(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103429256 B
(45)授权公告日 2022.09.13

(21)申请号 201280011375.7
(22)申请日 2012.03.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103429256 A
(43)申请公布日 2013.12.04
(30)优先权数据
11156682.4 2011.03.02 EP
61/449254 2011.03.04 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.09.02
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/053619 2012.03.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2012/117091 EN 2012.09.07
(73)专利权人 诺和诺德保健股份有限公司
地址 瑞士苏黎世
(72)发明人 I.希登 B.佩斯奇科
J.布雷恩霍特 M.科福德-汉森
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 孔青 李炳爱
(51)Int.Cl.
A61K 38/36(2006.01)
C07K 14/16(2006.01)
C07K 14/745(2006.01)
(56)对比文件
US 2004/0180409 A1,2004.09.16
US 7553936 B2,2009.06.30
WO 2009/140598 A1,2009.11.19
James L. Gattis et al..The Structure of the Extracellular Domain of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells Like Transcript-1 and Evidence for a Naturally Occurring Soluble Fragment.《J. Biol. Chem.》.2006,第281卷图3,图6.
审查员 马艳林
权利要求书1页 说明书105页
序列表192页 附图22页

(54)发明名称

凝血因子向活化的血小板上的TLT-1的靶向

(57)摘要

本发明涉及:促凝血蛋白,其可以是例如融合蛋白或化学缀合物;产生所述促凝血蛋白的方法;编码所述融合蛋白的多核苷酸和表达它们的细胞。此外,本发明涉及用作药物的促凝血蛋白。患有凝血病例如有或没有抑制剂的A型血友病和B型血友病的个体可用本发明的促凝血蛋白来治疗。

CN 103429256 B

1.促凝血蛋白,其包含:(i) 至少一种凝血因子,其共价地连接到(ii)单克隆抗体或其Fab片段,所述抗体或其片段能够特异性地结合(iii) TLT-1和/或其片段或变体,所述凝血因子选自FV多肽、FVII多肽、FVIII多肽、FIX多肽、FX多肽和FXI多肽,其中(ii)的表位包含SEQ ID NO: 2的K133、I134、G135、S136、L137、A138、N140、A141、F142、S143、D144、P145和A146,如使用X-射线晶体学测定的,其中(ii)的重链包含:

· SEQ ID NO: 40的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列;

· SEQ ID NO: 40的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYNPSLKD)的CDR2序列;和

· SEQ ID NO: 40的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列;

和其中(ii)的轻链包含:

· SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列;

· SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列;和

· SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列。

2.权利要求1的促凝血蛋白,其中(i)是FVII多肽。

3.权利要求1的促凝血蛋白,其中(i)是FIX多肽。

4.权利要求1-3中任一项的促凝血蛋白,其是(i)和(ii)的缀合物。

5.权利要求1-3中任一项的促凝血蛋白,其还包含介于(i)和(ii)之间的接头。

6.制备权利要求1的促凝血蛋白的方法,所述方法包括:(i) 将TLT-1单克隆抗体或其片段与接头的一个反应性基团(RS1)化学缀合,和(ii) 使凝血因子与所述接头的另一反应性基团(RS2)反应。

7.权利要求6限定的方法,其中所述接头是聚合物。

8.用作药物的权利要求1-5中任一项的促凝血蛋白。

9.用于治疗凝血病的权利要求1的促凝血蛋白。

10.权利要求9的促凝血蛋白,其中所述凝血病是有或没有抑制剂的A型血友病,或者有或没有抑制剂的B型血友病。

凝血因子向活化的血小板上的TLT-1的靶向

发明领域

[0001] 本发明涉及促凝血蛋白、编码促凝血融合蛋白的多核苷酸、表达促凝血融合蛋白的细胞、制备促凝血蛋白的方法和所述促凝血蛋白的用途。

[0002] 发明背景

[0003] 当内皮完整时，正常的静止血小板在血液循环中自由流动。当单层内皮障碍受损时，静止血小板借助于糖蛋白(GP)受体粘附至内皮下结构。例如，GPIaIIa和GPVI结合胶原；GPIcIIa结合纤连蛋白；GPIcIIa结合层粘连蛋白，且GPIb-V-IX结合von Willebrand因子(vWF)聚合物。与血管损伤之后暴露的血管外组织组分的粘附以及损伤部位局部所产生的因子(例如丝氨酸蛋白酶凝血酶)的影响，导致血小板的活化。在活化的复杂过程中，血小板改变形状并将某些磷脂暴露在它们的表面上。另外，在血小板活化之后，已经存在于血小板表面上呈静止状态的受体被活化。另外，血小板活化导致在静止状态中在胞内以α和致密颗粒储存的分子的释放和表面暴露。GPIIbIIIa是同时存在于静止血小板和活化血小板的表面的血小板受体的实例。GPIIbIIIa以闭合和失活构象存在于静止血小板上并在血小板活化期间呈现能够结合其配体(包括纤维蛋白原和纤维蛋白)的开放和活化构象。在静止血小板中在胞内以α颗粒储存、但在活化血小板表面释放和暴露的受体的实例是TREM-样转录物1 (TLT-1) (Washington等人, Blood, 104, 1042-1047 (2004), Gattis等人, Journal of Biological Chemistry, 281, 13396-13403 (2006))，这是本申请所涉及的。

[0004] 当内皮下携带组织因子(TF)的细胞暴露给血液循环组分时，引发凝血级联。TF向循环的凝血因子 VIIa (FVIIa)的暴露，触发形成少量凝血酶，其起到促凝血信号的作用，导致粘附到损伤部位的血小板的进一步募集和活化。凝血在活化的血小板表面被进一步传播和扩大，最终导致凝血酶产生的爆发，其继而导致纤维蛋白原的活化和聚合成为纤维蛋白纤维，交联和稳定了止血凝块。归因于凝血级联的若干组分的特征是它们特异性缔合活化的血小板的磷脂膜的能力。为此，FVIIa以及例如凝血因子IX和X (分别为FIX和FX)及其相应的活化形式(分别为FVIIa、FIXa和FXa)，具有富含γ-羧基谷氨酸的区域(Gla结构域)，其能将它们引导并结合到活化的血小板的表面。凝血因子VIII (FVIII)通过经由其轻链的结合与活化的血小板缔合。凝血因子 XI (FXI)结合到血小板上的机制尽管有很多争议，但越来越多的证据表明血小板影响FXI和FXIa并且FXI与血小板的结合需要FXI A3结构域中的残基(Emsley等人, 2010, Blood, Vol. 115, 第2569页)。

[0005] 膜结合强烈地增强了凝血因子例如FVIIa的活性。然而，它们与血小板膜的相互作用具有不同的亲和力。例如，FVIIa与血小板表面的结合常数(K_D)在低的微摩尔范围内。凝血因子的改进的血小板结合和在活化的血小板表面的定位可增强它们的活性。因此需要这样做的方法。

[0006] 在患有凝血病的受试者中，诸如在具有A、B或C型血友病的人中，由于例如功能性凝血因子不存在或存在不足，使得凝血级联的多个步骤出现功能障碍。这种一部分凝血的功能障碍导致血液凝固不充分，导致自发出血(例如关节内)和可能威胁生命的出血。

[0007] 本发明的一个目的是提供适合用作这样的受试者的促凝血药的化合物。本发明的

第二个目的是提供这样的促凝血分子:其与其源自的凝血因子相比具有增加的活性。本发明的第三个目的是提供这样的分子:其在生理上合适的微环境中上调血液凝固。本发明的第四个目的是提供这样的促凝血分子:其与其源自的凝血因子相比具有更长的半衰期。本发明的第五个目的是提供不会导致血小板计数下降的促凝血分子。本发明的另一个目的是将凝血因子引导至活化的血小板表面。本发明的一个特别的目的是在活化的血小板表面上增加FIXa和/或FXa的产生。因此,该目的使得能够在位于血管内或血管外的活化的血小板表面上引发血液凝固。

