些具體例中，

該輕鏈的修飾為置換、插入或刪除。

【0064】 在一些具體例中，SEQ ID NO : 18的重鏈進一步包含在位置N54或S56處的修飾。在一些具體例中，在重鏈位置N54處的修飾為N54G、N54Q或N54A。在一些具體例中，在重鏈位置S56處的修飾為S56A或S56G。

【0065】 在一些具體例中，進行胺基酸修飾以促使供大規模生產製程用的抗體生產。舉例而言，在一些具體例中，可針對改進生物物理特性(例如最低聚集/黏性)而進行修飾，以降低抗體的疏水性表面區域。在一些具體例中，可在SEQ ID NO : 8的輕鏈中進行額外修飾。在一些具體例中，SEQ ID NO : 8的輕鏈的修飾在位置Y33處。在一些具體例中，輕鏈中的修飾與Y33為Y33A、Y33K或Y33D。在一些具體例中，在SEQ ID NO : 18的重鏈中進行額外修飾。在一些具體例中，SEQ ID NO : 18的重鏈的修飾在位置Y32、W33、W53或W110的一或者處。在一些具體例中，SEQ ID NO : 18的重鏈中的修飾是選自Y32A、Y32K、Y32D、W33A、W33K、W33D、W53A、W53K、W53D、W110A、W110K，或W110D。

【0066】 在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 108中所示胺基酸序列的輕鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 110中所示胺基酸序列的輕鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 112中所示胺基酸序列的輕鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 114中所示胺基酸序列的輕鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 116中所示胺基酸序列的輕鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO : 118中所示胺基酸序列的輕鏈。

【0067】 在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：109中所示胺基酸序列的重鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：111中所示胺基酸序列的重鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：113中所示胺基酸序列的重鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：115中所示胺基酸序列的重鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：117中所示胺基酸序列的重鏈。在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：119中所示胺基酸序列的重鏈。

【0068】 在一些具體例中，提供一種結合至人類活化蛋白C的經單離單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：12中所示胺基酸序列的輕鏈，其中該胺基酸序列包含一或多個胺基酸修飾。在一些具體例中，輕鏈之修飾為置換、插入或刪除。在一些具體例中，該等修飾位在輕鏈的CDR中。在其他具體例中，該等修飾位在輕鏈的CDR以外。

【0069】 在一些具體例中，SEQ ID NO：12的輕鏈的修飾是選自以下位置處：T25、D52、N53、N54、N55、D95、N98或G99。修飾可以是例如下列置換中的一者：T25S、D52Y、D52F、D52L、D52G、N53C、N53K、N53G、N54S、N55K、D95G、N98S、G99H、G99L或G99F。另外，在一些具體例中，抗體可含有兩個或更多個來自以下的置換：T25S、D52Y、D52F、D52L、D52G、N53C、N53K、N53G、N54S、N55K、D95G、N98S、G99H、G99L或G99F。

【0070】 在又一個具體例中，提供一種結合至人類活化形式之蛋白C的經單離抗-aPC單株抗體，其中該抗體包含具有SEQ ID NO：22中所示之胺



基酸序列的重鏈，其中該胺基酸序列包含一或多個胺基酸修飾。在一些具體例中，輕鏈的修飾為置換、插入或刪除。

抗原決定基

【0071】亦提供一種結合至人類活化蛋白C之抗原決定基的經單離單株抗體，其中該抗原決定基包含於SEQ ID NO：3中所示人類aPC之重鏈的一或多個殘基。

【0072】在一些具體例中，該抗原決定基可包括人類aPC的活性位點。在一些具體例中，該活性位點可包含人類aPC的胺基酸殘基S195。

【0073】在一些具體例中，該抗原決定基可包含SEQ ID NO：3中所示人類活化蛋白C之選自以下的一或多個殘基：D60、K96、S97、T98、T99、E170、V171、M172、S173、M175、A190、S195、W215、G216、E217、G218，以及G218。

【0074】亦提供可與本文所述抗體中任一者競爭結合至人類活化蛋白C的抗體。舉例而言，這樣的一個競爭抗體可結合至上述的一或多個抗原決定基。

核酸、載體以及宿主細胞

【0075】亦提供編碼上述單株抗體中任一者之經單離核酸分子。

【0076】因此，提供一種編碼結合至人類活化蛋白C之抗體的經單離核酸分子。

【0077】在一些具體例中，提供編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：34-43組成之群的核酸序列的重鏈可變區。

【0078】在一些具體例中，提供編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：24-33組成之群的核酸序列的輕鏈可變區。

【0079】在一些具體例中，提供編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血

活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO : 14-23組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區。

【0080】 在一些具體例中，提供編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO : 4-13組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。

【0081】 在另一個具體例中，提供編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO : 14-23組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區或含有選自由SEQ ID NO : 4-13組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區，以及一或多個在重鏈可變區或輕鏈可變區中的胺基酸修飾。

【0082】 另外，亦提供包含編碼上述單株抗體中任一者之經單離核酸分子的載體以及包含此等載體的宿主細胞。

製備針對aPC之抗體的方法

【0083】 可藉由在宿主細胞中表現編碼具體例中之一者的單株抗體的可變區的核苷酸序列以重組方式製造單株抗體。借助表現載體，含有該核苷酸序列的核酸可在適於生產的宿主細胞中被轉染並表現。因此，亦提供一種用以生產與人類aPC結合之單株抗體的方法，其包含：

- (a) 將編碼單株抗體的核酸分子轉染至宿主細胞中，
- (b) 培養宿主細胞以在宿主細胞中表現該單株抗體，並視情況分離且純化所生產的單株抗體，其中該核酸分子包含編碼該單株抗體的核苷酸序列。

【0084】 在一個實例中，為了要表現該等抗體或其抗體片段，將藉由標準分子生物學技術所得之編碼部分或全長輕鏈與重鏈的DNA插入表現載體中，以使得基因以操作性地連結至轉錄與轉譯控制序列。在本文中，“術語”操作性地連結”意欲表示抗體基因接合至一個載體中，以使得載體中的轉錄與轉譯控制序列用以提供其調節抗體基因之轉錄與轉譯的功能。選擇與



所用表現宿主細胞相容的表現載體以及表現控制序列。抗體輕鏈基因以及抗體重鏈基因被插入個別載體中，或更典型地兩個基因被插入至相同載體中。藉由標準方法(例如抗體基因片段以及載體上的互補限制位點的接合，以及若不存在限制位點時為鈍端接合)將抗體基因插入表現載體中。本文所述抗體的輕鏈與重鏈可變區可藉由將其插入已編碼所述同型之重鏈恆定區與輕鏈恆定區的表現載體中而用以產生任一種抗體同型的全長抗體基因，以使得 V_H 節段在載體中操作性地連結至 C_H 節段而 V_L 節段在載體中操作性地連結至 C_L 節段。此外或另外，重組型表現載體可編碼有助於抗體鏈從宿主細胞分泌而出的訊號肽。抗體鏈基因可被選殖至載體中，以使得訊號肽以在框架內的方式連結至抗體鏈基因的胺基端。訊號肽可以是免疫球蛋白訊號肽或異源性訊號肽(亦即非免疫球蛋白蛋白質的訊號肽)。

【0085】 除了編碼抗體鏈的基因以外，重組型表現載體帶有在宿主細胞中控制抗體鏈基因表現的調節序列。術語”調節序列”意欲包括啟動子、增強子以及其他控制抗體鏈基因轉錄或轉譯的表現控制要素(例如聚腺苷酸化訊號)。此等控制序列描述於(例如) Goeddel; Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)中。習於技藝者將能理解，表現載體的設計(包括挑選調節序列)可視如要被轉形的宿主細胞選擇、所需蛋白質表現程度等的因素而定。用於哺乳動物宿主細胞表現之調節序列的實例包括在哺乳動物細胞中指揮高蛋白質表現量的病毒要素，諸如衍生自巨大細胞病毒(CMV)、猴病毒40 (SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要後期啟動子(AdMLP))以及多瘤病毒的啟動子及/或增強子。另外，可使用非病毒調節序列，諸如泛素啟動子或 β -球蛋白啟動子。

【0086】 除了抗體鏈基因以及調節序列以外，重組型表現載體可帶有其他序列，諸如調節載體在宿主細胞中複製的序列(例如複製源點)以及可篩選標記基因。可篩選標記基因有助於篩選載體已被引入的宿主細胞(參見，例如美國專利第4,399,216號、第4,634,665號與第5,179,017號，全部是依據

Axel等人)。舉例而言，可篩選標記基因通常賦予已被引入載體之宿主細胞對藥物(諸如G418、潮徽素或甲氨蝶呤)的抗性。可篩選標記基因的實例包括二氫葉酸還原酶(DHFR)基因(用於帶有甲氨蝶呤篩選/擴增的dhfr-宿主細胞)以及neo基因(用於G418篩選)。

【0087】 關於表現輕鏈以及重鏈，將編碼重鏈與輕鏈的表現載體藉由標準技術轉染至宿主細胞中。術語”轉染”的各種形式意欲涵括廣泛不同之將外源性DNA引入原核或真核宿主細胞的常用技術，例如電穿孔、磷酸鈣沉澱、DEAE-葡萄聚糖轉染以及類似技術。儘管在理論上可以在原核或真核宿主細胞中表現抗體，在真核細胞(哺乳哺乳動物宿主細胞)中表現抗體較具有代表性，因為該等真核細胞(且尤其是哺乳動物細胞)比原核細胞更能組裝並分泌經正確組裝以及在免疫上具有活性的抗體。

【0088】 用以表現重組型抗體之哺乳動物宿主細胞的實例包括中國倉鼠卵巢(CHO細胞)(包括dhfr-CHO細胞，在Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220中所述，使用DHFR可篩選標記，例如R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621中所述)、NSO骨髓瘤細胞、COS細胞、HKB11細胞以及SP2細胞。當編碼抗體基因的重組型表現載體被引入哺乳動物宿主細胞中時，藉由將宿主細胞培養一段足以允許抗體在宿主細胞中表現或將抗體分泌至宿主細胞所生長之培養基中的時間來生產抗體。可使用標準蛋白質純化方法由培養基中回收抗體，諸如超過濾、尺寸排除層析、離子交換層析以及離心。

部分抗體序列表現完整抗體的用途

【0089】 抗體大多數透過位在六個重鏈與輕鏈CDR中的胺基酸殘基與目標抗原交互作用。因此，CDR中的胺基酸序列在個別抗體之間比在CDR以外序列還要更為多樣化。因為CDR序列是大多數抗體-抗原交互作用的主要因，其可以表現模擬特定天然抗體特性的重組型抗體，這是藉由建構包括嫁接至具有不同特性之不同抗體的框架序列上之特異性天然抗體的CDR的

表現載體(參見，例如Riechmann, L. et al., 1998, Nature 332:323-327; Jones, P. et al., 1986, Nature 321:522-525; and Queen, C. et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033)。此等框架序列可以由包括生殖系抗體基因序列的公共DNA資料庫獲得。因為此等生殖系序列不包括組裝完全的可變基因(其為藉由V(D)J接合在B細胞成熟期間形成)，所以它們不同於成熟抗體基因序列。不需要獲得特定抗體的完整DNA序列來重新製造具有與原有抗體相似的結合特性的完整重組型抗體(參見WO 99/45962)。橫跨CDR區的部分重鏈與輕鏈抗體就這個目的來說通常已足夠。部分序列被用來決定促成重組抗體可變基因的生殖系可變以及接合基因節段。接著，生殖系序列被用來填入可變區的漏失部分。重鏈與輕鏈引導序列在蛋白質成熟期間被切割且不是最終抗體特性的主因。為此，需要使用對應生殖系引導序列以供表現建構體之用。為了添加漏失序列，將經選殖的cDNA序列與合成寡核苷酸藉由接合或PCR擴增來合併。或者，可將整個可變區如一組短、重疊寡核苷酸般合成並藉由PCR擴增來合併，以產生一個完全合成可變區純系。這個程序有諸如排除或納入或特定限制位點，或者是特定密碼子最佳化的某些優勢。

【0090】 重鏈以及輕鏈轉錄本的核苷酸序列被用來設計合成寡核苷酸的重疊組，以產生帶有如同天然序列之相等胺基酸編碼能力的合成V序列。合成重鏈與輕鏈序列可能不同於天然序列。舉例而言，重複核苷酸鹼基串被打斷以促使寡核苷酸合成以及PCR擴增；最佳化轉譯起始位點是依據柯薩克規則併入(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)；而限制位點在轉譯起始位點的上游或下游處被工程化。

【0091】 就重鏈以及輕鏈可變區而言，經最佳化編碼，以及對應非編碼股序列在對應非編碼寡核苷酸的約中點處瓦解成30-50個核苷酸節段。因此，就各鏈而言，寡核苷酸可以組裝成重疊的雙股組，其橫跨150-400個核苷酸的節段。將該等群用作為製造PCR擴增產物(150-400個核苷酸)的模板。通常單一個可變區寡核苷酸組可瓦解成兩群被個別擴增以產生兩種重疊

PCR產物。此等重疊產物接而是藉由PCR擴增被合併，以形成完整的可變區。在PCR擴增時納入重鏈或輕鏈恆定區的重疊片段以產生可輕易選殖至表現載體建構體中的片段也是樂見的。

【0092】 經再建構的重鏈與輕鏈可變區接著與經選殖的啟動子、轉譯起始、恆定區、3'未轉譯、聚腺苷酸化與轉錄終止序列合併以形成表現載體建構體。重鏈與輕鏈表現建構體可併入單一個載體內、共轉染、依序轉染或個別轉染至宿主細胞中，接著被融合以形成表現兩種鏈的宿主細胞。

【0093】 因此，在另一種態樣中，人類抗-aPC抗體的結構特徵被用來生成在結構上相關之人類抗-aPC抗體，其保有結合至aPC的功能。更具體而言，單株抗體之經特定鑑別之重鏈與輕鏈區的一或多個CDR可以重組方式與已知人類框架區以及CDR合併以生成其他經重組工程化的人類抗-aPC抗體。

醫藥組成物

【0094】 亦提供一種醫藥組成物，其包含治療有效量的抗-aPC抗體以及醫藥上可接受的載劑。”醫藥上可接受的載劑”是一種可被添加至活性成分中以協助調配或穩定製品且不會引起對患者明顯不良之毒性效用的物質。此等載劑的實例為習於技藝者所熟知且包括水、糖(諸如麥芽糖或蔗糖)、白蛋白、鹽(諸如氯化鈉)等。其他載劑描述於例如E. W. Martin的Remington's Pharmaceutical Sciences中。此等組成物將包含治療有效量的至少一種抗-TFPI單株抗體。

【0095】 醫藥上可接受的載劑包括無菌水溶液或懸浮液以及無菌粉末供即備無菌注射溶液或懸浮液用。針對醫藥活性物質使用的此等介質以及試劑為技藝中熟知的。組成物在一些具體例中被置備成非經腸注射。組成物可以調配成溶液、微乳液、脂質體，或其他適於高藥物濃度的有序結構。載劑可以是溶劑或分散介質，其含有(例如)水、乙醇、多元醇(例如甘

油、丙二醇以及液體乙二醇，與類似物)，及其適當的混合物。在一些情況下，其在組成物中包括等滲劑，例如糖、聚醇(諸如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化鈉。

【0096】 無菌注射溶液可藉由將活性化合物在適當溶劑中以需要量與上列一種成分或成分組合(若需要的話)合併，接著為滅菌微過濾而製備。一般而言，分散液是藉由將活性化合物併入含有鹼性分散介質以及上列彼等之所需其他成分的無菌媒劑中而製備。在用以製備無菌注射溶液之無菌粉末的情況下，一些製備方法為真空乾燥以及冷凍乾燥(凍乾)，其生成活性成分加上任一種來自其先前經無菌過濾之溶液的其他所需成分的粉末。

醫藥用途

【0097】 該單株抗體可用於治療凝血方面的遺傳性以及後天缺乏症或缺陷的治療用途。舉例而言，在上述具體例中的單株抗體可用以阻斷aPC與其受體(可包括因子Va或因子VIIIa)的交互作用。

【0098】 該等單株抗體在治療諸如血小板減少症、血小板病症以及出血性病症(例如A型血友病、B型血友病以及C型血友病)的止血病症方面具有治療用途。此等病症可藉由對有需要的患者投與治療有效量之抗-aPC單株抗體而被治療。該等單株抗體在諸如創傷與出血性中風的適應症中治療不受控制的出血具有治療用途。因此，亦提供一種用於縮短出血時間的方法，其包含向有需要的患者投與治療有有效量之抗-aPC單株抗體。

【0099】 在另一個具體例中，該抗-aPC抗體可用作為經aPC治療之患者的解毒劑，經aPC治療之患者包括(例如)其中aPC被用於治療敗血症或出血性病症者。

【0100】 該等抗體可用作為單一藥物療法或與其他療法組合以對治止血性病症。舉例而言，一或多種抗體與凝血因子(諸如因子VIIa、因子VIII或因子IX)的共投與咸信可用於治療血友病。在一個具體例中，提供一種用

以治療凝血方面的遺傳性與後天性缺陷症或缺乏的方法，其包含投與(a)第一數量之結合至人類組織因子路徑抑制劑的單株抗體，以及(b)第二數量之因子VIII或因子IX，其中該第一數量以及第二數量合起來有效治療該缺陷症或缺乏。在另一個具體例中，提供一種用以治療凝血方面的遺傳性與後天性缺陷症或缺乏的方法，其包含投與(a)第一數量之結合至人類組織因子路徑抑制劑的單株抗體，以及(b)第二數量之因子VIII或因子IX，其中該第一數量以及第二數量合起來有效治療該缺陷症或缺乏，且另外其中因子VII不是被共投與。亦包括一種醫藥組成物，其包含治療有效量的單株抗體以及因子VIII或因子IX的組合，其中該組成物不含有因子VII。”因子VII”包括因子VII以及因子VIIa。此等組合療法可以降低凝血因子的必須輸注頻率。共投與或組合療法表示投與兩種各自分別調配或調配在一個組成物中的治療藥物，且當分別調配時，在大致相同時間或在不同時間投與，但是在相同的治療期間內。