[0008] WO06/096828公开了包含可溶性的组织因子(sTF)和磷脂酰丝氨酸(PS)结合结构域(诸如膜联蛋白V)的嵌合蛋白。PS暴露于活化的细胞(诸如单核细胞、内皮细胞和发生细胞凋亡的细胞)的表面上,以及活化的血小板和静止的血小板上。所述嵌合蛋白既是促凝剂又是抗凝剂;后者是因为下述事实:即在更高的剂量,构建体与凝血因子竞争结合活化的血小板上的PS。因而,WO06/096828的嵌合蛋白具有与本文所述的促凝血蛋白不同的性质集合。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的促凝血蛋白被特异性靶向存在于损伤部位的活化的血小板。本发明的蛋白基于对在血小板膜上出现的组分表位和特定受体的鉴定,当血小板不再是静止的、而被活化或处于被活化的过程之中。因此,本发明涉及在活化的血小板的表面增强凝血的方法。

[0011] 本发明的促凝血蛋白包含:(i) 至少一种凝血因子,其共价地连接到(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合(iii)受体和/或其片段或变体,所述受体和/或其片段或变体在活化的血小板的表面上暴露并在静止血小板的表面上较低程度地暴露(和在某些测定中无法检出地暴露)。TLT-1是这类受体的一个实例且促凝血蛋白可例如结合到TLT-1(16-162)、TLT-1 (20-125)或TLT-1 (126-162)上。凝血因子可以是呈酶原形式的丝氨酸蛋白酶,例如FVII、FIX或FX或者相应的活化形式FVIIa、FIXa和FXa,或者丝氨酸蛋白酶的衍生物;FV或其衍生物、FVIII或其衍生物或者FXI或其衍生物。凝血因子和抗体或抗体片段任选通过接头的方式连接。本发明的促凝血蛋白可以是融合蛋白或化学缀合物。因此,本发明也涉及它们的制备。一种制备包含至少一种本发明的促凝血蛋白的组合物的方法涉及:(i)将TLT-1抗体或其片段与接头的一个反应性基团(RS1)化学缀合,和(ii) 使凝血因子与所述接头的另一反应性基团(RS2)反应。

[0012] 在这种情况下,所述接头可以是聚合物,例如聚乙二醇(PEG)。

[0013] 本发明也提供了下述的:分离的核苷酸序列,其编码根据本发明的任一促凝血蛋白;载体,其包含分离的核苷酸序列,该序列继而编码根据本发明的任一促凝血蛋白;分离的细胞,其包含编码本发明的任一促凝血蛋白的核苷酸序列;所述核苷酸序列继而可由细胞内载体表达。所述分离的细胞可以是真核细胞,诸如哺乳动物细胞,诸如BHK或CHO或HEK细胞。

[0014] 同样,本发明涉及用作药物和用于治疗凝血病的促凝血蛋白。在一个实施方案中,将治疗有效量的所述蛋白经肠胃外给予(诸如静脉内或皮下给予)有此需要的个体。这样的有需要的个体可能患有任何先天性的、获得性的和/或医源性的凝血病。

附图说明

[0015] *图1:*人TLT-1核苷酸序列和氨基酸序列。在图1中，显示了表示hTLT-1的核苷酸序列和氨基酸序列。在这里，核苷酸序列位置1-45编码预测的信号肽，在位置46-486处的核苷酸序列编码hTLT-1的胞外结构域，核苷酸序列位置487-555编码跨膜区，且在位置556-933处的核苷酸序列编码hTLT-1的细胞内结构域。

[0016] *图2:*表示含有C-端His-6标签的人TLT-1的胞外结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。在图2中，显示了表示具有C-端His标签的hTLT-1的胞外结构域的核苷酸序列和氨基酸序列。在这里，标有下划线的序列(7-15)指示kozak序列的位置，在位置16-60处的核苷酸序列编码预测的信号肽，在位置61-501处的核苷酸序列编码hTLT-1的胞外结构域，在位置502-519处的核苷酸序列编码6xHis标签(粗体)。也显示了限制性酶位点HindIII (在位置1-6处的核苷酸序列)和EcoRI (在位置523-528处的核苷酸序列)，用星号标记终止密码子(520-522)。

[0017] *图3A-D:* 0012LC和0012HC的可变结构域，包括Kabat编号：

[0018] 3A) 0012LC的可变结构域;3B) 0012LC的可变结构域- Kabat编号;3C) 0012HC的可变结构域;3D) 0012HC的可变结构域- Kabat编号。在图3A中，在位置1-57处的核苷酸序列编码LC信号肽序列;在位置58-396处的核苷酸序列编码0012LC的可变结构域。在图3B中，呈粗体和灰色的序列表示根据Kabat编号的0012LC CDR位置。在图3C中，在位置1-54处的核苷酸序列编码0012HC信号肽，在位置55-396处的核苷酸序列编码0012HC的可变结构域。在图3D中，呈粗体和灰色的序列表示根据Kabat编号的0012HC CDR位置。

[0019] *图4:* 0012LC的可变结构域以及人LC的恒定区κ和HPC4标签(由pTT-0012LC.HPC4编码)。在图4中，在位置1-57处的核苷酸序列编码LC信号肽，核苷酸序列58-396编码0012LC的可变结构域，核苷酸序列397-714编码人0012LC的恒定区κ，且核苷酸序列715-750编码HPC4标签。

[0020] *图5:* 0012HC的可变结构域以及人IgG4的恒定区(pTT-0012HC)。在图5中，核苷酸序列1-54编码HC信号肽，核苷酸序列55-396编码0012HC的可变结构域，且核苷酸序列397-1377编码人IgG4的恒定区(粗体)。

[0021] *图6:* 在存在和不存在mAb0023的情况下，HX分析的TLT-1肽的序列覆盖。在HX分析的肽(显示为水平条)的上面显示了hTLT-1的一级序列。在存在和不存在0023两种情况下显示出类似交换模式的肽用白色示出，而在0023结合后显示出减少的氘掺入的肽用黑色示出。

[0022] *图7:*在存在和不存在mAb0051的情况下，HX分析的TLT-1肽的序列覆盖。在HX分析的肽(显示为水平条)的上面显示了hTLT-1的一级序列。在存在和不存在0051两种情况下显示出类似交换模式的肽用白色示出，而在0051结合后显示出减少的氘掺入的肽用黑色示出。

[0023] *图8:*在存在和不存在mAb0062的情况下，HX分析的TLT-1肽的序列覆盖。在HX分析的肽(显示为水平条)的上面显示了hTLT-1的一级序列。在存在和不存在0062两种情况下显示出类似交换模式的肽用白色示出，在0062结合后显示出减少的氘掺入的肽用黑色示出。

[0024] *图9:*在存在和不存在mAb0061 (mAb0012)的情况下，HX分析的TLT-1肽的序列覆盖。在HX分析的肽(显示为水平条)的上面显示了hTLT-1的一级序列。在存在和不存在0061

两种情况下显示出类似交换模式的肽用白色示出，而在0061结合后显示出减少的氘掺入的肽用黑色示出。

[0025] *图10:*HX分析的TLT-1区域126-162的肽的序列覆盖。在HX分析的肽(显示为水平条)的上面显示了hTLT-1的一级序列。所有肽在mAb0061 (mAb0012)结合后显示出减少的氘掺入。

[0026] *图11A:* 在来自正常供体的人全血(HWB)中，经血栓弹力描记术(TEG)测定的FVIIa-Fab1029对TF-诱导的纤维蛋白血块形成的效应。在再钙化的HWB (曲线HWB)中的血块形成是由0.03 pM TF (Innovin®)诱导的。曲线“血友病”显示出延迟的和不充分的血块形成，当HWB中补充10 μg/ml抗FVIII抗体时。如所示的，其它曲线显示出当FVIII抗体所诱导的血友病样状况被不同浓度(0;0.25;0.5;1.0 nM) FVIIa-Fab1029或rFVIIa逆转时所得到的曲线。已经证明FVIIa-Fab1029的FVIII旁路活性(bypassing activity)比rFVIIa的更强。

[0027] *图11B:* 在来自正常供体的人全血(HWB)中，经血栓弹力描记术(TEG)测定的FVIIa-Fab1029对TF-诱导的纤维蛋白血块形成的效应。R-时间是根据图11A所示的实验的TEG迹线而测定。