【0101】 在一些具體例中，本文所述一或多個抗體可以組合方式來使用以對治止血病症。舉例而言，共投與兩種或更多種本文所述抗體咸信可用於治療血友病或其他止血病症。

【0102】 該等醫藥組成物可以某個劑量與頻率非經腸投與給罹患A型血友病或B型血友病的個體，劑量與頻率可隨著出血事件的嚴重性而改變，或在預防性療法的情況下，可隨著患者的凝血缺陷症的嚴重性而改變。

【0103】 組成物可如同快速輸注或藉由連續輸注被投與給患者。舉例而言，快速輸注投與呈Fab片段的本發明抗體可以呈0.0025至100 mg/kg體重、0.025至0.25 mg/kg體重、0.010至0.10 mg/kg體重或0.10-0.50 mg/kg體重的數量。就連續輸注而言，可投與呈Fab片段之本發明抗體呈0.001至100 mg/kg體重/分、0.0125至1.25 mg/kg/min、0.010至0.75 mg/kg/min、0.010至1.0 mg/kg/min，或0.10-0.50 mg/kg/min歷時1-24小時、1-12小時、2-12小時、6-12小時、2-8小時或1-2小時期間。就投與呈全長抗體(具有完整恆定區)之本發

明抗體而言，劑量數可以是約1-10 mg/kg體重、2-8 mg/kg體重或5-6 mg/kg體重。該等全長抗體通常可藉由輸注而被投與延長達三十分鐘至三小時的期間。投與頻率將視病況嚴重性而定。頻率可以是每週三次至每兩週至六個月一次。

【0104】 此外，該等組成物可經由皮下注射投與給患者。例如劑量為10至100 mg的抗-aPC抗體可經由每週、每兩週或每月的皮下注射投與給患者。

【0105】 如本文所用，”治療有效量”表示在活體內有效增加凝血時間或在活體內以其他方式使得有需要的患者產生可測得益處的抗-aPC單株抗體或抗體以及因子VIII或因子IX的組合的數量。確切數量將視許多因子而定，包括(但不限於)治療組成物的組份以及物理性質、所要的患者族群、個別患者考量因素以及類似因素，且可由習於技藝者所溶液決定。

習於技藝者將能理解下述圖式僅供說明之用。該等圖式不意欲在任何方面限制本教示內容的範疇。

【圖式簡單說明】

第1圖顯示人類活化蛋白C呈其成熟雜二聚體形式的漫畫圖。

第2圖顯示重鏈以及輕鏈CDR之胺基酸序列比對被顯示由人類Fab抗體庫所鑑別出的10個抗-aPC Fab。

第3圖說明藉由直接ELISA特徵鑑定抗-APC Fab的圖式。ELISA盤以每孔100 ng塗覆人類PC (hPC)、人類aPC (hAPC)、狗aPC (dAPC)、小鼠aPC (mAPC)。在X軸上標出的經純化Fab以20 nM (1 ug/ml)被添加至盤。藉由二級抗體(抗-人類Fab-HRP)，繼而為HRP受質AmplexRed來偵測結合的Fab。除了Fab R41C17以外，經純化Fab優先結合至人類aPC，顯示少許至沒有結合人類PC。某一個Fab T46J23亦顯示若干結合至小鼠aPC。

第4圖顯示依據ELISA之抗-PC Fab的結合選擇性。

第5圖說明顯示依據aPTT藉由在人類aPC中跟蹤標定而以劑量依賴的方式抑制正常人類血漿血塊形成的圖式。50%集中的人類正常血漿在52秒內形成血塊。呈100、200、400、800或1600 ng/ml的人類aPC與血漿的預培育會以劑量依賴的方式延長凝血時間。觀察到重組型人類aPC (rh-APC)以及血漿衍生人類aPC (pdh-APC)有近乎相同的效力。

第6圖說明顯示在人類正常血漿中抗-aPC Fab抑制人類aPC並且引起血塊形成的圖式。呈400ng/ml的人類aPC將血漿凝血時間從52秒延長至180秒。呈0、0.5、1、2、5、10或20ug/ml的對照抗體(對照)或其Fab (對照-Fab)或選定Fab與aPC的培育會以劑量依賴的方式降低凝血時間(上圖)。亦針對效用更高的三種Fab (R41E3、C22J13、對照-Fab)在40ug/ml下來進行測試。

第7圖顯示在aPTT中抗-aPC Fab抑制狗aPC並且引起血塊形成。

第8圖顯示抗-aPC Fab對於aPC之醯胺分解活性的影響。人類aPC蛋白(20 nM)首先與等體積抗-aPC Fab (1-3000 nM)在室溫下預培育歷時20分鐘，接著將至高1mM的顯色受質SPECTROZYME PCa添加至反應混合物。呈最終濃度為10 nM的人類aPC的醯胺分解活性是在Fab存在下來進行測量。水解速率在Fab存在下受到抑制，達到最多80%的降低。

第9圖顯示抗-aPC Fab對於aPC之因子Va (FVa)不活化活性的影響。

第10圖顯示依據ELISA抗-aPC人類IG1的結合特異性並顯示抗-aPC人類IgG1的物種交叉反應性。ELISA盤以1 ug/ml塗覆人類PC (hPC)、人類aPC (hAPC)、狗aPC、小鼠aPC、兔aPC。經純化IgG (20nM)被添加至盤。藉由二級抗體(抗-人類IgG-HRP)，繼而為HRP受質 AmplexRed來偵測結合的IgG。五個抗-aPC人類IgG1與狗和兔aPC交叉反應而一個IgG1也結合小鼠aPC。

第11圖顯示抗-aPC IgG對於aPC之醯胺分解活性的影響(a)人類、(b)兔、(c)狗，與(d)小鼠。aPC蛋白(20 nM)首先與等體積抗-aPC-hIgG1 (1-1000 nM)在室溫下預培育歷時20分鐘，接著將至高1mM的顯色受質SPECTROZYME

PCa添加至反應混合物。呈最終濃度為10 nM的aPC的醯胺分解活性是在Fab存在下來進行測量。水解速率在IgG存在下受到抑制。使用陰性對照抗體(抗-CTX-hIgG1)。

第12圖顯示在人類血漿凝血分析(aPTT)中抗-aPC-IgG1縮短凝血時間並且引起血塊形成。

第13圖顯示抗-aPC-IgG1對於重度血友病患者血漿的影響。於內皮細胞以及凝血酶調節素存在下，PC被活化成aPC並減少凝血酶生成。不同於對照Ab，抗-aPC-抗體快速地抑制這個新生成的aPC並增加凝血酶生成達5-10x。凝血酶生成提高將在帶有凝血障礙的患者中增進凝血。

第14圖顯示抗-aPC-抗體變體的活性概況。類似於親代抗體C25K23，此等變體(a)以高親和力結合至aPC、(b)在經純化系統中強力抑制aPC活性，以及(c)在人類血漿凝血分析中縮短凝血時間而造成凝血。

第15圖顯示漫畫圖，說明複合體結構再改進成最終 $R_{工作}=0.201$ ， $R_{游離}=0.241$ 。左圖與右圖顯示具有旋轉改變為90°的相同複合體結構。Fab C25K23的HCDR3環與aPC重鏈具有廣泛的交互作用。

第16圖顯示，在左圖中顯示推近觀看Fab C25K23重鏈的CDR3環中殘基Trp104附近的交互作用。其阻斷aPC活性位點(在催化上重要的殘基His57、Asp102，以及Ser195)的可接近性。右圖顯示Fab C25K23以類似於PPACK抑制劑的方式抑制aPC活性，因為Trp104以及PPACK在活性位點處佔據相同區域。

第17圖顯示說明依據ELISA在Fab以及IgG形式中抗-aPC抗體結合或不結合至活性位點經阻斷之aPC的圖式。

【實施方式】

實例

【0106】 本揭示內容的各個態樣可根據下列實例而進一步理解，該等

實例在任何方面均不應被理解為限制本教示內容的範疇。

實例1.材料與方法

篩選人類aPC特異性結合體

【0107】 製備樣盤(Master Plates)：按照淘選策略，使用Qpix2 (Genetix, Boston, MA USA)集落挑選器藉由將1880個純系挑至含有生長培養基(2XYT/1%葡萄糖/100 μ g/ml卡本西林)的384孔盤(ThermoFisher Scientific, Weltham, MA USA)中來生成樣盤。在37°C下伴隨振盪來生長該等盤過夜。

【0108】 生成表現盤：使用Evolution P3液體處理器(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)，將樣盤的5 μ l培養基轉移至含有表現培養基(2XYT/0.1%葡萄糖/100 μ g/ml卡本西林)的384孔盤，並在30°C下培育。當培養物達到OD 600為0.5時，以0.5 mM的最終濃度添加IPTG。接著使盤回到30°C下生長過夜。

【0109】 初次 ELISA：將 Maxisorp 384 孔 盤 (ThermoFisher Scientific, Rochester, NY USA)塗覆呈1 μ g/ml之於DPBS (具有Ca/Mg)中的重組型人類aPC或人類PC (Mol. Innovation)並在4°C下培育過夜。以DPBST (PBS+0.05% TWEEN)洗滌經塗覆ELISA盤三次並以MDPBST (PBS+0.05%TWEEN+5%奶)在室溫下歷時阻斷1小時。抽引經阻斷的盤並將15 μ l表現培養基以及30 μ l MDPBST轉移至各孔。在室溫下培育ELISA盤歷時1小時，接者以DPBST洗滌5次。添加抗-hFab-HRP(Jackson ImmunoResearch, 1:10,000稀釋於DPBST中)至各孔並在室溫下培育歷時1小時。接著以DPBST洗滌盤5次。添加Amplex Red (Invitrogen)受質並在485 nm的激發光與595 nm的放射光下讀取盤。

【0110】 確認ELISA：使用Qpix2集落挑選器，將推測為陽性的純系從樣盤重新排列至含有1 ml生長培養基的96深孔盤(Qiagen)中並在37°C下生長過夜。從樣盤接種表現盤，且當培養物達到OD600為0.5時以0.5 mM最終濃度的IPTG誘導。接著如上概述般對表現培養基進行ELISA。

使用經生物素化aPC的庫篩選(溶液中淘選)

【0111】 進行兩種方法：耗盡PC結合體以及非耗盡總PC與aPC結合體。Dynabeads M280卵白素被偶合至100 nM生物素-TF (組織因子，用於非耗盡)或100 nM生物素-PC (耗盡)並由磁性裝置捕捉。1-7.5x10¹² cfu Fab庫噬菌體(預先經DPBS/3%BSA/0.05% TWEEN20阻斷)與經生物素-TF或生物素-PC偶合的卵白素珠粒在室溫下於旋轉器上一起培育歷時2小時。生物素-TF (非耗盡)或生物素-PC (耗盡)/卵白素珠粒被捕獲並丟棄。所得噬菌體上清液與1 ml DPBS/3%BSA/0.05% TWEEN20/1mM CaCl₂中的100 nM (第一輪)、50 nM (第二輪)或10 nM (第三輪)生物素-aPC在室溫下一起培育歷時2小時或在40 °C下一起培育過夜。100ul的經卵白素偶合的磁性珠粒被添加至噬菌體-aPC溶液並在室溫下培育歷時30分鐘。噬菌體-aPC複合體珠粒被捕捉在磁性裝置上並根據淘選回合數以具有3%BSA或0.05% TWEEN20的DPBS洗滌不同次。以1mg/ml胰蛋白酶洗提經結合的噬菌體並以抑肽酶(aprotinin)中和。經洗提的噬菌體接而被用來感染10 ml以指數生長的大腸桿菌HB101F'並擴增供次一回合篩選之用。亦以CFU滴定(淘選輸出)分析嗜菌體原液。

使用固定化aPC的庫篩選(固相淘選)

【0112】 在4°C下，將Maxi-sorp 96孔盤的五個孔塗覆400 ng/孔於DPBS中的重組型aPC過夜。與在溶液中淘選相同，噬菌體庫經生物素-TF預處理供非耗盡之用或經生物素-PC預處理供耗盡之用。所得噬菌體接著被添加至經aPC塗覆的孔並於室溫下在振盪器上培育歷時1-2小時。未結合噬菌體是根據淘選回合數以具有3%BSA或0.05% TWEEN20的DPBS洗滌不同次。以1 mg/ml胰蛋白酶洗提經結合的噬菌體並以抑肽酶中和。經洗提的噬菌體接而被用來感染10 ml以指數生長的大腸桿菌HB101F'並擴增供次一回合篩選之用。亦以CFU滴定(淘選輸出)分析嗜菌體原液。

經篩選噬菌體群的擴增：經洗提噬菌體原液使用協助者噬菌體M13K07在HB101F'中擴增供第2、3與4回合篩選

【0113】 使用經每一回合篩選洗提的噬菌體感染體積為10 ml之以指數生長的HB101F'並在37°C、50 rpm下培育歷時45分鐘。接著將細菌再懸浮於2x YT培養基中並塗敷在兩個含有100 µg/ml卡本西林、15 µg/ml四環素以及1% 葡萄糖的15 cm瓊脂盤上，接著在30°C下培育過夜。以總計8 ml 2xYT/carb/tet來收集盤的細菌菌苔。

【0114】 將約10 µl細胞再懸浮於10 ml的2xYT/carb/tet中(OD600為約0.1-0.2)並在37°C下培育直到OD600達到0.5-0.7。將 5×10^{10} cfu的M13K07輔助者噬菌體添加至細胞並在37°C下培育歷時45分鐘。經感染細胞接而被再懸浮於15 ml的新鮮2xYT/carb/康那黴素(50 µg/ml)/tet並在30°C下振盪過夜以產生噬菌體。藉由離心收集噬菌體上清液並過濾通過0.45 µm過濾器。900 µl的上清液被用於下一回合的篩選。

【0115】 aPC抗體的DNA定序分析使用標準分子生物學技術製備質體。針對選定抗體純系的DNA定序使用下列引子：

- a) 引子A : 5' GAAACAGCTATGAAATACCTATTGC 3'
- b) 引子B : 5' GCCTGAGCAGTGGAAAGTCC 3'
- c) 引子C : 5' TAGGTATTCATTATGACTGTCTC 3'
- d) 引子D : 5' CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG 3'

自血漿純化蛋白C

【0116】 以帶有包括肝素作為抗凝血劑(Bioreclamation, Inc., Westbury, NY)的20x50ml冷凍原液取得一公升的狗或兔血漿。純化方法是依據Esmon的實驗室所述(12)加以修改。在4C下解凍血漿，並在室溫下於加載至Q-Sepharose管柱供捕獲蛋白C與其他維生素K依賴性蛋白質之前使用0.02M Tris-HCl, pH 7.5、肝素1U/ml最終、苯甲脒HCl 10 mM最終以1:1進行稀釋。

以經緩衝的0.15M NaCl洗滌管柱，並使用經緩衝的0.5M NaCl洗提蛋白C。使用 10mM Ca++ 以及 100U/ml 肝素使洗提液再鈣化並接著加載至 HCP4-Affigel-10親和力管柱上。以含Ca緩衝液洗滌管柱並以含EDTA緩衝液洗提。經純化的PC經透析過夜至PBS緩衝液中，急速冷凍並以0.5ml等分試樣儲存於-80下。純化產率為每一公升狗血漿有1.75mg。經純化PC如藉由 SDS-PAGE以及分析型SEC測定具有98%純度。

Fab表現以及純化

【0117】 關於Fab表現，將5 l sFab大腸桿菌甘油原液接種至1 ml生長培養基(LB，1%葡萄糖，100 g/ml安比西林)中並在37°C下伴隨在250 rpm下振盪使培養物生長過夜。接著將過夜培養物500 l接種至10 ml預溫熱(37°C)誘導培養基(LB，0.1%葡萄糖，100 g/ml安比西林)中並在37°C下以250 rpm生長至OD500 0.6-0.7。將IPTG添加至培養物中達最終濃度為0.5 mM以供Fab表現之用，且在30C下伴隨在250 rpm下振盪使培養物生長過夜。次日，在4°C下以3,000g離心過夜培養物歷時15分鐘而將培養基與細胞分離開來。保留上清液以及丸粒以供Fab純化之用。在上清液以及丸粒中的Fab表現是藉由使用抗-His抗體的西方墨點分析來確認。

【0118】 關於Fab純化，如BioInvent程序所建議使用蛋白A管柱(MabSure)。將上清液濾過0.45um過濾器以移除碎片並於加載至經緩衝液平衡之蛋白A管柱上之前與一小片完全蛋白酶抑制劑(Roche 11873580001)混合。以pH 2-3緩衝液洗提Fab，接著經緩衝液交換至PBS，pH 7.0。為了要從細胞丸粒中將Fab釋放出來，向丸粒添加1 ml溶解緩衝液。在4°C下於搖晃式平台上培育混合物歷時1小時以供溶解，接著在4°C下以3,000 g離心歷時30分鐘。澄清的上清液被轉移至新的管子並加載至蛋白A管柱上。剛製備的溶解緩衝液含有於冷蔗糖溶液(20%蔗糖(w/v)、30 mM TRIS-HCL、1 mM EDTA，pH 8.0)中的1 mg/ml溶菌酶(Sigma L-6876)，2.5 U/ml benzonase

(Sigma E1014) (25 KU/ml，原液1/10.000)以及一小片完全蛋白酶抑制劑(Roche 11873580001)。經純化Fab的純度是藉由SDS-PAGE以及分析型尺寸排除層析(SEC)來確認。亦監控內毒素含量。

PC以及aPC的西方墨點分析

【0119】 在有DTT (還原)或沒有DTT (非還原)的情況下將經純化蛋白質(100ng/道)與4x SDS-PAGE加載染料混合、在95°C下加熱歷時5分鐘，然後加載至4-12% NuPAGE凝膠上。藉由i-Blot (Life technologies, Carlsbad, CA)將蛋白質轉移至硝基纖維素膜。探測步驟是使用SNAP-id (Millipore)來完成。在使用5%奶/PBS阻斷歷時10分鐘後，將膜與不同試劑(例如偵測經生物素化aPC用的卵白素-HRP，偵測狗aPC用的小鼠抗人類PC單株抗體HCP-4以及抗-PC山羊多株抗體)一起培育。探測之後為在室溫下與HRP二級抗體培育歷時10分鐘。在以具有0.1% TWEEN-20的PBS洗滌墨點之後，使用化學發光受質(ECL)(Pierce, Rockford, IL)來偵測HRP的訊號，並暴露於x射線底片上。

【0120】 抗原蛋白(人類PC、人類PC、小鼠APC、狗APC)在4°C下以100ng/100ul/孔於PBS/Ca緩衝液(Life technologies)被塗覆在ELISA盤上過夜。次日，洗滌盤3次並在室溫下以5% PBS/Ca/BSA/Tween20阻斷歷時1小時。將可溶性Fab添加至各孔並在室溫下培育歷時1小時。在添加抗-人類λ-抗體-HRP作為偵測抗體之後，在室溫下培育盤歷時1小時，充分地洗滌然後使用Amplex Red受質依據套組製造商所述來顯影。使用螢光盤讀取儀(SpectraMax 340pc, Molecular Devices, Sunnyvale, CA)來測量訊號(呈RFU)。將標準曲線擬合至四參數模型中，並從該曲線外推未知的數值。

實例2.從庫淘選aPC抗體

【0121】 使用如實例1中所述方法來進行對抗人類活化蛋白C的完全

人類Fab抗體庫的淘選以及篩選。對陽性抗體純系進行DNA定序，產生10個獨特的抗體序列。抗體之重鏈以及輕鏈的比對顯示於第2圖中。在5個Fab (C7I7、C7A23、T46J23、C22J13、C25K23)中發現相同的重鏈CDR3序列。

【0122】 經純化Fab是藉由功能性分析平台來進行特徵鑑定，以評估：a)其結合特異性(aPC對PC)；結合親和力(透過ELISA以及Biacore)以及物種交叉反應性(亦即對不同物種來源之aPC的結合，不同物種來源包括人類、狗及小鼠)。稍後也使用兔aPC；b)其對其他維生素K依賴性凝血因子(例如FIIa、FVIIa、FIXa、FXa)的結合選擇性；c)其在血漿凝血分析aPTT中抑制aPC之抗凝血活性的效力；以及d)其在使用醯胺分解活性分析(針對小肽受質)以及FVa不活化分析(針對蛋白質受質FVa)於緩衝液中對aPC的蛋白酶酵素活性的影響。

實例3. aPC特異性抗體的結合親和力以及交叉物種反應性

【0123】 此等經純化抗-aPC Fab的抗原-結合活性是藉由如第3圖中所示的直接ELISA來測定。抗原被直接塗覆在ELISA盤上。塗覆抗原包括於PBS/Ca緩衝液中呈100ng/孔的人類PC (血漿衍生)、人類aPC (重組型)、狗aPC (血漿衍生)以及小鼠aPC (重組型)。在使用5%奶/PBS阻斷盤之後，以PBS-Tween20洗滌盤，將可溶性Fab (1 ug/ml，20 nM)添加至盤中並在室溫下伴隨著振盪培育歷時1小時。使用抗-人類Fab (λ)抗體-HRP以及Aplex red作為受質來偵測Fab結合。ELISA數據顯示，所有Fab特異地結合至人類aPC 而不是人類PC。某個Fab, R41C17, 對人類PC顯示最低結合。相反地, R41C17 同時結合至人類APC以及人類PC。在第3圖中亦顯示Fab依據ELISA的交叉物種反應性。在8個aPC-特異性結合體中，它們中的4個(C7I7、C7A23、C25K23、T46J23)也顯示與狗aPC的交叉反應性，此外，某個Fab, T46J23，顯示一些結合小鼠aPC。

【0124】 表3中顯示如藉由ELISA測得之抗-aPC抗體對人類aPC以及

狗aPC的EC₅₀。

表3：抗-aPC Fab的ELISA分析

Fab/ EC ₅₀ (nM)	C7A23	C7I7	C22J13	C25K23	C26B9	R41C17	R41E3	T46J23	T46P19
人類 aPC	2.4	6.3	10.6	4.3	10.3	8.6	10.4	6.7	10.3
狗 aPC	6	3.9		8.2				16.6	

【0125】 藉由Biacore測定抗-aPC Fab的親和力並且顯示於表4中。

表4.抗-aPC Fab的ELISA分析

Fab/ KD (nM)	C7A23	C7I7	C22J13	C25K23	C26B9	R41C17	R41E3	T46J23	T46P19
人類 aPC	1.9	1.3	16	2	7.9	4.8	11	4.1	7.2
狗 aPC	1.3	1.3	300	5.2				21	

實例4.抗-aPC Fab的結合選擇性

【0126】 為測定此等fab的結合選擇性，亦藉由ELISA評估其對於酶原人類PC、對凝血酶(FIIa)，以及對活化因子II (FIIa，凝血酶)、因子VII (FVIIa)、因子IX (FIXa)與因子X (FXa)的結合活性。簡言之，ELISA盤被塗覆以人類aPC (呈1 ug/ml)、小鼠PC (呈10ug/ml)、狗PC (呈10 ug/ml)，其他凝血因子(FIIa、FVIIa、FIXa、FXa)(呈5-10 ug/ml)。將呈20 nM (1ug/ml)的抗-aPC Fab添加至孔。藉由二級抗體(抗-人類Fab-HRP)接著是HRP受質AmplexRed 偵測結合的Fab。作為陽性對照，對每一抗原具有特異性的對照抗體被用來證明存在塗覆抗原。

【0127】 如第4圖中所示，至高到濃度為20 nM，Fab沒有一者顯示結合至因子IIa、VIIa、IXa或Xa。也沒有偵測到結合至酶原小鼠PC或狗PC。

實例5.在正常人類血漿中抗-aPC Fab抑制aPC並誘發血塊形成

【0128】 人類aPC是一種強力抗凝血劑，且這個功能可以輕易地藉由如第5圖中所示的血漿凝血分析(aPTT)來證明。在aPTT分析中，50%正常人類集中血漿在將CaCl₂ (起始劑)添加至血漿與磷脂的混合物之後於52秒內形成血塊。呈100、200、400、800或1600 ng/ml的人類aPC與血漿的預培育以劑量依賴的方式延長凝血時間。如第5圖中所示，血漿衍生的aPC以及重組型aPC得到近乎相同的效力。因為就Stago儀器來說，凝血時間的最大設定為240秒，人類aPC在這個功能分析中的抗凝血活性在aPC為800 ng/ml時達到最大。

【0129】 為了評估抗-aPC Fab對抗aPC之凝血活性的潛在抑制性效用，在良好分析範圍內於aPTT分析中使用400 ng/ml aPC(第6圖)。因為投與之aPC的抗凝血活性，血漿凝血時間從52秒延長至180秒。將工具小鼠抗-人類APC抗體(對照)或其Fab (對照Fab)或Fab C7A23在0、0.5、1、2、5、10或20ug/ml下與aPC (亦即Fab超過aPC 1.5x至60x倍過量)以劑量依賴的方式培育會降低凝血時間。Fab C7A23在保留人類aPC的抗凝血活性方面比對照-Fab更為有效4-5倍。相反地，陰性對照Fab (人類Fabλ)對於凝血時間沒有影響。在第6圖中，全長對照抗體(二價)在aPTT分析中比對照Fab(單價)更為有效10倍。這個結果與其在針對aPC結合的直接ELISA中的EC₅₀值[對照(0.56nM)對對照Fab (6.56 nM)]相符(數據未示出)。因此，暗示當抗-aPC Fab轉變成IgG形式時是一個更為強力的分子。aPTT結果暗示，抗-aPC Fab明顯地抑制aPC的抗凝血活性並縮短凝血時間。在血漿凝血分析aPTT中相比於對照-Fab來評估所有的測試Fab (第6圖)。在第6圖的上圖中，非特異性人類Fab被用作為陰性對照，且其一如預期不影響凝血時間。陽性對照(對照以及對照-Fab)以劑量依賴的方式縮短凝血時間。

【0130】 Fab C7A23、C7I7、C25K23、T46J23以及T46P19在5 ug/ml (超過跟蹤標定aPC莫耳過量15倍)下造成人類aPC活性的80-93%抑制並提高血

塊形成。它們明確地比對照-Fab更為強力。相反地，Fab R41E3在相同條件下僅產生30-40%的aPC活性抑制。R41E3在aPTT中的活性弱可能是因為其aPC結合的親和力較弱，如藉由ELISA以及Biacore所測定。R41E3 Fab濃度增加至40ug/ml (超過aPC莫耳過量100倍)如在第6圖下圖中所示的確造成人類aPC的80%抑制。同樣，高劑量(40ug/ml)的C22J13 Fab產生人類aPC的80%抑制。Fab C26B9在這個分析中比對照Fab更為強力。在下圖中，Fab R41C17對aPC活性沒有影響，因為其同時結合PC以及aPC，且在人類血漿中比aPC充裕超過1000倍。這個數據也指出Fab R41C17具有與其他Fab不同的結合抗原決定基。

【0131】 如同物種aPC ELISA數據所指出，4種Fab (C7A23、C7I7、C25K23、T46J23)在奈米莫耳親和力下也結合至狗aPC，此等Fab是藉由使用跟蹤標定至50%集中的人類正常血漿中的狗aPC之aPTT來進行評估，如第7圖中所示。依據aPTT，狗aPC表現與人類aPC相同的抗凝血活性(數據未示出)。狗aPC在300 ng/ml下將凝血時間從47秒增加至117秒。對照抗體或對照-Fab在0、0.5、1、2、5、10或20 ug/ml下與狗aPC一起培育不會影響凝血時間，因為依據ELISA它們不會與狗aPC交叉反應。但是，Fab C7A23明顯地以劑量依賴的方式降低凝血時間並且在5 ug/ml下抑制狗aPC活性至多到80%或在20 ug/ml下達85%。更甚者，C7A23在阻斷人類aPC以及狗aPC方面於aPTT分析中顯示相當的效力。Fab C7A23、C7I7、C25K23明確地以劑量依賴的方式抑制狗aPC活性。在20 ug/ml Fab濃度下，這3種Fab致使aPC有80-90%抑制並縮短凝血時間。依據ELISA以及Biacore，Fab T46J23在高劑量下僅提供40%抑制，與其對狗aPC的結合($KD=22\text{ nM}$)比C7A23、C7I7、C25K23 ($KD=1-5\text{nM}$)更弱相符。相反地，Fab T46P19以及R41E3一如預期在APTT中對狗aPC不具影響，因為依據ELISA它們不會結合至狗-aPC。

實例6.抗-aPC Fab對於aPC之酶活性的影響

【0132】 活化蛋白C為絲胺酸蛋白酶。其催化活性可以藉由兩種方法來測量：a)使用小肽受質的醯胺分解活性分析，以及b)使用生理蛋白質受質FVa的FVa分解分析。

【0133】 人類aPC的醯胺分解活性是藉由在緩衝液中使用aPC的顯色肽受質來進行研究。呈10 nM的經純化aPC蛋白與呈1 mM的顯色受質SPECTROZYME Pca (Lys-Pro-Arg-pNA，MW 773.9 Da)一起培育歷時30分鐘。受質轉換成比色產物(亦即aPC的酶活性)是藉由以動力學的方式每5分鐘讀取OD₄₅₀來進行監控。使用重組型人類aPC來做出標準曲線。為測試抗-aPC Fab對aPC醯胺分解活性的影響(第8圖)，經純化aPC蛋白(20 nM)首先與等體積抗-aPC Fab (1-1000 nM)在室溫下一起預培育歷時20分鐘，然後將顯色受質SPECTROZYME Pca添加至反應混合物中至多達1 mM。人類aPC在最終濃度為10 nM下的醯胺分解活性是在Fab存在下進行測量。於Fab存在下，在最終受質濃度為1 mM時的水解速率受到部分抑制，達到最大為80%的降低。除了R41C17以外，所有Fab以劑量依賴的方式抑制aPC。IC₅₀與在ELISA結合分析中的EC₅₀相關聯，因為高親和力結合體(C7I7、C7A23、T46P19、T46J23、C25K23)在這個分析中顯示比其餘較弱的結合體(R41E3、C22J13、C26B9)有更快的抑制。但是，增加Fab的濃度對於較弱的結合體來說也會產生最大抑制。舉例而言，R41E3在3,000 nM下產生aPC活性的約80%抑制，而高親和力結合體在100 nM下達到相同程度的抑制。因此，大多數結合體與aPC的活性位點交互作用而致使其醯胺分解活性的抑制。有趣的是，對照抗體產生aPC的部分抑制(40%)，並在大於100 nM的濃度下達到高原。當使用濃度增加的R41C17 Fab時沒有觀察到抑制效用。因為其對於人類aPC的結合親和力來說可與依據Biacore之具有KD值為4.8 nM的高親和力結合體相比擬，此等數據指出R41C17具有一個與aPC之酶活性位點遠離的結合抗原決定基。

【0134】 人類aPC的FVa不活化活性可藉由將人類aPC (180 pM)與生

理蛋白質受質FVa (1.25 nM)一起培育，接著添加FXa以及凝血酶原至反應混合物以形成凝血酶原酶複合體來進行測量。添加凝血酶的顯色肽受質來偵測凝血酶的生成(第9圖)。讀出值為凝血酶生成(FIIa/sec)。經純化因子Va (1.25nM)與aPC (180pM)於某個Fab濃度範圍(1-500 nM)存在下一起培育，且在凝血酶原酶/tenase分析中評估FVa活性。

【0135】 關於生物受質FVa，Fab對aPC活性的影響是藉由使用經純化FVa的FXa-以及凝血酶生成分析來測量。在這個分析中，呈0.16 U/ml (1.25 nM)的FVa在分析緩衝液(20 mM TrisHCl、137 nM NaCl、10 ug/ml磷脂、5 mM CaCl₂、1 mg/ml BSA)中於抗體存在或不存在的情況下與aPC 180 pM一起培育。在培育歷時30分鐘後，將25 ul混合物轉移至孔中。然後，在分析緩衝液中將50 ul人類FXa以及凝血酶原添加至孔並在30°C下藉由使用盤讀取儀監控凝血酶媒介受質水解的動力學。作為aPC活性的基線，於不存在添加Fab的情況下，aPC的培育在自0.0022 nM FIIa/sec至0.0015 nM FIIa/sec的讀出值變化。

【0136】 向反應混合物添加Fab會使得aPC媒介的FVa蛋白水解完全抑制並且以劑量依賴的方式使凝血酶生成快速增加。如第9圖中所示，就藉由aPC抑制FVa蛋白水解而言，IC₅₀值落在奈米莫耳範圍內且與所有測試抗體相當。大多數Fab比陽性對照Fab更有效。R41E3因為其對人類aPC的結合較弱而增加較慢。R41C17出乎意料地在這個分析中顯示一些活性。依據aPTT，當使用小肽受質時這個Fab對於aPC的抗凝血活性或對於aPC的醯胺分解活性沒有影響。這些數據指出，R4117結合抗原決定基明顯不同於其他Fab的彼等。

實例7.抗-aPC IgG的表現以及純化

【0137】 藉由將Fv序列選殖至人類IgG1表現載體中，所有10個抗-aPC Fab被轉換成人類IgG1。質體被轉染至HEK293細胞中供暫時表現用。

抗體被分泌至培養基中並且藉由蛋白A管柱予以純化。某個高產量抗體T47J23-hIgG1每200 ml培養物生產10.3 mg。一些抗體每200 ml僅生產1 mg。亦監測外毒素含量(少於0.01 EU/mg)。

【0138】 類似於經純化Fab，所有經純化IgG是藉由功能性分析平台來進行特徵鑑定，以評估：a)其結合特異性以及結合親和力；b)其物種交叉反應性(亦即對不同物種來源之aPC的結合，包括兔aPC)；c)使用醯胺分解活性分析評估其對物種aPC之酶活性的影響；以及d)其在使用人類血漿以及小鼠血漿的血漿凝血分析aPTT中抑制aPC的抗凝血活性的效力。

實例8.抗-aPC IgG的結合特異性以及結合親和力

【0139】 如第10圖中所示，ELISA揭示大多數IgG抗體如同Fab保有其結合特異性，因為它們優先結合至人類aPC勝過人類PC。另一方面，T41C17以及O3E7均結合人類aPC以及人類PC。出乎意料地，T46J23在其Fab轉換成IgG之後得到人類PC結合。依據ELISA的滴定實驗也揭示，一般而言，此等二價IgG1的結合親和力相較於對應單價Fab如表5中所示增加2-50倍。具體而言，低親和力Fab R41E3在Fab-IgG轉換之後結合親和力增加幾乎50倍，其中EC₅₀值為104 nM (Fab)對1.76 nM (IgG)。所有IgG顯示高親和力結合至人類APC，EC50值為低於奈米莫耳以及低奈米莫耳範圍。O3E7-IgG為最弱的IgG，EC50為16.9 nM。

表5.抗-aPC IgG的ELISA分析

EC ₅₀ (nM)	直接 ELISA (aPC 塗覆)			
	人類 aPC	兔 aPC	狗 aPC	小鼠 aPC
C7A23	3.29	7	10.9	
C7I7	2.66	2	2.3	
C22J13	0.49	0.6	2.0	
C25K23	1.25	2	3.4	
C26B9	0.65			