[0028] 从正常供体中取出柠檬酸盐-稳定的人全血(HWB)。通过将HWB与10 μg/ml抗FVIII抗体(绵羊抗人因子VIII;Hematologic Technologies Inc)在室温温育30 min，得到血友病样状况。通过血栓弹力描记术(5000系列TEG分析仪, Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA)，测定血块形成。将不同浓度(0;0.25;0.5;1.0 nM)的FVIIa-Fab1029或rFVIIa加入血友病-样柠檬酸盐化的HWB中。当将340 μl正常的或血友病样的HWB转移至装有20 μl 0.2 M $CaCl_2$和0.03 pM 脂质化的TF (Innovin®, Dade Behring GmbH (Marburg, 德国)的血栓弹性描记器杯中时，开始凝血。连续跟踪TEG迹线多达120 min。记录下述TEG变量:R时间(凝血时间，即从开始凝血直到得到2 mm振幅的时间)、α-角(测量为R值和TEG迹线的拐点之间的角的血块发展)、K (达到某一水平的血块强度的凝血动力学速度，振幅= 20 mm)和MA (TEG迹线的最大振幅，其反映了血块的最大机械强度)。

[0029] *图12:*在来自正常供体的人全血(HWB)中，经血栓弹力描记术(TEG)测定的FIX-Fab0135对TF-诱导的纤维蛋白血块形成的效应。在复钙的HWB (曲线HWB)中的血块形成是由0.03 pM TF (Innovin®)诱导的。曲线“血友病”显示出延迟的和不充分的血块形成，当HWB中补充10 μg/ml抗FVIII抗体时。其它曲线显示出当FVIII抗体所诱导的血友病样条件被不同浓度(0.1;0.2;1.0;5.0;10 nM) FIX-Fab0135逆转时所得到的TEG迹线。显示了当FIX融合蛋白被1 nM rFVIIa或10 nM rFIX置换时所得到的TEG曲线，用于比较。

[0030] *图13:* FIX-Fab0135靶向富含TLT-1的磷脂囊泡明显地促进了在FVIII不存在时由FVIIa诱导的FX活化。将不同浓度(0.05 - 100 nM) rFVIIa在Hepes缓冲液(o)或在含有以下的Hepes缓冲液中温育15 min:10 nM FIX (□);10 nM FIXa (■)或10 nM FIX-Fab0135 (▲)。然后按照指示，在5 nM FVIII存在或不存在时，将其与100 nM FX和富含TLT-1的磷脂囊泡(1:4,000稀释)混合并温育3 min。用EDTA终止反应，并在显色测定中测定FXa的产生。

[0031] *图14:* TLT-1在人血小板上的表达。该图显示了在流式细胞术分析中，在正向和侧向散射通道上，在全血中的血小板上的TLT-1数量。在血小板通道内的平均荧光用于计算TLT-1数量，使用得自对检测抗体具有确定数量的结合位点的珠的标准曲线。用蛋白酶活化

的受体-1活化的肽SFLLRN (0.3-30 μM)，活化血小板。为了确保最大的TLT-1表达，SFLLRN (30 μM)和Convulxin (Cvlxn) (100 ng/ml)的组合用作对照。通过2种不同抗TLT-1抗体mAb0136 (左侧柱状图)和mAb0123 (右侧柱状图)来测定TLT-1表达。数据表示为平均值±sem，供血者的数量范围在不同组中为2-4。

[0032] *图15:* 在具有抗体诱导的血友病的TLT-1 KOKI小鼠中，与接受溶媒的血友病小鼠相比，FVIIa-Fab9015剂量-依赖性地减少出血时间(左)和血液损失(右)。20 nmol/kg FVIIa-Fab9015的剂量与20 nmol/kg rFVIIa相比明显更有效。

[0033] *图16:* 在给予FVIIa-Fab9015 (20或4 nmol/kg)、rFVIIa (20 nmol/kg)或溶媒的暂时血友病的TLT-1 KOKI小鼠中的血小板计数。在-5 min给予小鼠，从0到30 min观察出血，在诱导出血之后观察血小板计数120 min。

[0034] *图17A:* 柱状图显示由25 nM rFVIIa (未填充的柱)或FVIIa-Fab9015 (填充的柱)所产生的峰值凝血酶。在诱导的A型血友病条件(绵羊抗人FVIII多克隆抗体)下，用150000 plts/μl固定的血小板浓度，测定凝血酶的产生。通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin (100 ng/ml)活化血小板，开始反应。

[0035] *图17B:* 柱状图显示由5 nM rFVIIa (未填充的柱)或FVIIa-Fab9015 (填充的柱)所产生的峰值凝血酶。在A型血友病条件下，用150000 plts/μl固定的血小板浓度，测定凝血酶的产生。通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin (100 ng/ml)活化血小板，开始反应。

[0036] *图18:* 该图显示了FVIIa-Fab9015的效应依赖于血小板活化。将25 nM FVIIa-Fab9015加入到富含人血小板的血浆(150000 plts/μl)中，通过加入绵羊抗人FVIII抗体，使其具有A型血友病样。具有未活化的血小板的样品显示出不良凝血酶产生(点线)，PAR-1活化的肽SFLLRN (10 μM)导致凝血酶产生的若干增加(虚线)，而同时用SFLLRN (30 μM)和GPVI激动剂Convulxin (100 ng/ml)活化的血小板导致最大的凝血酶的产生(实线)。

[0037] *图19:* 该图显示了与用rFVIIa相比，用FVIIa-Fab9015所导致的凝血酶产生的增加，是TLT-1依赖性的。原始的迹线显示在富含人血小板的血浆(150000 plts/μl)中的凝血酶产生，通过加入绵羊抗人FVIII多克隆抗体，使其具有A型血友病样。通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin (100 ng/ml)，开始凝血酶的产生。正如迹线图所示，与rFVIIa (5 nM) (点线)相比，FVIIa-Fab9015 (5 nM) (实线)导致显著更大的凝血酶峰。通过将样品与可溶性TLT-1(100 nM)预温育，FVIIa-Fab9015 凝血酶的产生能力被显著地降低(虚线)。这证实了9015的效应依赖于TLT-1在活化的血小板上的结合。

[0038] *图20:* 该图显示与用rFIX相比，用FIX-Fab0155所导致的凝血酶产生的增加，是TLT-1依赖性的。原始的迹线显示在含有人血小板(150000 plts/μl)的FIX缺陷型血浆中的凝血酶产生。通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin (100 ng/ml)，开始凝血酶的产生。正如迹线图所示，与rFIX (灰线)相比，1 nM FIX-Fab0155 (实线)导致显著更大的凝血酶峰。可溶性TLT-1 (100 nM)的预温育显著地降低了FIX-Fab0155(虚线)的凝血酶的产生能力，证实了TLT-1的依赖性。

[0039] *图21:*在可溶性组织因子(sTF)存在下FVII-Fab5001融合蛋白的自活化。在磷脂(PC:PS)和sTF存在下测定蛋白水解活性。结果是两次独立测量的平均值并以相对k_{cat}/K_m值给出，与wtFVIIa相比。

[0040] *图22A:* TLT-1抗体(mAb0023、mAb0051、mAb0061、mAb0062)无一影响血小板聚集。该图显示出来自富含血小板的血浆中的透光测量的原始迹线图,其中血小板已被SFLLRN(1 μM)活化。在血小板活化之前,将样品与抗TLT-1抗体或无关对照抗体(10 nM)预先温育3 min。

[0041] *图22B:* TLT-1抗体(mAb0023、mAb0051、mAb0061、mAb0062) 无一影响血小板聚集。该图显示出来自富含血小板的血浆中的透光测量的原始迹线图,其中血小板已被SFLLRN(10 μM)活化。在血小板活化之前,将样品与抗TLT-1抗体或无关对照抗体(10 nM)预先温育3 min。

[0042] *图23:*在来自正常供体的人全血(HWB)中,经血栓弹力描记术(TEG)测定的FIX-mAb0145对TF-诱导的纤维蛋白血块形成的效应。显示了得自补充有不同浓度FIX-mAb0145或rFIX的正常HWB和"血友病"血的TEG迹线的R时间。

[0043] *图24:* 柱状图显示由25 nM FVIIa-Fab9015、FVIIa-Fab1029和FVIIa-Fab1001所产生的峰量凝血酶。与rFVIIa (25 nM)相比,所有3个构建体都显示出增加的效能。在诱导的A型血友病条件(绵羊抗人FVIII多克隆抗体)下,用150000 plts/μl固定的血小板浓度,测定凝血酶的产生。通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin(100 ng/ml)活化血小板,开始反应。柱状图显示峰凝血酶产生的平均值±SD (n=2-5)。

[0044] *图25:* 该图显示了与野生型rFVIIa相比,FVIIa-Fab5001的增加的效能。原始的迹线显示在含有洗过的人血小板(150000 plts/μl)的因子VIII缺陷型血浆中的凝血酶产生。在活化的样品中,通过加入PAR-1活化的肽SFLLRN (30 μM)和GPIV激动剂Convulxin (100 ng/ml),开始凝血酶的产生。正如迹线图所示,与野生型rFVIIa (25 nM) (点线)相比,FVIIa-Fab5001 (25 nM) (实线)导致大约4倍的凝血酶峰。用未活化的血小板(虚线)则效能没有增加。

[0045] 序列

[0046] 序列如下:

[0047] SEQ ID NO: 1提供了人(h)TLT-1的核苷酸序列。

[0048] SEQ ID NO: 2提供了hTLT-1的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO: 3提供了hTLT-1-His6的胞外结构域的核苷酸序列。

[0050] SEQ ID NO: 4提供了hTLT-1-His6的胞外结构域的氨基酸序列。

[0051] SEQ ID NO: 5-8提供了hTLT-1片段:hTLT-1.20-125、hTLT-1.16-162、hTLT-1.126-162和hTLT-1.129-142的氨基酸序列。

[0052] SEQ ID NO: 9提供了mAb 0012 LC的可变结构域的核苷酸序列。

[0053] SEQ ID NO: 10提供了mAb0012 LC的可变结构域的氨基酸序列。

[0054] SEQ ID NO: 11提供了0012 HC的可变结构域的核苷酸序列。

[0055] SEQ ID NO: 12提供了0012 HC的可变结构域的氨基酸序列。

[0056] SEQ ID NO: 13提供了mAb0012的重链的核苷酸序列。

[0057] SEQ ID NO: 14提供了mAb0012和Fab0012的轻链的核苷酸序列。

[0058] SEQ ID NO: 15提供了mAb0023的重链的核苷酸序列。

[0059] SEQ ID NO: 16提供了mAb0023和Fab0023的轻链的核苷酸序列。

[0060] SEQ ID NO: 17提供了mAb0051的重链的核苷酸序列。

[0061] SEQ ID NO: 18提供了mAb0051和Fab0051的轻链的核苷酸序列。

[0062] SEQ ID NO: 19提供了mAb0052的重链的核苷酸序列。

[0063] SEQ ID NO: 20提供了mAb0062的重链的核苷酸序列。

[0064] SEQ ID NO: 21提供了mAb0052、Fab0052和mAb0062的轻链的核苷酸序列。

[0065] SEQ ID NO: 22提供了mAb0061的重链的核苷酸序列。

[0066] SEQ ID NO: 23提供了mAb0082的重链的核苷酸序列。

[0067] SEQ ID NO: 24提供了mAb0061、Fab0061、mAb0082和Fab0082的轻链的核苷酸序列。

[0068] SEQ ID NO: 25提供了Fab0012 VH-CH1的核苷酸序列。

[0069] SEQ ID NO: 26提供了Fab0023 VH-CH1的核苷酸序列。

[0070] SEQ ID NO: 27提供了Fab0051 VH-CH1的核苷酸序列。

[0071] SEQ ID NO: 28提供了Fab0052 VH-CH1的核苷酸序列。

[0072] SEQ ID NO: 29提供了Fab0061 VH-CH1的核苷酸序列。

[0073] SEQ ID NO: 30提供了Fab0082 VH-CH1的核苷酸序列。

[0074] SEQ ID NO: 31提供了hIgG4 铰链-CH2-CH3的核苷酸序列。

[0075] SEQ ID NO: 32提供了mAb0012, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO: 33提供了mAb0012, LC (小鼠VL -人κ CL)和Fab0012, LC (小鼠VL -人κ CL)的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO: 34提供了mAb0023, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO: 35提供了mAb0023, LC (小鼠VL -人κ CL)和Fab0023, LC (小鼠VL -人κ CL)的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO: 36提供了mAb0051, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO: 37提供了mAb0051, LC (小鼠VL -人κ CL)和Fab0051, LC (小鼠VL -人κ CL)的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO: 38提供了mAb0052, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO: 39提供了mAb0052, LC (小鼠VL -人κ CL);Fab0052, LC (小鼠VL -人κ CL);mAb0062, LC (小鼠VL -人κ CL)的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO: 40提供了mAb0061, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO: 41提供了mAb0061, LC (小鼠VL -人κ CL);Fab0061, LC (小鼠VL -人κ CL)和mAb0082, LC (小鼠VL -人κ CL);Fab0082, LC (小鼠VL -人κ CL)的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO: 42提供了mAb0062, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO: 43提供了mAb0082, HC (小鼠VH-人IgG4 CH1-CH2-CH3)的氨基酸序

列。

[0087] SEQ ID NO: 44提供了Fab0012,小鼠VH -人IgG4 CH1的氨基酸序列。

[0088] SEQ ID NO: 45提供了Fab0023,小鼠VH -人IgG4 CH1的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO: 46提供了Fab0051,小鼠VH -人IgG4 CH1的氨基酸序列。

[0090] SEQ ID NO: 47提供了Fab0052,小鼠VH -人IgG4 CH1的氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO: 48提供了Fab0082,小鼠VH -人IgG4 CH1的氨基酸序列。

[0092] SEQ ID NO: 49-58提供了任选的接头L2-L10的氨基酸序列。任选的接头被编号，并列于表3中。

[0093] SEQ ID NO: 59提供了纯化标签HPC4的氨基酸序列。

[0094] SEQ ID NO: 60-145提供了在开发实施例4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、17、18、19、20、24、25所述的表达构建体的过程中使用的引物的核酸序列。

[0095] SEQ ID NO: 146提供了Fab0061 VH-CH1的氨基酸序列。

[0096] SEQ ID NO: 147提供了hIgG4-铰链-CH2-CH3的氨基酸序列。

[0097] SEQ ID NO: 148提供了His6标签的氨基酸序列。

[0098] SEQ ID NO: 149提供了hTLT-1.18-188的氨基酸序列。

[0099] SEQ ID NO: 150提供了引物编号1004的核酸序列。

[0100] SEQ ID NO: 151提供了引物编号1005的核酸序列。

[0101] SEQ ID NO: 152提供了Fab0100 HC的氨基酸序列。

[0102] SEQ ID NO: 153提供了Fab0100 LC的氨基酸序列。

[0103] SEQ ID NO: 154提供了野生型人因子FV的核酸序列。

[0104] SEQ ID NO: 155提供了野生型人因子FV的氨基酸序列。

[0105] SEQ ID NO: 156提供了野生型人因子FVII的核酸序列。

[0106] SEQ ID NO: 157提供了野生型人因子FVII的氨基酸序列。

[0107] SEQ ID NO: 158提供了野生型人因子FVIII的核酸序列。

[0108] SEQ ID NO: 159提供了野生型人因子FVIII的氨基酸序列。

[0109] SEQ ID NO: 160提供了野生型人因子FIX的核酸序列。

[0110] SEQ ID NO: 161提供了野生型人因子FIX的氨基酸序列。

[0111] SEQ ID NO: 162提供了野生型人因子FX的核酸序列。

[0112] SEQ ID NO: 163提供了野生型人因子FX的氨基酸序列。

[0113] SEQ ID NO: 164提供了野生型人因子FXI的核酸序列。

[0114] SEQ ID NO: 165提供了野生型人因子FXI的氨基酸序列。

[0115] SEQ ID NO: 166提供了0012LC.C36A-HPC4 DNA序列。

[0116] SEQ ID NO: 167提供了0012LC.C36A-HPC4氨基酸序列。

[0117] SEQ ID NO: 168提供了0012VH-CH1-HPC4 DNA序列。

[0118] SEQ ID NO: 169提供了0012VH-CH1-HPC4氨基酸序列。

[0119] SEQ ID NO: 170提供了0012VH.T60N-CH1-YGPPC DNA序列。

[0120] SEQ ID NO: 171提供了0012VH.T60N-CH1-YGPPC。

[0121] SEQ ID NO: 172提供了FIX-L4b-0012LC DNA序列。

[0122] SEQ ID NO: 173提供了FIX-L4b-0012LC 氨基酸序列。

[0123] SEQ ID NO: 174提供了0003 Fab-LC: 0062Fab-LC-HPC4的氨基酸序列。

[0124] SEQ ID NO: 175提供了0003 Fab-HC: 0062Fab-VH-CH1-YGPPC的氨基酸序列。

[0125] SEQ ID NO: 176提供了0197-0000-0074 Fab-HC: 0197-0000-0051Fab-VH-CH1-YGPPC的氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO: 177提供了0074 Fab-LC: 0051Fab-LC-HPC4的氨基酸序列。