R41C17	0.55			
R41E3	1.76			
T46J23	2.18	7	1.68	4.6
T46P19	0.37			
O3E7	16.9			

【0140】 亦如第10圖中所示，使用(a)人類、(b)兔、(c)狗以及(d)小鼠aPC與PC檢驗這些IgG的物種交叉反應性。在10個抗-人類aPC IgG中，5個IgG以高親和力($EC_{50}=0.6\text{-}7 \text{ nM}$)結合至兔aPC，沒有偵測到結合至兔PC。這5個IgG也以高親和力($EC_{50}=1.7\text{-}10 \text{ nM}$)結合至狗APC，且它們不結合至狗PC。在5個IgG中的某一個抗體，T46J23，也以6 nM的 EC_{50} 值結合至小鼠aPC。T46J23不結合至小鼠PC。

實例9.抗-APC IgG在使用醯胺分解活性分析的緩衝液中對於物種APC酶活性的影響

【0141】 接著評估5個物種交叉反應性IgG對於物種APC之醯胺分解活性的影響(第11圖)。在人類aPC醯胺分解活性分析中，陰性對照IgG (抗-CTX抗體)不具有抑制效用。5個IgG均以劑量依賴的方式抑制人類aPC。其 IC_{50} 值為18 nM (T46J23-IgG)；27nM (C22J13)；64nM (C7I7)；78 nM(C7A23)，以及131 nM (C25K23)。

【0142】 在兔aPC醯胺分解活性分析中，陰性對照IgG (抗-CTX抗體)不具有抑制效用。5個IgG均以劑量依賴的方式抑制兔aPC。其 IC_{50} 值為17 nM (T46J23-IgG)；24nM (C22J13)；29nM (C7I7)；25 nM (C7A23)，以及74 nM (C25K23)。

【0143】 在狗aPC醯胺分解活性分析中，陰性對照IgG (抗-CTX抗體)不具有抑制效用。5個IgG均以劑量依賴的方式抑制狗aPC。其 IC_{50} 值為625 nM (T46J23-IgG)；1300 nM (C22J13)；147 nM (C7I7)；49 nM (C7A23)，以

201429992

及692 nM (C25K23)。

【0144】 在小鼠aPC醯胺分解活性分析中，僅有T46J23可抑制小鼠aPC，儘管其需要高劑量(1000 nM)。C717以及其他IgG對小鼠aPC不具效用。這些抗體對於物種APC活性的抑制效用歸納於表6中。

表6.ELISA以及醯胺分解活性

	抗-aPC EC ₅₀ (nM)			抗-aPC IC ₅₀ (nM)		
	ELISA			醯胺分解活性		
hIgG1	人類 aPC	兔 aPC	狗 aPC	人類 aPC	兔 aPC	狗 aPC
C7A23	3.3	7	10.9	78	25	49
C7I7	2.7	2	2.3	64	29	147
C22J13	0.5	0.6	--	27	24	1300
C25K23	1.2	2	3.4	131	74	692
T46J23	2.2	1.7	1.7	18	17	625

【0145】 第14(b)圖中顯示，在人類aPC醯胺分解活性分析中，C25K23 IgG1的兩個變體(稱為2310-IgG2與2312-IgG2)在經純化系統中顯示aPC的強力抑制。C25K23 IgG1具有如SEQ ID NO : 108中所示的輕鏈以及如SEQ ID NO : 109中所示的重鏈。TPP-2031為經修飾的C25K23 IgG，其中重鏈包含修飾N54G。變體2310為經修飾的C25K23 IgG，其中輕鏈包含如SEQ ID NO : 112中所示的修飾A10V、T13A、S78T、R81Q以及S82A，而重鏈包含如SEQ ID NO : 113中所示的修飾N54Q。變體2312為經修飾的C25K23 IgG，其中輕鏈包含如SEQ ID NO : 116中所示的修飾A10V、T13A、S78T、R81Q以及S82A，而重鏈包含如SEQ ID NO : 117中所示的修飾S56A。此等變體對aPC也展現如第14(a)圖中所示的高親和力。TPP-2309為經修飾的C25K23 IgG1，其中輕鏈包含如SEQ ID NO : 110中所示的修飾A10V、T13A、S78T、R81Q以及S82A，而重鏈包含如SEQ ID NO : 111中所示的修飾N54G。

實例10.抗-aPC IgG在正常人類血漿中抑制aPC並誘導血塊形成

【0146】首先在人類血漿凝血分析(aPTT)中檢驗抗-aPC IgG對aPC抗凝血活性的影響並顯示於第12圖中。五十百分比(50%)人類血漿於aPC不存在的情況下具有50-52 sec的基線凝血時間。向血漿添加人類aPC一如預期會增加凝血時間至190 sec，因為aPC是一個已知的抗凝血劑。aPC與陰性對照IgG1 (抗-CTX抗體)的預培育不會改變凝血時間。相對地，aPC與抗-aPC特異性IgG的預培育會以劑量依賴的方式明顯縮短凝血時間。在1：1莫耳比例下，T46J23-IgG以及C7I7-IgG在1 ug/ml下抑制~50%的aPC活性(在400ng/ml下)並將凝血時間從190 sec縮短至114 sec。在20ug/ml下，所有三種抗體(T46J23、C7I7、C26B9)完全逆轉aPC的抗凝血活性並將凝血回復至正常。R41E3-IgG在抑制aPC方面不如這3個IgG有效。R41E3將凝血時間部分回復至75 sec並在163-倍莫耳過量下抑制~80%的aPC活性。

【0147】亦在aPTT分析中如第14(c)圖中所示檢驗抗-aPC IgG的經修飾變體的效用。同樣類似於第12圖中的結果，aPC與經修飾抗-aPC特異性IgG的預培育以劑量依賴的方式明顯縮短凝血時間。

實例11.抗-aPC IgG在重度血友病患者血漿中抑制aPC並誘導血塊形成。

【0148】如在第13圖中所示，使用血友病患者血漿在凝血酶生成分析(TGA)中進一步檢驗抗-APC IgG對於aPC抗凝血活性的影響。對沿著血管排列的細胞(內皮細胞)的損傷會造成組織因子暴露，使得限制數量的凝血酶生成，已知為外源性凝血路徑。內皮細胞上的凝血酶調節素是aPC生成及其抗凝血活性的主因。重度血友病血漿僅生成~50 nM總凝血酶。向血友病血漿添加抗-aPC-抗體以劑量依賴的方式增加凝血酶生成。

實例12.共晶體研究

抗體製備與QC

【0149】重組型抗-aPC人類Fab (C25K23以及T46J23)在大腸桿菌中

被表現並藉由蛋白A層析被純化成均質性。經純化Fab顯示具有>90%純度且依據SDS-PAGE以及分析型尺寸排除層析沒有聚集。其功能是藉由aPC-結合分析(ELISA)來進行特徵鑑定。C25K23以及T46J23 Fab如藉由ELISA所測得均以2-4 nM的相當EC₅₀值結合人類aPC全長以及無Gla域aPC。生產10毫克的此等Fab。

抗原製備及QC

【0150】 血漿衍生的人類aPC無Gla域(aPC-GD)是購自於Enzyme Research Lab並且藉由ELISA進行特徵鑑定來確認其可以被C25K23 Fab以及T46J23 Fab所辨識。

複合體形成

【0151】 關於複合體形成，將0.9mg aPC-GD與1.05 mg C25K23Fab混合並於4°C下培育反應混合物歷時5小時。將混合物加載至凝膠過濾管柱上，以將游離Fab或游離aPC-GD與aPC-GD-Fab複合體分離。收集各餾份並藉由SDS-PAGE在非還原條件下進行分析。重複這個程序三次，並集中含有aPC-GD-Fab複合體的餾份且加以濃縮至10 mg/ml。

【0152】 在不同結晶生長條件下進行aPC-Fab複合體的結晶以生成適於結構測定的結晶(最大解析度<3Å)。使用高通量結晶篩選套組並鑑定出兩個結果：

- a) 0.1% n-辛基-β-D-糖昔、0.1M檸檬酸三鈉鹽二水合物PH 5.5、22% PEG 3350
- b) 18% 2-丙醇、0.1M檸檬酸三鈉鹽二水合物PH 5.5、20% PEG 4000

數據收集

【0153】 在2.2 Å解析度下成功地由aPC-GD-C25K23Fab結晶繞射影

像依據分子取代，接著依據模型建構以及再改進來進行結構測定，其中所報導的aPC以及Fab X-射線結構作為模型(例如依據Mather et al., 1996的pdb規則1 aut)。第15圖中顯示為aPC與C25K23 Fab結構的漫畫代表圖。如第15圖中所示，C25K23使用其重鏈的CDR3環來接觸aPC催化域。相當值得注意的是，如第16圖中所示，C25K23的W104側鏈插入aPC的催化口袋中，與先前報導的aPC抑制劑(三肽抑制劑PPACK)具有空間重疊。

【0154】 由這個結構，確定被抗體結合的aPC的抗原決定基是在aPC的重鏈中。aPC重鏈與Fab之間的接觸殘基包括aPC殘基D60、K96、S97、T98、T99、E170、V171、M172、S173、M175、A190、S195、W215、G216、E217、G218，以及G218。

【0155】 特別就Fab C25K23來說，確定抗原決定簇包含SEQ ID NO：18中所示重鏈的殘基S31、Y32、W53、R57、R101、W104、R106、F107、W110，以及SEQ ID NO：8中所示輕鏈的K55。

實例13.活性-位點結合

【0156】 使用一個不可逆的活性-位點抑制劑，生物素-PPACK，來佔據人類aPC的活性位點，參見第16圖。生物素-PPACK-hAPC或人類aPC被塗覆在maxisorp96孔盤上。抗-aPC抗體(Fab以及IgG)以1：3從20 nM連續稀釋至0.007 nM並被添加至經塗覆的孔，且在室溫下培育歷時1小時。藉由HRP-綴合抗-人類或抗-小鼠Fab抗體並與螢光受質(amplex red與H₂O₂)一起培育以產生螢光訊號(RFU)來偵測結合的抗-aPC-Fab或抗-aPC IgG。藉由Gemini EM螢光微量盤讀取儀(Molecular Devices, Sunnyvale, CA)來讀取盤。在20 nM抗體濃度下的RFU在柱狀圖中表示為三重複孔的平均值(+/-SD)。

【0157】 如第17圖中所示，從庫鑑別出至少兩類抗體。第一者為受活性位點指引，包括T46J23 (Fab與hIgG)以及C25K23 (Fab與hIgG)，它們不再結合至生物素-PPACK-hAPC(活性位點經阻斷的hAPC)。第二者為非受活性

位點指引者，包括R41C17，咸信其為抗-Gla-域抗體。這些數據強而有力地證明T46J23以及C25K23對人類aPC的活性位點結合並解釋這些抗體的功能特性，亦即完全阻斷hAPC活性。

【0158】 儘管本發明具體例已參照特定具體例以及實例來說明，應理解可在不偏離隨附申請專利範圍之忠實精神與範疇的情況下做出各種修飾以及變化並且可替換等效物。因此，說明書以及實例被視為是說明性而非限制的意思。此外，所有論文、書籍、專利申請案以及專利案的揭示內容在此以其整體併入本文做為參考資料。

【符號說明】 無

【生物材料寄存】 無

國內寄存資訊 **【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】**

國外寄存資訊 **【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】**

【序列表】 **(請換頁單獨記載)**

201429992

序列表

<110> Bayer HealthCare LLC

<120> 抗活化蛋白C (aPC)的單株抗體

<130> BHC 11 5 003

<160> 119

<170> Patent In第3.5版

<210> 1

<211> 461

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 1

Met Trp Gln Leu Thr Ser Leu Leu Leu Phe Val Ala Thr Trp Gly Ile
1 5 10 15

Ser Gly Thr Pro Ala Pro Leu Asp Ser Val Phe Ser Ser Ser Glu Arg
20 25 30

Ala His Gln Val Leu Arg Ile Arg Lys Arg Ala Asn Ser Phe Leu Glu
35 40 45

Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu Cys Ile Glu Glu Ile Cys
50 55 60

Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln Asn Val Asp Asp Thr Leu
65 70 75 80

Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp Gln Cys Leu Val Leu Pro
85 90 95

Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys Gly His Gly Thr Cys Ile
100 105 110

Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys Arg Ser Gly Trp Glu Gly
115 120 125

Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu Asn Cys Ser Leu Asp Asn
130 135 140

201429992

Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu Val Gly Trp Arg Arg Cys
145 150 155 160

Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp Asp Leu Leu Gln Cys His
165 170 175

Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro Trp Lys Arg Met Glu Lys
180 185 190

Lys Arg Ser His Leu Lys Arg Asp Thr Glu Asp Gln Glu Asp Gln Val
195 200 205

Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr Arg Arg Gly Asp Ser Pro
210 215 220

Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys Lys Leu Ala Cys Gly Ala
225 230 235 240

Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Met Asp
245 250 255

Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr Asp Leu Arg Arg
260 265 270

Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His
275 280 285

Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His
290 295 300

Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu
305 310 315 320

Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu
325 330 335

Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala
340 345 350

Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val
355 360 365

201429992

Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn
370 375 380

Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly
385 390 395 400

Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu
405 410 415

Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr
420 425 430

Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp Ile His Gly His
435 440 445

Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala Pro
450 455 460

<210> 2

<211> 417

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 2

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln
20 25 30

Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
50 55 60

Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
65 70 75 80

Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
85 90 95

201429992

Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
100 105 110

Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
115 120 125

Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
130 135 140

Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Asp Thr Glu Asp Gln
145 150 155 160

Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys Met Thr Arg Arg
165 170 175

Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser Lys Lys Lys Leu
180 185 190

Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val Leu Thr Ala Ala
195 200 205

His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg Leu Gly Glu Tyr
210 215 220

Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu Asp Ile Lys Glu
225 230 235 240

Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr Asp Asn Asp Ile
245 250 255

Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser Gln Thr Ile Val
260 265 270

Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg Glu Leu Asn Gln
275 280 285

Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr His Ser Ser Arg
290 295 300

Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu Asn Phe Ile Lys
305 310 315 320

201429992

Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val Met Ser Asn Met
325 330 335

Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly Asp Arg Gln Asp
340 345 350

Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala Ser Phe His Gly
355 360 365

Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu Gly Cys Gly Leu
370 375 380

Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Leu Asp Trp
385 390 395 400

Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln Lys Ser Trp Ala
405 410 415

Pro

<210> 3
<211> 405
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 3

Ala Asn Ser Phe Leu Glu Glu Leu Arg His Ser Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Ile Glu Glu Ile Cys Asp Phe Glu Glu Ala Lys Glu Ile Phe Gln
20 25 30

Asn Val Asp Asp Thr Leu Ala Phe Trp Ser Lys His Val Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Leu Val Leu Pro Leu Glu His Pro Cys Ala Ser Leu Cys Cys
50 55 60

Gly His Gly Thr Cys Ile Asp Gly Ile Gly Ser Phe Ser Cys Asp Cys
65 70 75 80

201429992

Arg Ser Gly Trp Glu Gly Arg Phe Cys Gln Arg Glu Val Ser Phe Leu
85 90 95

Asn Cys Ser Leu Asp Asn Gly Gly Cys Thr His Tyr Cys Leu Glu Glu
100 105 110

Val Gly Trp Arg Arg Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Lys Leu Gly Asp
115 120 125

Asp Leu Leu Gln Cys His Pro Ala Val Lys Phe Pro Cys Gly Arg Pro
130 135 140

Trp Lys Arg Met Glu Lys Lys Arg Ser His Leu Leu Ile Asp Gly Lys
145 150 155 160

Met Thr Arg Arg Gly Asp Ser Pro Trp Gln Val Val Leu Leu Asp Ser
165 170 175

Lys Lys Lys Leu Ala Cys Gly Ala Val Leu Ile His Pro Ser Trp Val
180 185 190

Leu Thr Ala Ala His Cys Met Asp Glu Ser Lys Lys Leu Leu Val Arg
195 200 205

Leu Gly Glu Tyr Asp Leu Arg Arg Trp Glu Lys Trp Glu Leu Asp Leu
210 215 220

Asp Ile Lys Glu Val Phe Val His Pro Asn Tyr Ser Lys Ser Thr Thr
225 230 235 240

Asp Asn Asp Ile Ala Leu Leu His Leu Ala Gln Pro Ala Thr Leu Ser
245 250 255

Gln Thr Ile Val Pro Ile Cys Leu Pro Asp Ser Gly Leu Ala Glu Arg
260 265 270

Glu Leu Asn Gln Ala Gly Gln Glu Thr Leu Val Thr Gly Trp Gly Tyr
275 280 285

His Ser Ser Arg Glu Lys Glu Ala Lys Arg Asn Arg Thr Phe Val Leu

201429992

290

295

300

Asn Phe Ile Lys Ile Pro Val Val Pro His Asn Glu Cys Ser Glu Val
305 310 315 320

Met Ser Asn Met Val Ser Glu Asn Met Leu Cys Ala Gly Ile Leu Gly
325 330 335

Asp Arg Gln Asp Ala Cys Glu Gly Asp Ser Gly Gly Pro Met Val Ala
340 345 350

Ser Phe His Gly Thr Trp Phe Leu Val Gly Leu Val Ser Trp Gly Glu
355 360 365

Gly Cys Gly Leu Leu His Asn Tyr Gly Val Tyr Thr Lys Val Ser Arg
370 375 380

Tyr Leu Asp Trp Ile His Gly His Ile Arg Asp Lys Glu Ala Pro Gln
385 390 395 400

Lys Ser Trp Ala Pro
405

<210> 4

<211> 113

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 4

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg

201429992

65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Leu
85 90 95

Ser Gly Pro Tyr Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 5
<211> 111
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 5

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Val Gly Ser
85 90 95

Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> 智慧人

201429992

<400> 6

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Phe Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Gln Asp Thr
85 90 95

Leu Thr Gly Trp Met Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 7

<211> 110

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 7

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

201429992

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 8

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9

<211> 112

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 9

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

201429992

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Asp Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 10

<211> 121

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 10

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr
1 5 10 15

Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Arg Asn Asn His Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
85 90 95