[0127] SEQ ID NO: 178提供了0004 Fab-HC: 0023Fab-VH-CH1-YGPPC的氨基酸序列。

[0128] SEQ ID NO: 179提供了0004Fab-LC: 0023Fab-LC-HPC4的氨基酸序列。

[0129] SEQ ID NO: 180提供了人FVII-L4b-0062VH-CH1-HPC4的氨基酸序列。

[0130] SEQ ID NO: 181提供了人FVII 407C的氨基酸序列。

[0131] SEQ ID NO: 182提供了人FIX-L4b-0061LC的氨基酸序列。

[0132] 发明描述

[0133] 本发明的促凝血蛋白包含至少一种凝血因子或其功能变体，和抗体或其片段，所述抗体或其片段能够结合受体，所述受体仅存在(在该词的遍在的意义上)于正经历活化相关的形态和功能上改变的血小板或活化的血小板上。这类受体可源自静止血小板的α或致密颗粒，这类受体的一个具体实例是TREM-样转录物1 (TLT-1)。

[0134] 促凝血分子可以是融合蛋白。本文所用的术语“融合蛋白”是指通过原本编码单独的蛋白或肽或其片段的两个或更多个DNA序列的符合读框的连接而产生的蛋白。融合蛋白DNA序列的翻译将产生单个蛋白序列，其可具有源自原始蛋白或肽的每一个的功能性性质。编码融合蛋白的DNA序列可通过标准分子生物学方法而人工产生，例如进行重叠PCR或DNA连接和装配，在起始的5’-末端DNA序列中不包括终止密码子，而在3’末端DNA序列中保留终止密码子。可将所得融合蛋白DNA序列插入到标准宿主生物(例如细菌、酵母、真菌、昆虫细胞或哺乳动物细胞)中的支持异源融合蛋白表达的合适的表达载体中。

[0135] 融合蛋白可含有接头或间隔基的肽序列，其分隔限定融合蛋白的蛋白或肽部分。接头或间隔基的肽序列可有利于单个蛋白或肽部分的正确折叠并可使单个蛋白或肽部分更可能保留它们各自的功能性性质。在构成完整的融合蛋白DNA序列的单个DNA片段的符合读框的装配期间，即在重叠PCR或DNA连接期间，可将接头或间隔基的肽序列插入到融合蛋白DNA序列中。

[0136] 或者，本发明的促凝血蛋白可以是它们的组成性凝血因子和抗体对应物的缀合物，从而彼此独立地制备凝血因子和抗体，然后通过合成而连接。

[0137] 如上所述，本发明的促凝血分子可特异性地结合TREM-样转录物1 (TLT-1)。在髓样细胞上表达的触发受体(TREM)在不同髓样谱系的生物学中具有非常确定的作用，在先天性和适应性免疫的调节中起重要作用。TLT-1属于相同的蛋白家族，尽管TLT-1基因仅在单个谱系(即巨核细胞和凝血细胞(血小板))中表达，且排它地存在于巨核细胞和血小板的α-颗粒中。TLT-1是一种跨膜蛋白，其在α-颗粒释放后暴露于活化的血小板的表面。迄今为止，尚未在静止血小板的表面上或在任何其它细胞类型的表面上发现TLT-1。

[0138] 已知TLT-1的胞外部分由单个免疫球蛋白-样(Ig-样)结构域组成，所述结构域通过称作茎(stalk)的接头区与血小板细胞膜相连(Gattis等人, Jour Biol Chem, 2006, Vol. 281, No. 19, 第13396-13403页)。人TLT-1 (hTLT-1)的Ig-样结构域由105个残基组成，并通过37-氨基酸茎连接至膜上。因而，预期TLT-1的Ig-样结构域具有相当大的运动自

由。

[0139] hTLT-1的假定的跨膜区段的长度是20个氨基酸。TLT-1也具有基于细胞质的免疫-受体酪氨酸的抑制基序,其可起到细胞内信号转导基序的功能。

[0140] 尚未充分阐述TLT-1在血小板生物学中的作用;已经证明TLT-1结合纤维蛋白原并且认为,TLT-1在调节损伤部位处的凝血和炎症中起作用。已经报道了含有Ig-样结构域的TLT-1的可溶形式(Gattis等人, Jour Biol Chem, 2006, Vol. 281, No. 19, 第13396-13403页)。可溶性的TLT-1相对于血小板结合的TLT-1的具体功能有待确定。

[0141] Giomerarelli等人(Thrombosis and Haemostasis (2007) 97, 955-963)报道了使用噬菌体展示技术产生抗TLT-1 scFv分子。发现某些抗TLT-1 scFv分子抑制凝血酶-介导的人血小板聚集。因此,具有这类特征的抗TLT-1 scFc分子可具有抗血栓形成性质,类似于以下文献所述的抗GPIIb/IIIa scFv分子:Schwartz等人 (FASEB Journal, (2004), 18, 1704-1706)。

[0142] 本发明涉及包含连接到抗TLT-1抗体或其抗原结合片段(包括scFv)上的凝血因子的融合蛋白或缀合物。抗TLT-1抗体或其片段通过结合到TLT-1上,起到将所连接的凝血因子靶向到活化的血小板表面的作用,目的是将促凝血活性递送到活化的血小板表面。在这种情况下,对血小板聚集的抑制不是抗TLT-1抗体所期需的性质。因此,本发明的抗TLT-1抗体优选不干扰TLT-1的功能,尤其是不抑制血小板聚集。

[0143] 受体(例如TLT-1)包含作为本发明促凝血蛋白的有用靶标的表位。促凝血蛋白可结合可用于体内结合的TLT-1的任何部分,例如Ig-样结构域表面可接近的残基,或茎的部分。因此,融合蛋白可结合TLT-1 (20-125)、TLT-1 (16-162)、TLT-1 (126-162)和/或TLT-1 (129-142)内的一个或多个残基(括号中的数字是指SEQ ID NO: 2中的氨基酸残基)。

[0144] 在一个优选的实施方案中,促凝血蛋白结合TLT-1的茎,例如TLT-1 (126-162)或TLT-1 (129-142)的一个或多个残基。结合到TLT-1的茎的促凝血蛋白不大可能干扰Ig-样结构域的功能。在另一个优选的实施方案中,将凝血因子融合到抗体或其片段的C-端,将会把凝血因子甚至更有利地放置在活化的血小板的细胞表面,相对于FVII和FVIIa而言。

[0145] 在另一个优选的实施方案中,本发明的促凝血蛋白结合到TLT-1上,而不干扰血小板聚集。

[0146] 在另一个实施方案中,本发明的促凝血蛋白结合到TLT-1上,而不与纤维蛋白原竞争性结合到TLT-1上。

[0147] 关于本发明,TLT-1可来自任何脊椎动物,诸如任何哺乳动物,诸如啮齿动物(诸如小鼠、大鼠或豚鼠)、兔类动物(诸如兔)、偶蹄动物(诸如猪、牛、绵羊或骆驼)或灵长类动物(诸如猴或人类)。TLT-1优选地是人TLT-1。从产生功能性TLT-1蛋白的任何天然存在的基因型或等位基因,可翻译出TLT-1。一种人TLT-1的非限制性实例是SEQ ID NO. 2的多肽序列。SEQ ID NO: 2包括SEQ ID NO: 2的信号肽(残基1-15 (MGLTLLLLLLLGLEG),以及对应于SEQ ID NO: 2残基16-311的成熟TLT-1多肽。

[0148] 本发明的促凝血蛋白包含针对TLT-1而产生的抗体或其片段。所述抗体或其片段可或可不导致TLT-1的构象结构上的改变。此外,所述抗体或其片段可或可不导致胞内信号转导,作为结合到TLT-1上的结果。在一个实施方案中,所述抗体或其片段能够结合到TLT-1的茎上。因此,所述抗体或其片段利用天然产生的受体或其部分,以达到本发明独特的和由