201429992

Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120

<210> 11
<211> 118
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 11

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr
1 5 10 15

Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
20 25 30

Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys
50 55 60

Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu Asp
65 70 75 80

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr His Val
85 90 95

Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu
115

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 12

201429992

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr
1 5 10 15

Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120

<210> 13
<211> 120
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 13

Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln Arg Val Thr
1 5 10 15

Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Gly Asn Ile Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

201429992

Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg Ser Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Arg Ser Ala Thr Leu
85 90 95

Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
100 105 110

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro
115 120

<210> 14

<211> 124

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 14

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

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

201429992

<210> 15

<211> 124

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 15

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

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

<210> 16

<211> 122

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 16

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

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

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

201429992

35

40

45

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

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

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

Ala Arg Asp Arg Arg Val Arg Gly Ile Tyr Asp Ala Phe Asp Met Trp
100 105 110

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

<210> 17

<211> 124

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 17

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp

201429992

100

105

110

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

<210> 18

<211> 124

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 18

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

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

<210> 19

<211> 115

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 19

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

201429992

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

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

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

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

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

Arg Met Gly Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Thr Ser
115

<210> 20
<211> 126
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 20

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

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

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

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Arg Glu Lys Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
50 55 60

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

201429992

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

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

Val Thr Val Thr Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

<210> 21

<211> 133

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 21

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ala Asp Ser Ser Ser Ala Gly Arg Trp Ala Gly Ser Leu Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe
130

201429992

<210> 22
<211> 133
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 22

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe
130

<210> 23
<211> 131
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 23

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

201429992

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Arg Ala Thr Arg Ser Gly Tyr Tyr Phe Asp Ser Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Thr Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125

Ser Val Phe
130

<210> 24
<211> 339
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 24
cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgctctg gaaggcagctc caacattggg aataattatg tatcctggta tcagcagctc
ccaggaacgg ccccaaact cctcatctat aggaataatc agcggccctc aggggtccct 120
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg
tccgaggatg aggctgatTA ttactgccAG tcctatgaca gcgacctgag tggccatc 180
gtgctttcg gcggaggaac caagctgacg gtccttagt 240
300
339

<210> 25
<211> 333
<212> DNA

201429992

<213> 智慧人

<400> 25

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag	120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggttaaca gcaatcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtggctc	240
cggtccgagg atgaggctgc ttattactgc agctcatatg taggcagcga cctcggttg	300
ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggt	333

<210> 26

<211> 336

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 26

cagtctgtgc tgactcagcc accctcaacg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttttg atgtacactg gtatcagcag	120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggttaaca gcaatcggcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtggctc	240
cggtccgagg atgaggctga ttattactgt gctacttggc aagacactct gactggttgg	300
atgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc cttagt	336

<210> 27

<211> 330

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 27

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcttgtctg gaagcgactc caacatcgga agtaatgctg ttaattggta tcagcagctc	120
ccaggaacgg cccccaact cctcatctat gacaataata agcgaccctc aggggtccct	180
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg	240
tccgaggatg aggctgatta ttacigcagc tcataataaa gcagcaacac tgtcgatattc	300
ggcggaggaa ccaagctgac ggtcctaggt	330

<210> 28

201429992

<211> 336

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 28

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagc tc acacatcg gg gcagcttatg atgtacactg gtatcagcag	120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggcaata ataagcgacc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	240
cggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gtattcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt	336

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 29

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagc tc acacatcg gg gcagcttatg atgtacactg gtatcagcag	120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tatggcaata ataagcgacc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	240
cggtccgagg atgaggctga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttcg	300
gtattcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt	336

<210> 30

<211> 336

<212> DNA

<213> 智慧人

<400> 30

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc	60
tcctgcactg ggagcagc tc acacattggg gcgggttatg ttgtacattg gtatcagcag	120
ctcccaggaa cggcccccaa actcctcatc tataggaata atcatcgcc ctcaggggtc	180
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc	240
cggtccgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatgg atgacagcct gaatggtcgg	300
gtttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt	336

201429992

<210> 31
<211> 333
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 31
cagtcgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg taaactggta tcagcagctc
ccaggaacgg cccccaaact cctcatctat agtaataatc agcggccctc aggggtccct 120
gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagcctccc tggccatcag tgggctccgg
tccgaggatg aggctgatta ttactgcagc tcataatacaa gcagcagcac tcatgtggta 180
ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggt 240
300
333

<210> 32
<211> 336
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 32
cagtcgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggaccagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag
ctcccaggaa cggccccc aa actcctcatc tatgataaca acaatcggcc ctcaggggtc 120
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtggctc
cggtccgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gaacggtgtg 180
300
gtattcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggt 240
336

<210> 33
<211> 333
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 33
cagtcgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc 60
tcctgcactg ggaccagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag
ctcccaggaa cggccccc aa actcctcatc tatgtaaca tcaatcggcc ctcaggggtc 120
cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtggctc
cggtccgagg atgaggctga ttattactgc agctcatata caagaagcgc cactctcgtg 180
240
300

201429992

ttcggcggag gaaccaagct gacggtccta ggt 333

<210> 34
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 34
gaggtgcagc tggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttggt aatcatggg tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggagg ggctggagt ggtatcggt gtttagtttga atggcagtag gacgcactat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac actgccgtt attactgtgc cctgacaggg 300
agaagtggct ggtatgcgcctt cccaaactgg ttgcacccct gggccaagg taccctggc 360
accgtgacta gt 372

<210> 35
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 35
gaggtgcagc tggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttggt aatcatggg tgacctgggt ccgccaggct 120
ccagggagg ggctggagt ggtatcggt gtttagtttga atggcagtag gacgcactat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaata acagcctgag agccgaggac actgccgtt attactgtgc cctgacaggg 300
agaagtggct ggtatgcgcctt cccaaactgg ttgcacccct gggccaagg taccctggc 360
accgtgacta gt 372

<210> 36
<211> 366
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 36
gaggtgcagc tggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt caccttagt agttatagca tgaactgggt ccgccaggct 120

201429992

ccagggaaagg ggctggagtg ggctcagct attagtgta gtggtggtag cacatactac 180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagatcga 300
cggttcggg gaatctatga tgcatttgc atgtggggcc agggtaccct ggtcaccgtg 360
actagt 366

<210> 37
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 37
gaggtgcagc tggggggggc ttggtagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtcag cctctggatt caccttcaatc agcaactaca tgagctgggt ccggccaggct 120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatcatatg atgaaagcaa taaaatactac 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccatgt attactgtgc cctgacaggg 300
agaagtggct ggtatgcgtt cccaaactgg ttgcaccctt gggccaaagg taccctggtc 360
accgtgacta gt 372

<210> 38
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 38
gaggtgcagc tggggggggc ttggtagc ctggggggtc cctgagactc 60
tcctgtcag cctctggatt cacctttagt agctatttggaa tgagctgggt ccggccaggct 120
ccagggaaagg ggctggagtg ggtatcggtt gttttttttt atggcagtag gacgcactat 180
gcagactctg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc cctgacaggg 300
agaagtggct ggtatgcgtt cccaaactgg ttgcaccctt gggccaaagg taccctggtc 360
accgtgacta gt 372

<210> 39
<211> 345

201429992

<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 39
gaggtgcagc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccitca gactatggca tgcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatacgat gtggtagcac atactacgca 180
gactccgtga agggcagatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg 240
caaataatgaca gcctgagagc cgaggacact gccgtgtatt actgtgcgag gatggaaagg 300
gcttttata tctggggcca aggtaccctg gtcaccgtga ctatgt 345

<210> 40
<211> 351
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 40
gaggtgcagc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccitca gactatggca tgagctgggt ccgccagtct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtggctgtt atatcatatg acggaaggaa gaagtactac 180
tcagactccg tcaagggacg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagatcgg 300
ggacgtaccc ttgactactg gggccaaggt accctggta ccgtgactat 351

<210> 41
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 41
gaggtgcagc tgggggaggc ttggcacgc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccitca gactatggca tgacccgtgtt ccgccaggct 120
ccagggaagg ggctggagtg ggtatcgggt gtttagtttga atggcagtag gacgcactat 180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagagcggat 300
agcagcagcg ccgggagggtg ggccggctca cttgactact gggccaagg taccctggtc 360
accgtgacta gt 372

201429992

<210> 42
<211> 372
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 42
gaggtgcagc tggggaggc ttgtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccgggt aatcattgga tgacctgggt ccgccaggct
ccagggaagg ggctggagt ggtatcggtt gtttagttgga atggcagtag gacgcactat 120
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgcgttat 180
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc cctgacaggg 240
agaagtggct ggatgcgcctt cccaaactgg ttgcacccct gggccaagg tacccgtgc 300
accgtgacta gt 360
372

<210> 43
<211> 366
<212> DNA
<213> 智慧人

<400> 43
gaggtgcagc tggggaggc ttgtacagc ctgggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacccgttggca tgcaactgggt ccgccaggct
ccaggcaagg ggctggagt ggtctctgggt attaattgga atggtggttag cacaggttat 120
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgcgttat 180
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac actgccgtgt attactgtgc gagaaatcga 240
gccacccgca gtggctacta ttactttgac tcctggggcc aggtaaccct ggtcaccgtg 300
actagt 360
366

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 44

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
1 5 10

201429992

<210> 45

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 45

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 46

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Phe Asp Val His
1 5 10

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 47

Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Ser Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 48

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 49

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Arg Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

201429992

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 50

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10

<210> 51

<211> 13

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 51

Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 52

Thr Gly Thr Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 53

Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 54

Arg Asn Asn Gln Arg Pro
1 5

201429992

<210> 55
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 55

Gly Asn Ser Asn Arg Pro
1 5

<210> 56
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 56

Gly Asn Ser Asn Arg Pro
1 5

<210> 57
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 57

Asp Asn Asn Lys Arg Pro
1 5

<210> 58
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 58

Gly Asn Asn Lys Arg Pro
1 5

<210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 59

Gly Asn Ser Asn Arg Pro
1 5

201429992

<210> 60
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 60

Arg Asn Asn His Arg Pro
1 5

<210> 61
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 61

Ser Asn Asn Gln Arg Pro
1 5

<210> 62
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 62

Asp Asn Asn Asn Arg Pro
1 5

<210> 63
<211> 6
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 63

Gly Asn Ile Asn Arg Pro
1 5

<210> 64
<211> 13
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 64

Gln Ser Tyr Asp Ser Asp Leu Ser Gly Pro Tyr Val Leu
1 5 10

201429992

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 65

Ser Ser Tyr Val Gly Ser Asp Leu Val Val
1 5 10

<210> 66
<211> 11
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 66

Ala Thr Trp Gln Asp Thr Leu Thr Gly Trp Met
1 5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 67

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Asn Thr Val Val
1 5 10

<210> 68
<211> 11
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 68

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
1 5 10

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 69

Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Asp Val Val
1 5 10

201429992

<210> 70
<211> 11
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 70

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val
1 5 10

<210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 71

Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr His Val Val
1 5 10

<210> 72
<211> 11
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 72

Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 73

Ser Ser Tyr Thr Arg Ser Ala Thr Leu Val
1 5 10

<210> 74
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 74

Asn His Trp Met Thr
1 5

201429992

<210> 75
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 75

Asn His Trp Met Thr
1 5

<210> 76
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 76

Ser Tyr Ser Met Asn
1 5

<210> 77
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 77

Ser Asn Tyr Met Ser
1 5

<210> 78
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 78

Ser Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 79

Ser Tyr Gly Met His
1 5

201429992

<210> 80
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 80

Asn Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 81
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 81

Asn Tyr Ala Met Thr
1 5

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 82

Asn His Trp Met Thr
1 5

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 83

Gly Tyr Gly Met His
1 5

<210> 84
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 84

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

201429992

Lys Gly

<210> 85
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 85

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 86
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 86

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

Lys Gly

<210> 87
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 87

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

Lys Gly

<210> 88
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 88

201429992

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 89
<211> 17
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 89

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

Gly

<210> 90
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 90

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

Lys Gly

<210> 91
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 91

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 92

201429992

<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 92

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 93
<211> 18
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 93

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

Lys Gly

<210> 94
<211> 15
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 94

Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 95

Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> 智慧人

201429992

<400> 96

Asp Arg Arg Val Arg Gly Ile Tyr Asp Ala Phe Asp Met
1 5 10

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 97

Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 98

Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 99

Met Gly Arg Ala Phe Asp Ile
1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 100

Asp Arg Gly Arg Thr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> 智慧人

201429992

<400> 101

Ala Asp Ser Ser Ser Ala Gly Arg Trp Ala Gly Ser Leu Asp Tyr
1 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 102

Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 103

<211> 13

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 103

Asn Arg Ala Thr Arg Ser Gly Tyr Tyr Tyr Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 104

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子序列

<400> 104

gaaacagcta tgaaataacct attgc

25

<210> 105

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 引子序列

<400> 105

gcctgagcag tggaagtcc

19

<210> 106

<211> 24

201429992

<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子序列

<400> 106
taggtatttc attatgactg tctc

24

<210> 107
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引子序列

<400> 107
cccagtcacg acgttgtaaa acg

23

<210> 108
<211> 217
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 108

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

201429992

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 109

<211> 453

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 109

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

201429992

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn

201429992

290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
355 360 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445

Ser Leu Ser Pro Gly
450

<210> 110
<211> 217
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 110

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala

201429992

20

25

30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 111

<211> 449

<212> PRT

<213> 智慧人

201429992

<400> 111

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Gly Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

201429992

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 112
<211> 217
<212> PRT
<213> 智慧人

<400> 112

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

201429992

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 113

<211> 449

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 113

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Gln Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

201429992

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

201429992

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 114

<211> 217

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 114

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

201429992

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 115

<211> 449

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 115

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

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

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

201429992

Ser Gly Val Ser Trp Ala Gly Ser Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu

201429992

260 265 270
Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 116
<211> 217
<212> PRT
<213> 智慧人

201429992

<400> 116

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

201429992

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 117

<211> 449

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 117

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Ala Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

201429992

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Glu Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

201429992

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

<210> 118

<211> 217

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 118

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
115 120 125

201429992

Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
130 135 140

Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
145 150 155 160

Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
165 170 175

Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
180 185 190

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
195 200 205

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 119

<211> 449

<212> PRT

<213> 智慧人

<400> 119

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

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

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

Ser Gly Val Ser Trp Asn Gly Gly Arg Thr His Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

201429992

Ala Leu Thr Gly Arg Ser Gly Trp Met Arg Phe Pro Asn Trp Phe Asp
100 105 110

Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
130 135 140

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190

Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
195 200 205

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
210 215 220

Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

201429992

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly

201429992

發明摘要

※ 申請案號：102143366

※ 申請日：102.11.28

※ I P C 分類：*C07K 16/40 (2006.01)*

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

抗活化蛋白C (aPC)的單株抗體

MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST ACTIVATED PROTEIN C
(aPC)

【中文】

本文提供關於以對其酶原蛋白C (PC)有最低結合之對抗人類活化蛋白C (aPC)的抗體、抗原-結合抗體片段(Fab)以及其他蛋白質骨架。此外，此等aPC結合蛋白可阻斷aPC的抗凝血活性以誘導凝血。此等結合體的治療用途係如本文所述為淘選以及篩選特異性抗體的方法。

【英文】

Provided herein are antibodies, antigen-binding antibody fragments (fabs), and other protein scaffolds, directed against human activated Protein C (aPC) with minimal binding to its zymogen Protein C (PC). Moreover, these aPC binding proteins could potentially block the anti-coagulant activity of aPC to induce coagulation. Therapeutic uses of these binders are described herein as are methods of panning and screening specific antibodies.

申請專利範圍

1. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含具有選自由SEQ ID NO：14、15、17、18、19、21、22、23、109、111、113、115、117以及119組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區。
2. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含具有選自由SEQ ID NO：4、5、7、8、9、11、12、13、108、110、112、114、116以及118組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。
3. 如申請專利範圍第1項之經單離單株抗體，其進一步包含含有選自由 SEQ ID NO：4、5、7、8、9、11、12、13、108、110、112、114、116以及118組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。
4. 如申請專利範圍第3項之經單離單株抗體，其中該抗體包含含有下列的重鏈與輕鏈可變區：
 - a) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：14的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：4的胺基酸序列；
 - b) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：15的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：5的胺基酸序列；
 - c) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：17的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：7的胺基酸序列；
 - d) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：18的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：8的胺基酸序列；
 - e) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：19的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：9的胺基酸序列；
 - f) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：21的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：11的胺基酸序列；

- g) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：22的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：12的胺基酸序列；
 - h) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：23的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：13的胺基酸序列；
 - i) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：109的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：108的胺基酸序列；
 - j) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：111的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：110的胺基酸序列；
 - k) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：113的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：112的胺基酸序列；
 - l) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：115的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：114的胺基酸序列；
 - m) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：117的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：116的胺基酸序列；以及
 - n) 重鏈可變區含有SEQ ID NO：119的胺基酸序列而輕鏈可變區含有SEQ ID NO：118的胺基酸序列。
5. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：94、95、97、98、99、101、102以及103組成之群的胺基酸序列的CDR3。
6. 如申請專利範圍第5項之經單離單株抗體，其中該抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO：74、75、77、78、79、81、82以及83組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO：84、85、87、88、89、91、92以及93組成之群的胺基酸序列的CDR2，或(c)含有選自由SEQ ID NO：74、75、77、78、79、81、82以及83組成之群的胺基酸序列的CDR1以及含有選自由SEQ ID NO：84、85、87、88、89、91、92以及93組成

之群的胺基酸序列的CDR2兩者。

7. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C並抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：64、65、67、68、69、71、72以及73組成之群的胺基酸序列的CDR3。
8. 如申請專利範圍第7項之經單離單株抗體，其中該抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO：44、45、47、48、49、51、52以及53組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO：54、55、57、58、59、61、62以及63組成之群的胺基酸序列的CDR2，或(c)含有選自由SEQ ID NO：44、45、47、48、49、51、52以及53組成之群的胺基酸序列的CDR1以及含有選自由SEQ ID NO：54、55、57、58、59、61、62以及63組成之群的胺基酸序列的CDR2兩者。
9. 如申請專利範圍第5項之經單離單株抗體，其中該抗體進一步包含含有選自由SEQ ID NO：64、65、67、68、69、71、72以及73組成之群的胺基酸序列的CDR3。
10. 如申請專利範圍第9項之經單離單株抗體，其中該抗體進一步包含(a)含有選自由SEQ ID NO：74、75、77、78、79、81、82以及83組成之群的胺基酸序列的CDR1、(b)含有選自由SEQ ID NO：84、85、87、88、89、91、92以及93組成之群的胺基酸序列的CDR2、(c)含有選自由SEQ ID NO：44、45、47、48、49、51、52以及53組成之群的胺基酸序列的CDR1，以及(d)含有選自由SEQ ID NO：54、55、57、58、59、61、62以及63組成之群的胺基酸序列的CDR2兩者。
11. 如申請專利範圍第4項之抗體，其中該抗體包含含有下列的重鏈與輕鏈可變區：
 - a) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：44、54與64的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：74、84與94的胺基酸序列；

- b) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：45、55與65的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：75、85與95的胺基酸序列；
- c) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：47、57與67的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：77、87與97的胺基酸序列；
- d) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：48、58與68的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：78、88與98的胺基酸序列；
- e) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：49、59與69的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：79、89與99的胺基酸序列；
- f) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：51、61與71的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：81、91與101的胺基酸序列；
- g) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：52、62與72的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：82、92與102的胺基酸序列；以及
- h) 輕鏈可變區包含含有SEQ ID NO：53、63與73的胺基酸序列而重鏈可變區包含含有SEQ ID NO：83、93與103的胺基酸序列。

12. 如申請專利範圍第4項之經單離單株抗體，其進一步包含一或多個胺基酸修飾。
13. 如申請專利範圍第11項之經單離單株抗體，其進一步包含一或多個胺基酸修飾。
14. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有SEQ ID NO：8之胺基酸序列的輕鏈可變區，其中該胺基酸序列包含一或多個胺基酸修飾。
15. 如申請專利範圍第13項之經單離單株抗體，其中該修飾為置換。
16. 如申請專利範圍第14項之經單離單株抗體，其中該置換是選自下列組成之群的位置：A10、T13、G52、N53、N54、R56、P57、S58、S78、R81、S82、Q91、Y93、S95、S96、L97、S98、G99、S100以及V101。

17. 如申請專利範圍第15項之經單離單株抗體，其中該置換是選自下列組成之群：A10V、T13A、G52S、G52Y、G52H、G52F、N53G、N54K、N54R、R56K、P57G、P57W、P57N、S58V、S58F、S58R、S78T、R81Q、S82A、Q91R、Q91G、Y93W、S95F、S95Y、S95G、S95W、S95E、S96G、S96A、S96Y、S96W、S96R、L97M、L97G、L97R、L97V、S98L、S98W、S98V、S98R、G99A、G99E、S100A、S100V、V101Y、V101L以及V101E。
18. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有SEQ ID NO：18之胺基酸序列的重鏈可變區，其中該胺基酸序列包含一或多個胺基酸修飾。
19. 如申請專利範圍第18項之經單離單株抗體，其中該修飾為置換。
20. 如申請專利範圍第19項之經單離單株抗體，其中該置換是選自N54以及S56組成之群的位置。
21. 如申請專利範圍第20項之經單離單株抗體，其中該置換是選自下列組成之群：N54G、N54Q、N54A、S56A以及S56G。
22. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體包含含有SEQ ID NO：12之胺基酸序列的輕鏈可變區，其中該胺基酸序列包含一或多個胺基酸修飾。
23. 如申請專利範圍第22項之經單離單株抗體，其中該修飾為置換。
24. 如申請專利範圍第23項之經單離單株抗體，其中該置換是選自下列組成之群的位置：T25、D52、N53、N54、N55、D95、N98以及G99。
25. 如申請專利範圍第24項之經單離單株抗體，其中該置換是選自下列組成之群：T25S、D52Y、D52F、D52L、D52G、N53C、N53K、N53G、N54S、N55K、D95G、N98S、G99H、G99L以及G99F。
26. 一種結合至人類活化蛋白C (人類aPC，SEQ ID NO：3)之抗原決定基

(epitope)之經單離單株抗體，其中該抗原決定基包含人類aPC重鏈的殘基。

27. 一種結合至人類活化蛋白C(人類aPC，SEQ ID NO：3)之抗原決定基之經單離單株抗體，其中該抗原決定基包含SEQ ID NO：3的S195。
28. 一種結合至人類活化蛋白C之抗原決定基之經單離單株抗體，其中該抗原決定基包含選自下列組成之群的一或多個殘基：SEQ ID NO：3的D60、K96、S97、T98、T99、E170、V171、M172、S173、M175、A190、S195、W215、G216、E217、G218，以及G218。
29. 一種結合至活化蛋白C之活性位點的經單離單株抗體。
30. 一種經單離單株抗體，其中該抗體結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合，其中該抗體為完全人類抗體。
31. 如申請專利範圍第1-30項之經單離單株抗體，其中該抗體是選自下列組成之群：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌型IgA、IgD、IgE抗體，以及抗體片段。
32. 如申請專利範圍第1-30項之經單離單株抗體，其中該抗體結合至人類活化蛋白C。
33. 如申請專利範圍第32項之經單離單株抗體，其中該抗體進一步結合至非人類物種的活化蛋白C。
34. 如申請專利範圍第1-30項之抗體，其中凝血時間在該抗體存在下被縮短。
35. 一種與如申請專利範圍第1-30項之抗體競爭的抗體。
36. 一種醫藥組成物，其包含治療有效量之如申請專利範圍第1-30項中任一項之單株抗體以及醫藥上可接受的載劑。
37. 一種治療凝血方面的遺傳性或後天缺乏症或缺陷的方法，其包含向患者投與治療有效量之如申請專利範圍第36項的醫藥組成物。
38. 一種治療凝血障礙的方法，其包含向患者投與治療有效量之如申請專利

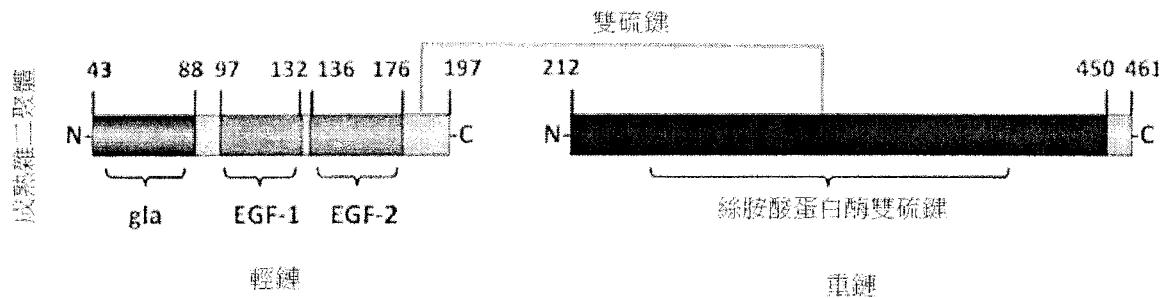
範圍第36項的醫藥組成物。

39. 如申請專利範圍第38項之方法，其中凝血障礙為A型血友病、B型血友病或C型血友病。
40. 如申請專利範圍第38項之方法，其中凝血障礙是選自創傷引起的凝血障礙或重度出血患者組成之群。
41. 如申請專利範圍第38項之方法，其進一步包含投與凝血因子。
42. 如申請專利範圍第41項之方法，其中該凝血因子是選自因子VIIa、因子VIII或因子IX組成之群。
43. 一種縮短出血時間的方法，其包含向患者投與治療有效量之如申請專利範圍第36項的醫藥組成物。
44. 一種編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：14、15、17、18、19、21、22以及23組成之群的胺基酸序列的重鏈可變區。
45. 一種編碼結合至活化蛋白C且抑制抗凝血活性，但對未活化蛋白C具有最低結合之抗體的經單離核酸分子，其中該抗體包含含有選自由SEQ ID NO：4、5、7、8、9、11、12以及13組成之群的胺基酸序列的輕鏈可變區。

201429992

圖式

第 1 圖



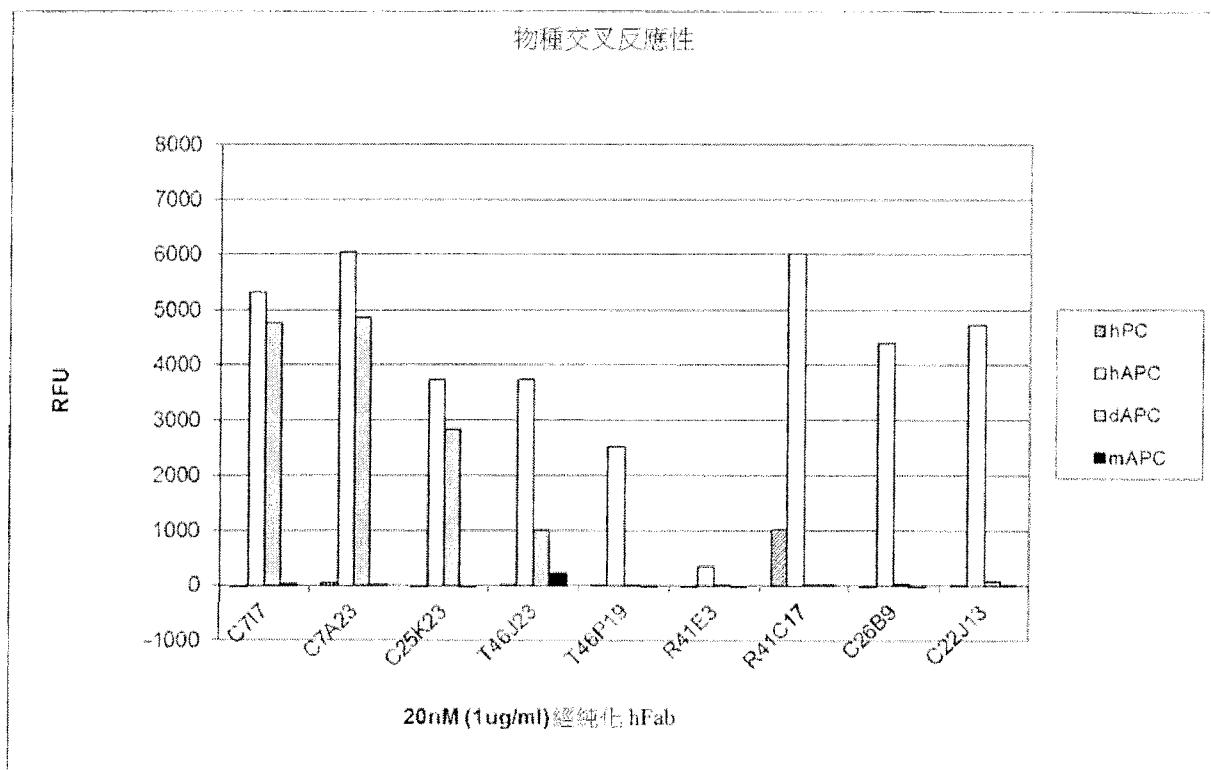
第 2 圖

重鏈	HCDR1	HCDR2	HCDR3
C7I7 heavy chain	45		
C7A23 heavy chain	46		
I46J23 heavy chain	46		
C22J13 heavy chain	46		
C25K23 heavy chain	46		
C26B9 heavy chain	46		
O3E7 heavy chain	46		
I46P19 heavy chain	46		
R41C17 heavy chain	46		
R41E3 heavy chain	46		

輕鏈	LCDR1	LCDR2	LCDR3
C7I7 light chain	17		
C7A23 light chain	17		
I46J23 light chain	16		
C22J13 Light chain	17		
C25K23 light chain	17		
C26B9 light chain	17		
O3E7 light chain	17		
I46P19 light chain	17		
R41C17 light chain	16		
R41E3 light chain	16		