本发明所提供的效果。

[0149] 本文所用的术语“抗体”是指源自种系免疫球蛋白序列的蛋白，其能够特异性结合到为TLT-1的抗原或其部分。该术语包括任何同种型(即IgA、IgE、IgG、IgM和/或IgY)的全长抗体及其任何片段或其单链。

[0150] 全长抗体通常包含至少4条多肽链，即，通过二硫键互相连接的两条重(H)链和两条轻(L)链。在药学上特别有兴趣的一种免疫球蛋白亚类是IgG家族，其可再分为同种型IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgG分子由通过两个或更多个二硫键交联的2条重链和2条轻链组成，每条轻链都通过二硫键与重链相连。一条重链可包含重链可变区(VH)和至多3个重链恒定(CH)区：CH1、CH2和CH3。一条轻链可包含轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。VH区和VL区还可进一步细分为超变区，称作互补决定区(CDR)，所述超变区中散布着更保守的区域，称作框架区(FR)。VH区和VL区通常由3个CDR和4个FR组成，从氨基端到羧基端按照以下顺序排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的超变区构成能与抗原(TLT-1)相互作用的结构域，而抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括但不限于免疫系统的不同细胞(效应细胞)、Fc受体和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0151] 促凝血蛋白的抗体组分可以是单克隆抗体。这样的抗体可以是嵌合抗体、CDR移植抗体、人抗体、人源化抗体或它们中的任一种的抗原结合部分。为了生产抗体，实验动物是合适的哺乳动物，例如山羊、兔、大鼠或小鼠。

[0152] 在结构方面，单克隆抗体用具有对特定表位有单一结合特异性和亲和力的单个分子物类来表示。通过多种众所周知的技术，可生产本发明促凝血蛋白的单克隆抗体(mAb)，所述技术包括常规的单克隆抗体方法学，例如，Kohler和Milstein (1975) *Nature* 256:495的标准的体细胞杂交技术，或B淋巴细胞的病毒或致癌转化。用于制备杂交瘤的优选动物系统是鼠系统。在小鼠中生产杂交瘤是非常确定的程序。免疫方案和分离用于融合的免疫的脾细胞的技术是本领域已知的。融合配偶体(例如，鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。

[0153] 为了生成生产合适的单克隆抗体的杂交瘤，可从免疫的小鼠分离脾细胞和/或淋巴结细胞，并与适当的永生化细胞系(诸如小鼠骨髓瘤细胞系)融合。可针对抗原-特异性的抗体的生产，筛选所得到的杂交瘤。可重新铺板分泌抗体的杂交瘤，再次筛选，如果仍然是合适的IgG阳性的，可通过有限稀释将单克隆抗体亚克隆至少2次。然后可在体外培养稳定的亚克隆，以在组织培养基中生成小量抗体，用于表征。

[0154] 通过重组方式，可制备、表达、产生或分离本发明的抗体，例如：(a)从动物(例如，小鼠)或由其制备的杂交瘤分离抗体，所述动物对于目标免疫球蛋白基因是转基因的或转染色体的，(b)从转化成表达目标抗体的宿主细胞(例如，从转染瘤)分离抗体，(c)从重组的、组合的抗体文库分离抗体，和(d)通过包含将免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列上的任何其它方式，制备、表达、产生或分离抗体。

[0155] 借助于前缀“mAb”以及4-位数编号，在本文中鉴别出在表1中所示的若干合适的单克隆抗体。因此，所述单克隆抗体可以是mAb0012或其变体。所述单克隆抗体可以是mAb 0023或其变体。所述单克隆抗体可以是mAb 0051或其变体。所述单克隆抗体可以是mAb 0061或其变体。所述单克隆抗体可以是mAb 0062或其变体。所述单克隆抗体可以是mAb 0082或其变体。

[0156] *表1:合适的单克隆抗体的非限制性实例*

[0157]

mAb ID	HC	LC
0012	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 33
0023	SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 35
0051	SEQ ID NO: 36	SEQ ID NO: 37
0052	SEQ ID NO: 38	SEQ ID NO: 39
0061	SEQ ID NO: 40	SEQ ID NO: 41
0062	SEQ ID NO: 42	SEQ ID NO: 39
0082	SEQ ID NO: 43	SEQ ID NO: 41

[0158] 术语抗体的“抗原结合部分”是指抗体的保留特异性地结合抗原(诸如本文所述的TLT-1或另一种靶受体)的能力的一个或多个片段。已经证实,抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段来实现。因此,促凝血蛋白的抗体组分可以是抗体片段,例如单克隆抗体片段。在术语抗体的“抗原结合部分”内包括的结合片段的实例,包括Fab片段、F(ab')$_2$片段、Fab'片段、Fd片段、Fv片段、ScFv片段、dAb片段和分离的互补决定区(CDR)。在术语抗体的“抗原结合部分”内也旨在包括单链抗体(诸如scFv)和重链抗体(诸如VHH)和骆驼抗体。使用本领域技术人员已知的常规技术,可得到这些抗体片段,且以与完整抗体相同的方式,可筛选所述片段的实用性。

[0159] “Fab”片段包括轻链的可变结构域和恒定区以及重链的可变结构域和第一恒定区(C_H1)。Fab'片段包括与重链或轻链连接的一个或多个羧基端二硫键。F(ab')$_{2抗}$体片段包含一对Fab片段,其通常在其羧基端附近通过铰链半胱氨酸共价连接。抗体片段的其它化学偶联也是本领域已知的。

[0160] “Fv”片段是这样的抗体片段:其含有完整的抗原识别和结合位点,并且通常包含一条重链和一条轻链的可变结构域的二聚体,其可共价性质地紧密缔合,例如在单链可变结构域片段(scFv)中。正是在这样的构型中,每个可变结构域的3个超变区相互作用,以限定V_H-V_L二聚体表面上的抗原结合位点。共同地,这6个超变区或其亚类将抗原结合特异性赋予抗体。然而,甚至仅包含对抗原具有特异性的3个超变区的单一可变结构域也具有识别和结合抗原的能力,尽管通常其亲和力比完整结合位点的亲和力低(Cai & Garen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6280-6285, 1996)。例如,天然产生的仅具有重链可变结构域(VHH)的骆驼抗体可结合抗原(Desmyter等人, *J. Biol. Chem.*, 277: 23645-23650, 2002;Bond等人, *J. Mol. Biol.* 2003;332: 643-655)。

[0161] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H区和V_L结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,Fv多肽进一步包含介于V_H区和V_L结构域之间的多肽接头,其能使scFv形成所需的结构,用于抗原结合。有关scFv的综述,参见Pluckthun, 1994, 载于: *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,* Vol. 113, Rosenburg和Moore 编著.Springer-Verlag, New York, 第269-315页。

[0162] 术语“双体(diabodies)”是指具有2个抗原结合位点的小抗体片段,其中片段包含在同一多肽链中的与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H) (V_H和V_L)。通过使用太短以至于不允许同一链上的两个可变结构域配对的接头,可变结构域被迫与另一链上的互补结构域配对,产生两个抗原结合位点。双体更充分地描述于例如EP 404,097;WO 93/

11161;和Hollinger等人, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 90:6444-6448。

[0163] 表述“线性抗体”是指Zapata等人, 1995, *Protein Eng.,* 8(10):1057-1062中描述的抗体。简而言之,这些抗体含有一对串联Fd区段(V_H-C_H1-V_H-C_H1),其与互补的轻链多肽一起,构成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0164] 本文所用的术语“单体(monobody)”是指具有重链可变结构域而没有轻链可变结构域的抗原结合分子。在轻链不存在时,单体可结合到抗原上并且通常具有3个超变区,例如称为CDRH1、CDRH2和CDRH3的CDR。重链IgG单体具有2个重链抗原结合分子,其通过二硫键连接。重链可变结构域包含一个或多个超变区,优选CDRH3或HVL-H3区。

[0165] 本文所用的术语“超变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。超变区包含来自“互补决定区”或”CDR”的氨基酸残基(定义为轻链可变结构域中的残基24-34 (L1)、50-56 (L2)和89-97 (L3)的序列以及重链可变结构域中的31-35 (H1)、50-65 (H2)和95-102 (H3)的序列);Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest,* 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))和/或来自 ″超变环″的那些残基(按结构来定义并且每种抗体都不同;参见例如:Chothia和Lesk, 1987, *J. Mol. Biol.* 196:901-917)。在一个实例中,HVL残基可包括轻链可变结构域中的26-32 (L1)、50-52 (L2)和91-96 (L3)以及重链可变结构域中的26-32 (H1)、53-55 (H2)和96-101 (H3)。