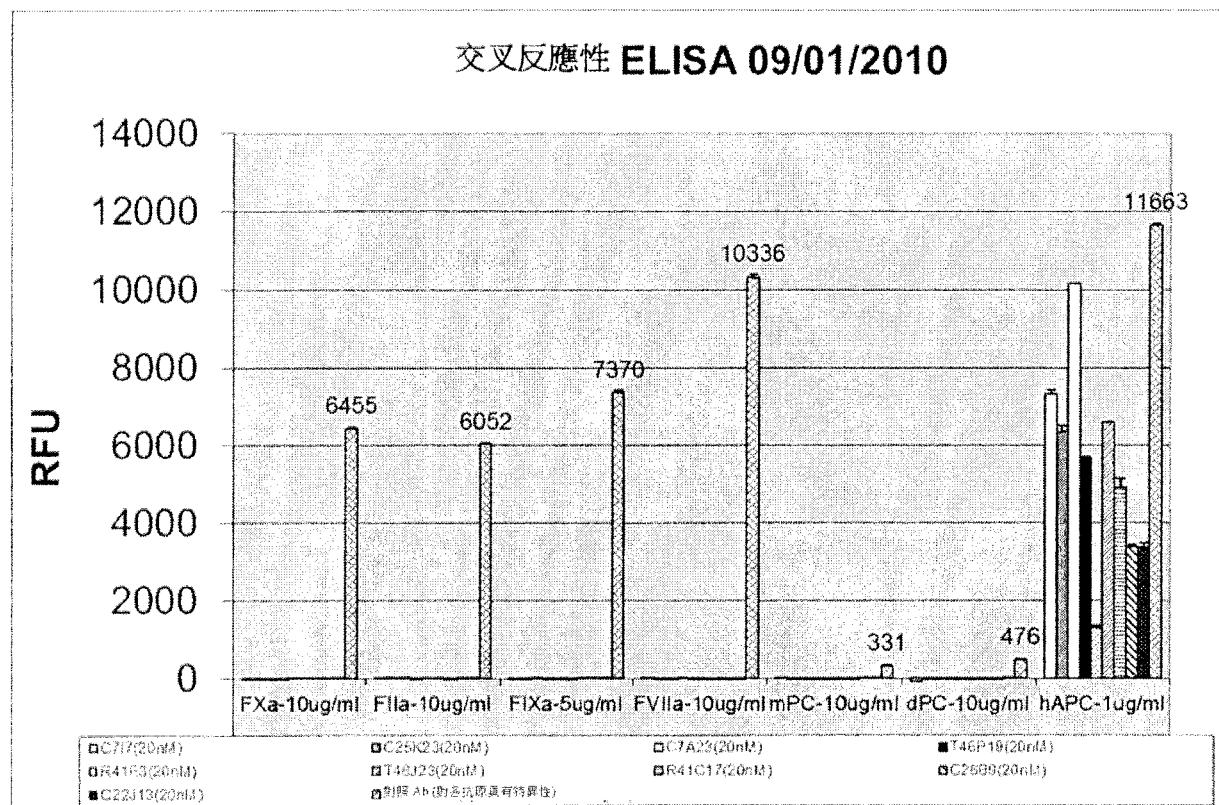
201429992

第3圖



201429992

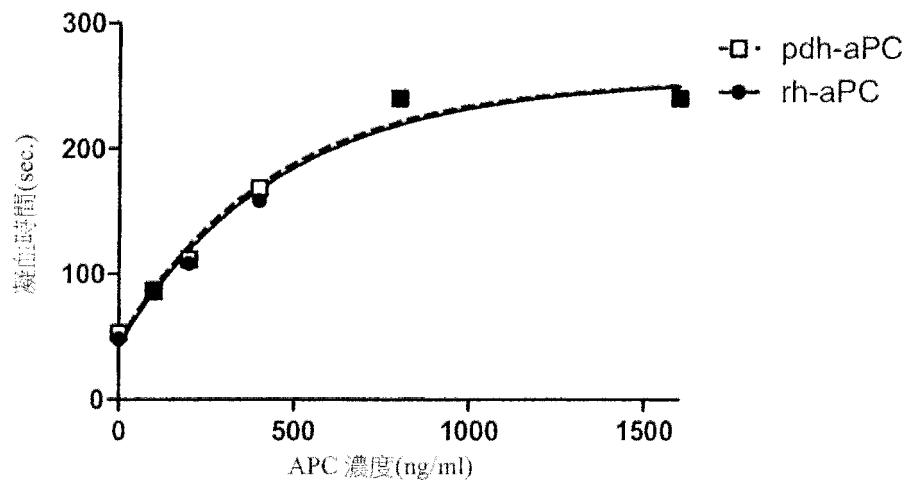
第4圖



201429992

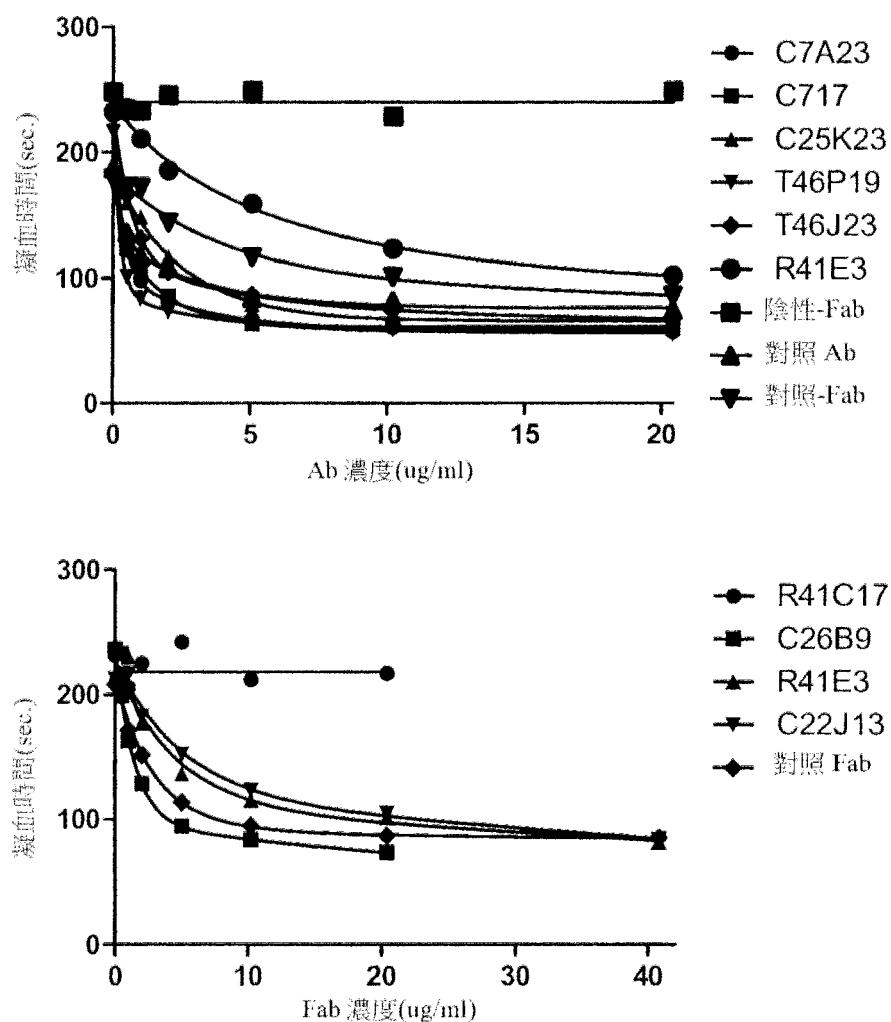
第 5 圖

在正常人類血漿中的
APC 劑量反應研究

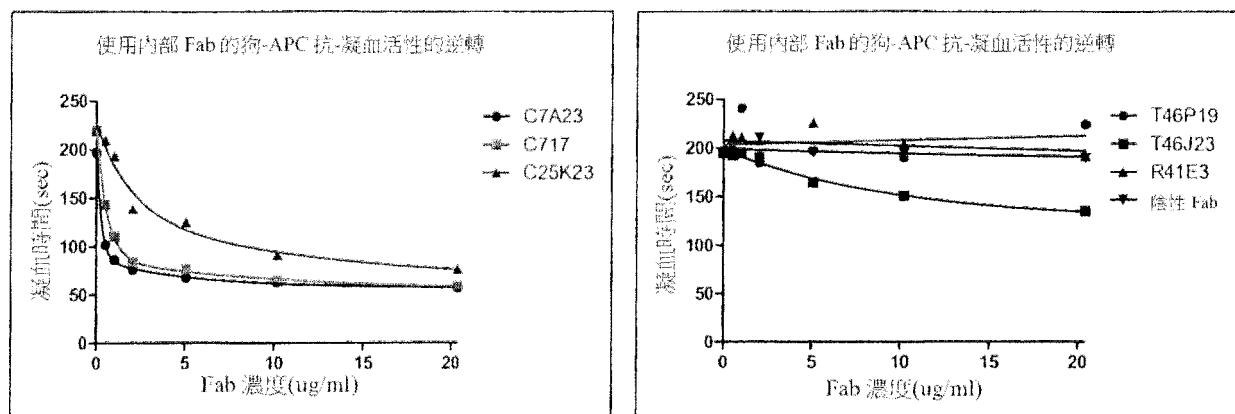


第 6 圖

使用內部 Fab 的 hu-APC 抗-凝血活性的逆轉



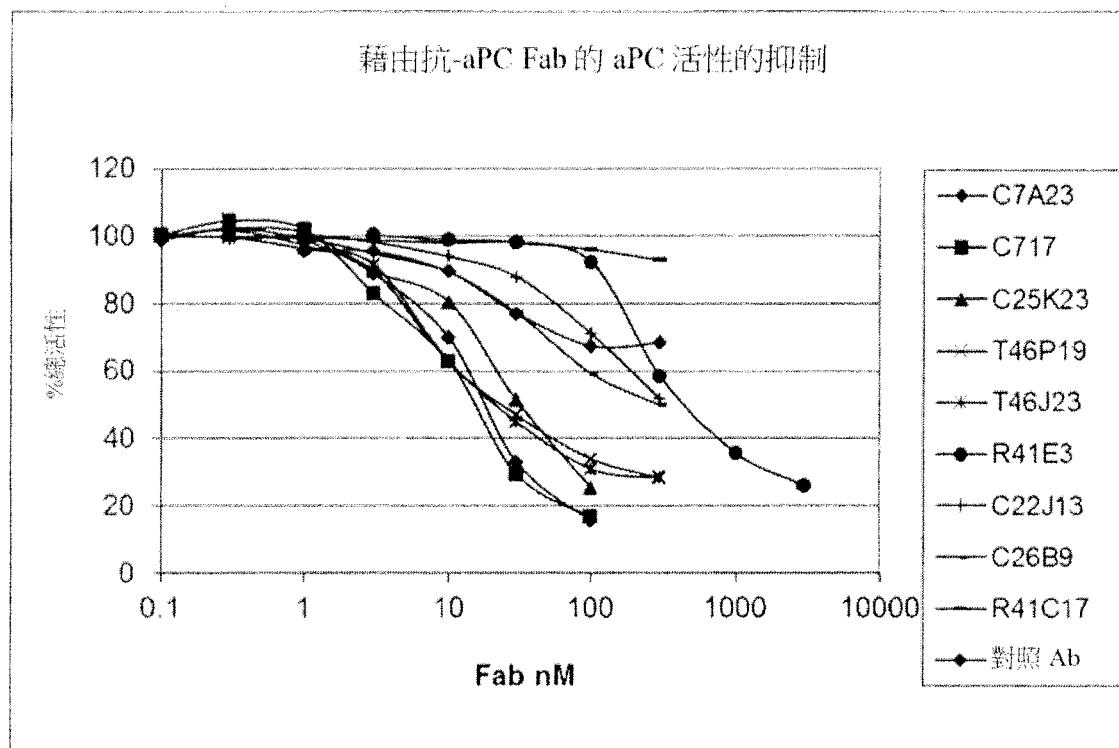
第 7 圖



狗-APC(400ng/ml)

Fab 濃度(ug/ml) (Fab:APC)	%抑制					
	C7A23	C717	C25K23	T46P19	T46J23	R41E3
20.4 (60:1)	95.56	95.16	84.61	0.00	41.48	0.00
10.2 (30:1)	91.59	92.14	75.90	0.00	30.50	0.00
5.08 (15:1)	88.11	84.35	55.77	0.00	21.12	0.00
2.04 (6:1)	82.50	80.27	47.25	0.00	3.45	0.00
1.02 (3:1)	75.32	64.44	15.22	0.00	0.62	0.00
0.51(1.5:1)	64.59	45.19	5.68	0.00	2.00	0.00
0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

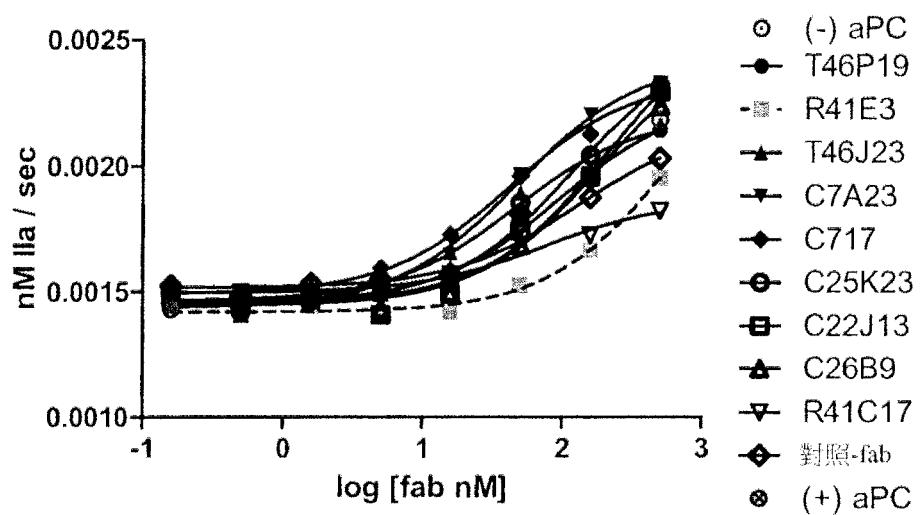
第 8 圖



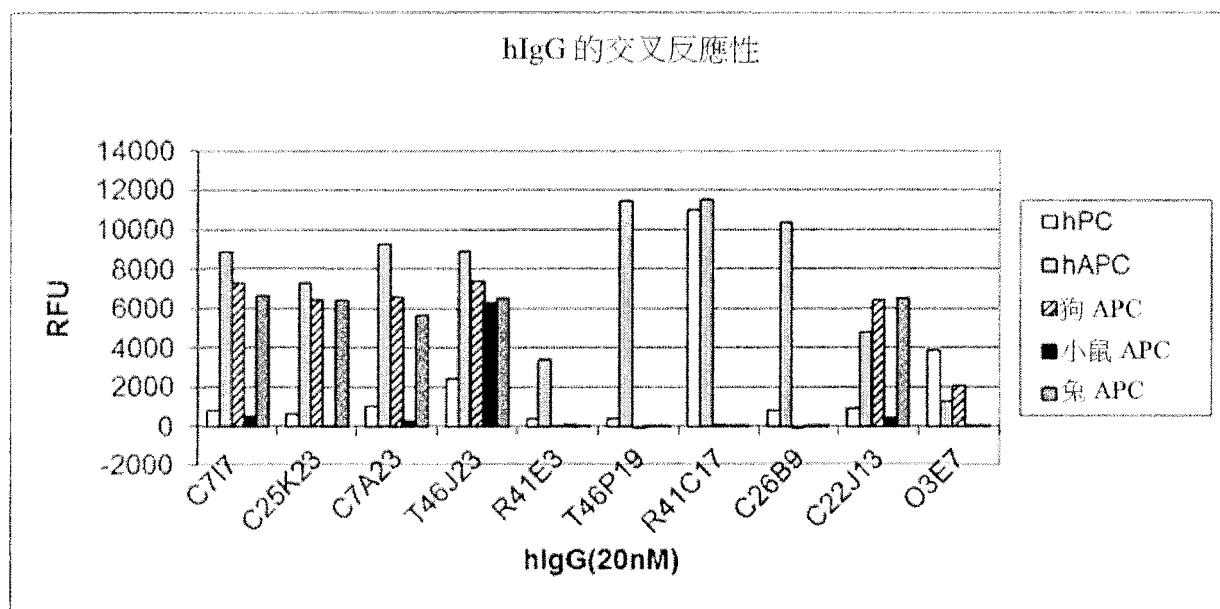
201429992

第 9 圖

500nM 最大 fab 濃度

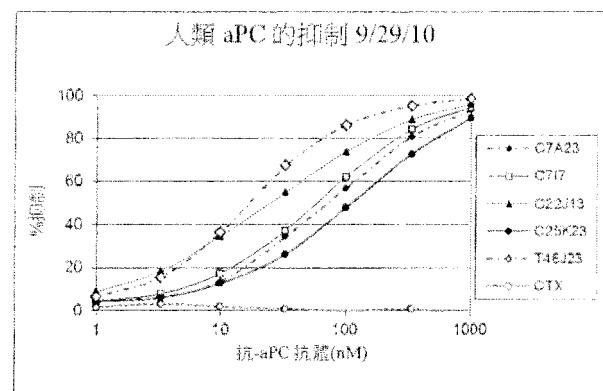


第 10 圖

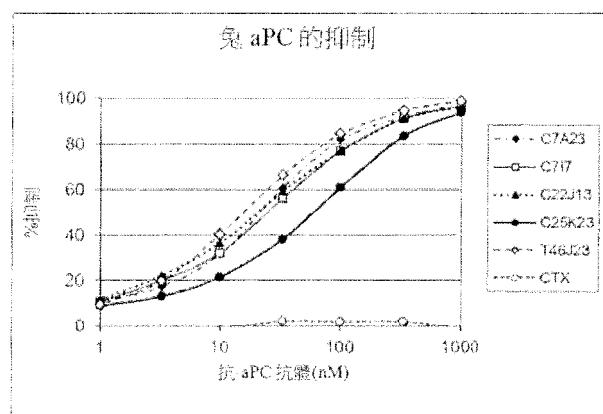


第 11 圖

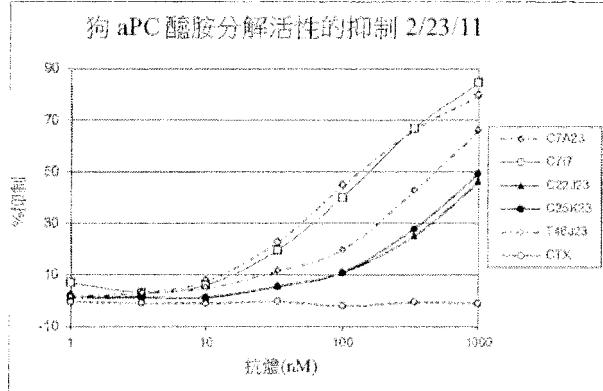
(a)



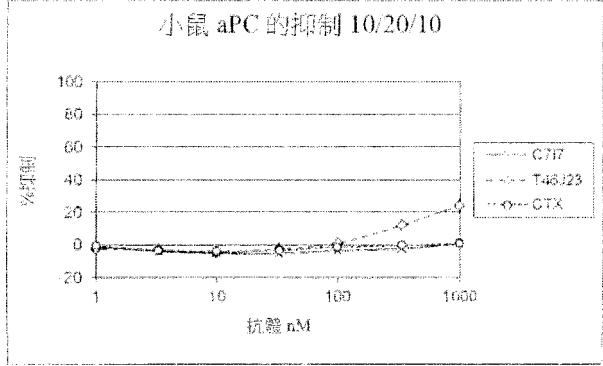
(b)



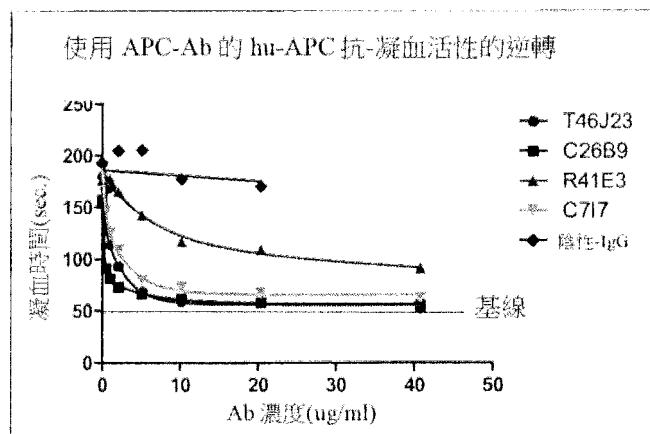
(c)



(d)



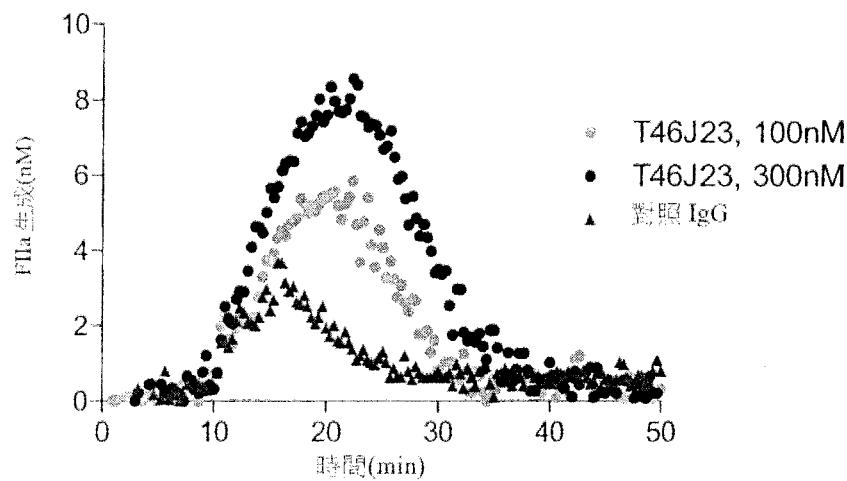
第 12 圖



Fab 濃度 ($\mu\text{g/ml}$) (Ab:APC)	凝血時間					%抑制				
	T46J23	C26B9	R41E3	C717	Neg-IgG	T46J23	C26B9	R41E3	C717	Neg-IgG
163.2 (163:1)										
81.6 (81:1)										
40.8 (40:1)	53	56		80.8		98.45	96.64	66.98	75.43	
20.4 (20:1)	57.9	58.2	91.5	109.2	62.6	94.67	94.53	53.00	89.33	16.07
10.2 (10:1)	59.1	62.0	117	124.4	73.2	93.74	90.89	46.84	85.04	10.88
5.08 (5:1)	68.8	66.3	142.4	177.8	79.6	86.24	86.77	26.78	80.30	-8.82
2.04 (2:1)	93.3	73.5	165.1	169	109	67.31	79.87	8.85	58.52	-8.39
1.02 (1:1)	114.1	81.5	177.5	124.8	174.4	51.24	72.20	-0.95	46.81	16.57
0.51 (0.5:1)	129.0	91.5	174.4	147.1	147.1	39.72	62.61	1.50	30.30	24.89
0	180.4	156.8	176.3	188	193.1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
50% F.A.T.	51.6	52.5	49.7	53.0	52.5					

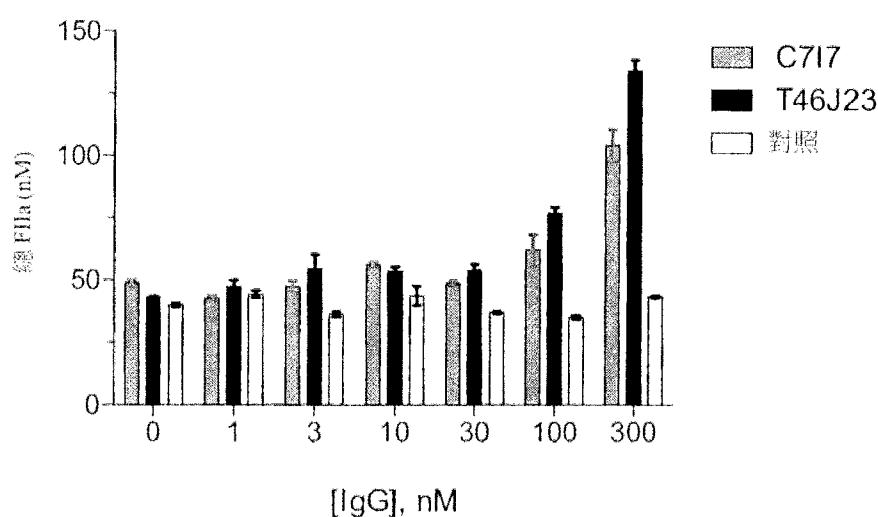
R41E3 於 APTT 分析中在抑制 hu-APC 方面比其他 IgG 還不有效

第 13 圖

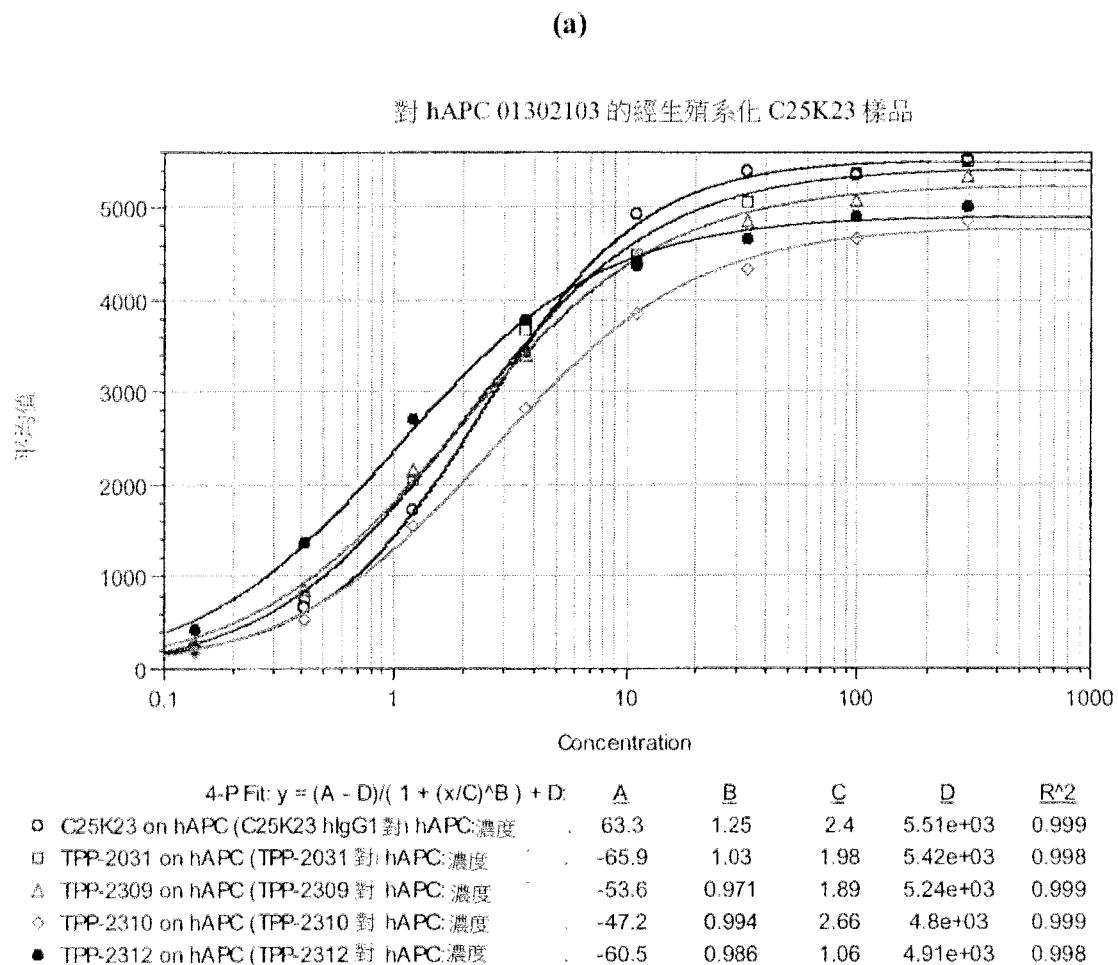


(b)

在缺乏 FVIII 的血漿中的凝血酶生成



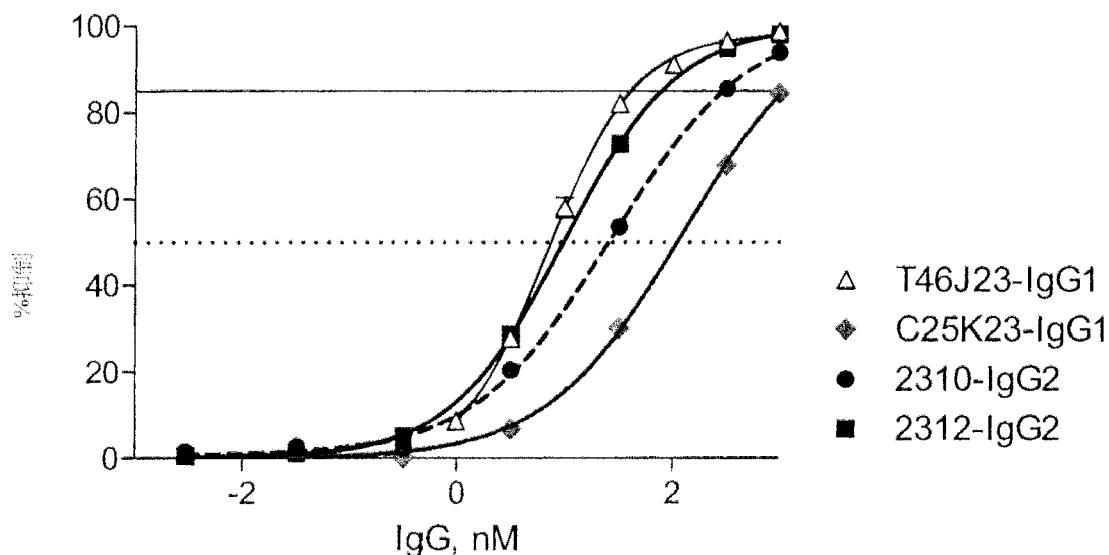
第 14 圖



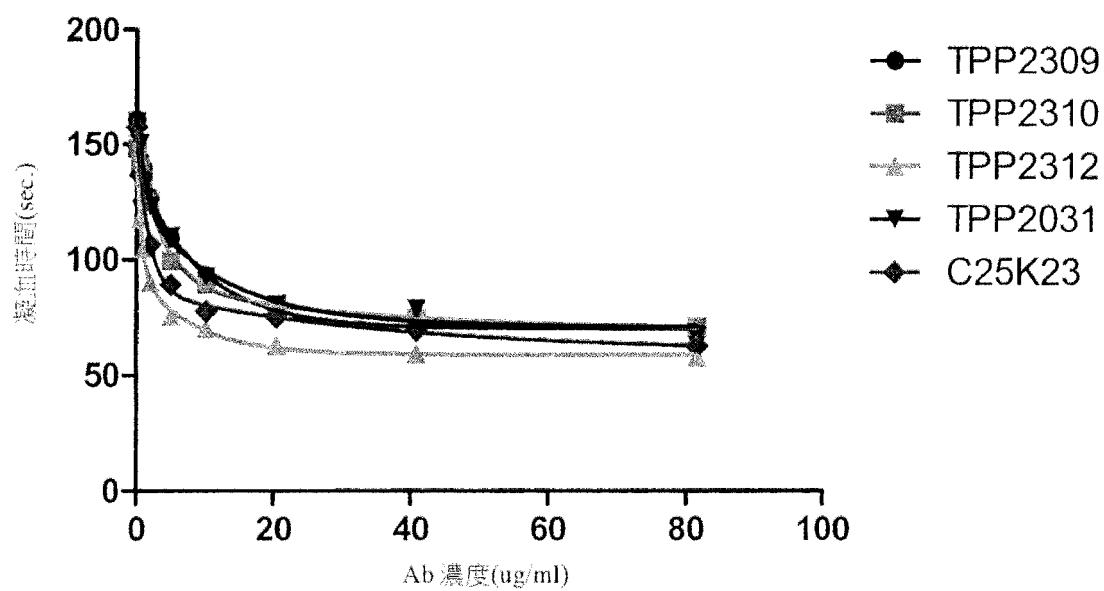
201429992

第 14 圖

(b)
人類 aPC 的抑制

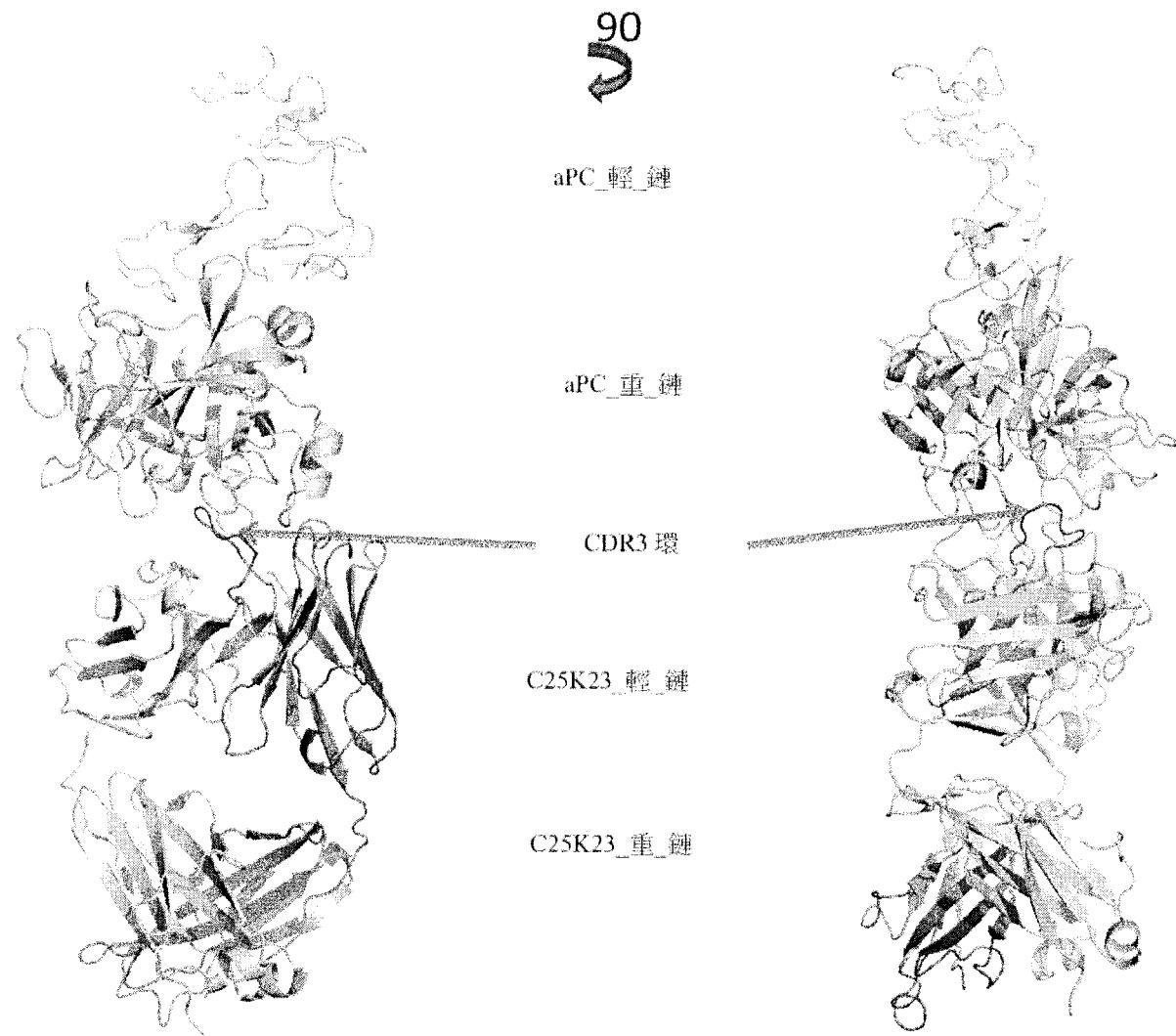


(c)
對抗 hu-APC 的 C25K23 生殖系變體



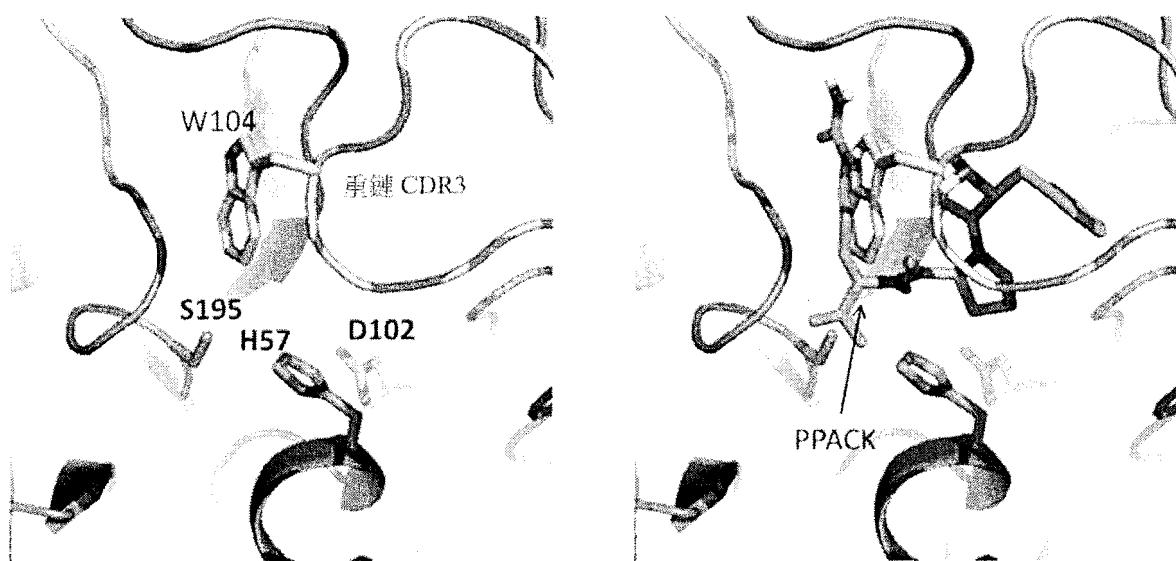
201429992

第 15 圖

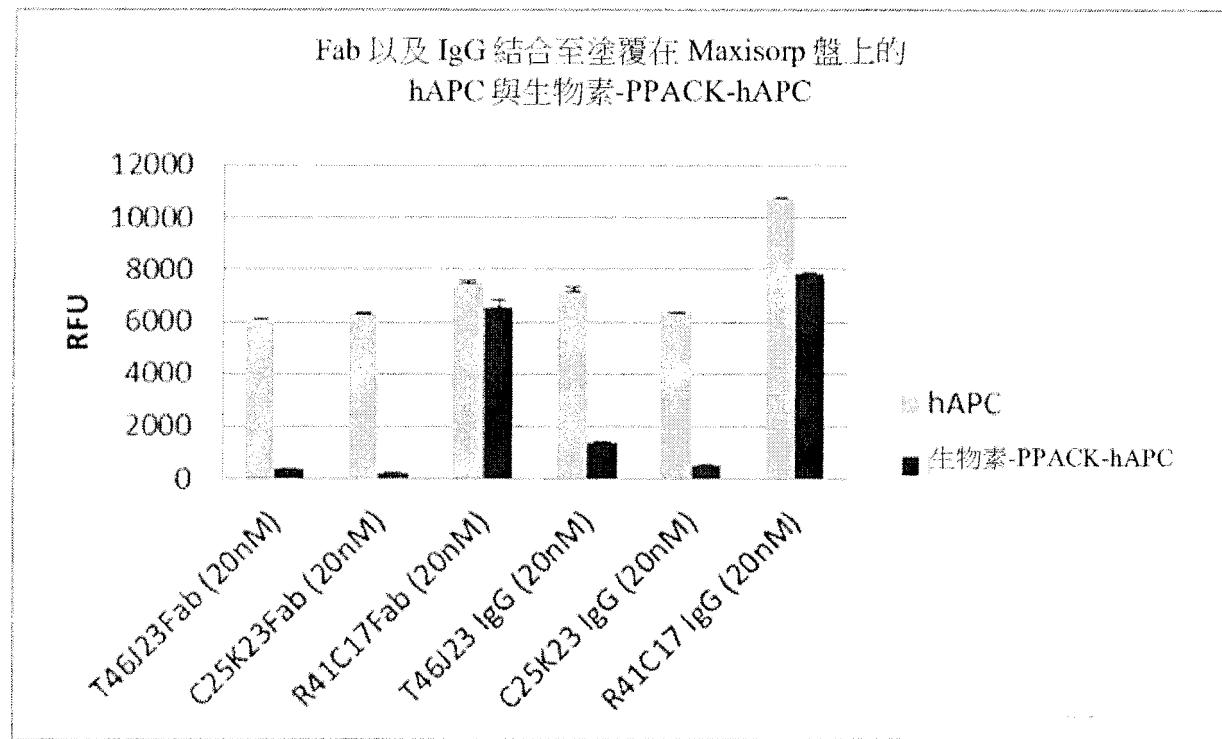


201429992

第 16 圖



第 17 圖



201429992

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無