[0166] 在本发明的一个实施方案中,促凝血蛋白的TLT-1结合部分是Fab片段。借助于前缀“Fab”以及4-位数编号,在本文中鉴别出在表2中所示的若干合适的Fab片段。所述Fab片段可以是Fab0003或其变体。所述Fab片段可以是Fab0004或其变体。所述Fab片段可以是Fab0012或其变体。所述Fab片段可以是Fab0023或其变体。所述Fab片段可以是Fab0051或其变体。所述Fab片段可以是Fab0052或其变体。所述Fab片段可以是Fab0061或其变体。所述Fab片段可以是Fab0062或其变体。所述Fab片段可以是Fab0074或其变体。所述Fab片段可以是Fab0082或其变体。所述Fab片段可以是Fab0084或其变体。

[0167] *表2:合适的Fab片段的非限制性实例*

[0168]

Fab ID	VH-CH1	LC
Fab0003	SEQ ID NO: 175	SEQ ID NO: 174
Fab0004	SEQ ID NO: 178	SEQ ID NO: 179
Fab0012	SEQ ID NO: 44	SEQ ID NO: 33
Fab0023	SEQ ID NO: 45	SEQ ID NO: 35
Fab0051	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 37
Fab0052	SEQ ID NO: 47	SEQ ID NO: 39
Fab0061	SEQ ID NO: 146	SEQ ID NO: 41
Fab0074	SEQ ID NO: 176	SEQ ID NO: 177
Fab0082	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 41
Fab0084	SEQ ID NO: 171	SEQ ID NO: 167

[0169] 如上所述,本发明的抗体可以是人抗体或人源化抗体。本文所用的术语“人抗体”旨在包括具有这样的可变结构域的抗体:在所述可变结构域中,框架区和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果所述抗体含有恒定区,所述恒定区也源自人种系免疫球蛋白

序列。本发明的人抗体可包括不是由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机诱导或定点诱变或者通过体内体细胞突变导入的突变)。但是,本文使用的术语“人抗体”无意包括这样的抗体:其中源自另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经被移植到人框架序列上。

[0170] 这样的人抗体可以是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可由杂交瘤生产,所述杂交瘤包括从转基因的非人动物(例如,转基因的小鼠)得到的B细胞,所述动物的基因组包含与永生化细胞融合的人重链转基因和轻链转基因。

[0171] 可如下制备人抗体:体外免疫人淋巴细胞,随后用EB病毒转化淋巴细胞。

[0172] 术语“人抗体衍生物”是指人抗体的任何修饰形式,例如,所述抗体和另一种药剂或抗体的缀合物。

[0173] 本文的术语“人源化的抗体”是指这样的抗体:其中源自另一个哺乳动物物种(诸如小鼠)种系的CDR序列已经移植到人框架序列上。可在人框架序列内进行额外的框架区修饰。

[0174] 通过例如标准ELISA或蛋白质印迹,可测定本发明的抗体对靶蛋白的结合。也可使用ELISA测定,筛选对靶蛋白显示出阳性反应性的杂交瘤。也可通过监测抗体与表达靶蛋白的细胞的结合,例如通过流式细胞术,测定抗体的结合特异性。

[0175] 通过测定抗体是否结合其它蛋白,可进一步研究本发明的抗体对靶蛋白的特异性。例如,在希望生产特异性地结合TLT-1或TLT-1的特定部分(例如表位)的抗体的情况下,可如下评估抗体的特异性:测定所述抗体是否也结合其它分子或缺少目标部分的TLT-1修饰形式。

[0176] 通过相应的单克隆抗体的截短,例如通过从多肽的N和/或C端末端去除一个或多个氨基酸,可制备根据本发明的多肽或抗体“片段”。以此方式,可从N和/或C末端去除最多10个、最多20个、最多30个、最多40个或更多个氨基酸。通过一个或更多个内部缺失,也可产生片段。

[0177] 关于本发明,“表位”是指这样的抗原(Ag)区域或区:它是在活化的血小板表面上的分子结构,促凝血蛋白的抗体(Ab)部分能够特异性地结合它,即与Ab物理接触的区域或区。抗原的表位可包含Ag的直接参与结合Ab的氨基酸残基(表位的免疫显性组分)和不直接参与结合的其它氨基酸残基,诸如被Ab有效地阻断的Ag的氨基酸残基(换言之,所述氨基酸残基是在Ab的“溶剂排斥表面”和/或“脚印”内)。术语表位在本文中包括受体的任何特定区中的两类结合位点,诸如特异性地结合抗-TLT-1抗体的TLT-1,或其片段,除非另有说明(例如,在有些上下文中,本发明涉及直接结合特定氨基酸残基的抗体)。诸如TLT-1等受体可包含许多不同的表位,所述表位可包括但不限于:(1)线性的肽表位,(2)构象的表位,其包括在成熟的受体构象中彼此靠近的一个或多个非连续氨基酸;和(3)翻译后的表位,其全部或部分地包括共价地连接TLT-1的分子结构,诸如碳水化合物基团。

[0178] 使用多种实验和计算表位作图方法,可在不同的详细水平定义和表征给定抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位。实验方法包括诱变、X-射线晶体学、核磁共振(NMR)波谱学、氢氘交换质谱法(HX-MS)和各种竞争结合方法。由于每种方法依赖于独特的原理,表位的描述与用于测定它的方法紧密相关。因而,根据采用的表位作图方法,不同地定义给定Ab/Ag对的表位。

[0179] 在其最详细的水平，通过定义在Ag-Ab相互作用中存在的原子接触的空间坐标，以及关于它们对结合热力学的相对贡献的信息，可定义Ag和Ab之间的相互作用的表位。在详细度更低的水平，通过定义Ag和Ab之间的原子接触的空间坐标，可表征表位。在详细度进一步更低的水平，通过它包含的氨基酸残基(由特定标准限定，例如Ab和Ag中的原子之间的距离)，可表征表位。在详细度进一步更低的水平，通过功能，例如通过与其它Ab的竞争结合，可表征表位。也可更一般地将表位定义为包含这样的氨基酸残基：其被另一种氨基酸的取代会改变Ab和Ag之间的相互作用特性。

[0180] 在X-射线衍生的晶体结构(由Ab(例如Fab片段)与其Ag之间的复合物的空间坐标限定)的上下文中，除非另外指出或上下文相矛盾，术语表位在本文中被具体地定义为，特征在于在距Ab中的重原子4Å距离内具有重原子(即非氢原子)的血小板受体残基。

[0181] 根据在不同详细水平得到表位的描述和定义(依赖于使用的表位作图方法)，可类似地在不同详细水平对不同Ab在相同Ag上的表位进行比较。

[0182] 如果表位含有相同的氨基酸残基集合，则认为在氨基酸水平描述(例如从X-射线结构测定)的表位是相同的。如果表位共有至少一种氨基酸，则认为表位是重叠的。如果表位不共有氨基酸残基，则认为表位是单独的(独特的)。

[0183] 如果对应的Ab的结合是互相排斥的，即如果一种Ab的结合排斥另一种Ab的同时结合，则认为通过竞争结合表征的表位是重叠的。如果Ag能够适应两种对应的Ab同时结合，则认为表位是单独的(独特的)。此外，有这样的例子：一个或多个抗体不具有重叠表位，但不能同时结合。因为抗原的三级和四级结构，一个抗体可能因先前结合另一抗体而不能接近其表位。

[0184] 本发明的促凝血蛋白可能够结合与mAb0012相同的表位。促凝血蛋白可能够结合与mAb0023相同的表位。促凝血蛋白可能够结合与mAb0051相同的表位。促凝血蛋白可能够结合与mAb0061相同的表位。促凝血蛋白可能够结合与mAb0062相同的表位。促凝血蛋白可能够结合与mAb0082相同的表位。

[0185] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基：SEQ ID NO: 4的K133、I134、G135、S136、L137、A138、N140、A141、F142、S143、D144、P145和A146 (对应于SEQ ID NO: 2的K133、I134、G135、S136、L137、A138、N140、A141、F142、S143、D144、P145和A146)。

[0186] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基：SEQ ID NO: 5的V17、Q18、C19、H20、Y21、R22、L23、Q24、D25、V26、K27、A28、L63、G64、G65、G66、L67、L68、G89、A90、R91、G92、P93、Q94、I95和L96 (对应于SEQ ID NO: 2的V36、Q37、C38、H39、Y40、R41、L42、Q43、D44、V45、K46、A47、L82、G83、G84、G85、L86、L87、G108、A109、R110、G111、P112、Q113、I114和L115)。

[0187] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基：SEQ ID NO: 5的L36、P37、E38、G39、C40、Q41、P42、L43、V44、S45、S46、A47、V73、T74、L75、Q76、E77、E78、D79、A80、G81、E82、Y83、G84、C85、M86、R91、G92、P93、Q94、I95、L96、H97、R98、V99、S100和L101 (对应于SEQ ID NO: 2的L55、P56、E57、G58、C59、Q60、P61、L62、V63、S64、S65、A66、V92、T93、L94、Q95、E96、E97、D98、A99、G100、E101、Y102、G103、C104、M105、R110、G111、P112、Q113、I114、L115、H116、R117、V118、S119和L120)。

[0188] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基：SEQ ID NO: 5的V17、Q18、C19、H20、Y21、R22、L23、Q24、D25、V26、K27、A28、R91、G92、P93、Q94、I95、L96、H97、R98、V99、S100和

L101 (对应于SEQ ID NO: 2的V36、Q37、C38、H39、Y40、R41、L42、Q43、D44、V45、K46、A47、R110、G111、P112、Q113、I114、L115、H116、R117、V118、S119和L120)。

[0189] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基:SEQ ID NO: 7的E5、T6、H7、K8、I9、G10、S11、L12、A13、E14、N15、A16、F17、S18、D19和P20 (对应于SEQ ID NO: 2的E130、T131、H132、K133、I134、G135、S136、L137、A138、E139、N140、A141、F142、S143、D144和P145)。

[0190] 所述表位可包含一个或多个选自下述的残基:SEQ ID NO: 7的K8、I9、G10、S11、L12、A13、N15、A16、F17、S18、D19、P20和A21 (对应于SEQ ID NO: 2的K133、I134、G135、S136、L137、A138、N140、A141、F142、S143、D144、P145和A146)。

[0191] 通过反转角度,从上面“表位”的定义衍生出术语“互补位”的定义。因而,术语“互补位”是指Ag特异性地结合(即与Ag发生物理接触的)的Ab的区域或区。

[0192] 所述互补位可包含一个或多个选自下述的残基:抗TLT-1 轻(L)链(SEQ ID NO: 33)的H50、N52、Y56、H58、Y73、F79、S115、T116、V118和Y120,和抗TLT-1重(H)链(SEQ ID NO: 32)的残基V20、F45、R49、Y50、W51、E68、T75、N77、S116、G117、V118和T120。

[0193] 在X-射线衍生的晶体结构(由Ab(例如Fab片段)和它的Ag之间的复合物的空间坐标限定)的上下文中,除非另外指出或上下文相矛盾,术语互补位在本文中被具体地定义为,特征在于在距血小板受体中的重原子4 Å距离内具有重原子(即非氢原子)的Ag残基。

[0194] 通过常规方法,可鉴别给定的抗体(Ab)/抗原(Ag)对的表位和互补位。例如,通过评估抗体结合TLT-1的不同片段或变体的能力,可测定表位的大概位置。使用常规方法,诸如在实施例中描述的那些方法,也可测定在TLT-1内与抗体(表位)接触的具体氨基酸和在抗体内与TLT-1 (互补位)接触的具体氨基酸。例如,可组合抗体和靶分子,并可使Ab/Ag复合物结晶。可测定复合物的晶体结构,并用于鉴别抗体和它的靶标之间相互作用的特异性位点。

[0195] 以它们的互补决定区(CDR)的方式,也可定义包含抗体或其片段的融合蛋白。术语“互补决定区”或“超变区”在本文中指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。互补决定区或“CDR”通常包含在轻链可变结构域中的氨基酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)和89-97 (L3)以及在重链可变结构域中的氨基酸残基31-35 (H1)、50-65 (H2)和95-102 (H3);(Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, 美国卫生和人类服务部, NIH Publication No. 91-3242)和/或来自“超变环”的那些残基(轻链可变结构域中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2)和91-96 (L3),和重链可变结构域中的残基26-32 (H1)、53-55 (H2)和96-101 (H3);Chothia和Lesk, J. Mol. Biol 1987;196:901-917)。通常,通过Kabat等人(同上)所述的方法,对该区域中的氨基酸残基编号。诸如“Kabat位置”、“Kabat残基”和“根据Kabat”等短语在本文中指重链可变结构域或轻链可变结构域的该编号系统。使用Kabat编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可含有更少的或额外的氨基酸,所述氨基酸与可变结构域的FR或CDR的缩短或插入相对应。例如,重链可变结构域可包括在CDR H2的残基52后面的氨基酸插入(根据Kabat,残基52a、52b和52c)和在重链FR残基82后面插入的残基(例如,根据Kabat,残基82a、82b和82c等)。通过比对抗体序列的同源性区域和“标准的”Kabat编号的序列,可确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0196] 术语“框架区”或“FR”残基是指,不是在本文定义的CDR内的那些VH或VL氨基酸残基。

[0197] 在一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的重链包含:

[0198] · SEQ ID NO: 34的氨基酸50-54 (DYFMY)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0199] · SEQ ID NO: 34的氨基酸69-85 (YISNGGDSSSYPDTVKG)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0200] · SEQ ID NO: 34的氨基酸118-129 (NKNWDDYYDMDY)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代。

[0201] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的轻链包含:

[0202] · SEQ ID NO: 35的氨基酸44-60 (kssqsllnsrtrknyla)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0203] · SEQ ID NO: 35的氨基酸76-82 (WASTRES)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0204] · SEQ ID NO: 35的氨基酸115-122 (KQSYNLLT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代。

[0205] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的重链包含:

[0206] · SEQ ID NO: 36的氨基酸50-54 (dysmh)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0207] · SEQ ID NO: 36的氨基酸69-85 (vistyygdvrynqkfkg)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0208] · SEQ ID NO: 36的氨基酸118-129 (apmittgawfay)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代

[0209] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的轻链包含:

[0210] · SEQ ID NO: 37的氨基酸44-54 (KASQSVSNDVA)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0211] · SEQ ID NO: 37的氨基酸70-76 (YASSRYT)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0212] · SEQ ID NO: 37的氨基酸109-117 (QQDYSSPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代

[0213] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的重链包含:

[0214] · SEQ ID NO: 42的氨基酸50-54 (shwie)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0215] · SEQ ID NO: 42的氨基酸69-85 (eilpgsgntnynekfkg)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0216] · SEQ ID NO: 42的氨基酸118-130 (gyyglnydwyfdv)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代。

[0217] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的轻链包含:

[0218] · SEQ ID NO: 39的氨基酸44-54 (rasqdisnyln)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0219] · SEQ ID NO: 39的氨基酸70-76 (ytsrlhs)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1

个或2个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0220] · SEQ ID NO: 39的氨基酸109-117 (qqdtklpyt)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代。

[0221] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的重链包含:

[0222] · SEQ ID NO: 40的氨基酸49-53 (rywmt)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0223] · SEQ ID NO: 40的氨基酸68-84 (einpdsstinyNpslkd)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0224] · SEQ ID NO: 40的氨基酸117-121 (gvfts)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代。

[0225] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的轻链包含:

[0226] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (rssqslvhrngntyfh)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0227] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (kvsnrfs)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0228] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (sqsthvpyt)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代。

[0229] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的重链包含:

[0230] · SEQ ID NO: 32的氨基酸49-53 (rywmt)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0231] · SEQ ID NO: 32的氨基酸68-84 (einpdsstinyTpslkd)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0232] · SEQ ID NO: 32的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个、2个或3个可被不同的氨基酸取代。

[0233] 在另一个实施方案中,对于本发明的促凝血蛋白,抗体或其片段的轻链包含:

[0234] · SEQ ID NO: 33的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个、2个、3个或4个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0235] · SEQ ID NO: 33的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代;和/或

[0236] · SEQ ID NO: 33的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同的氨基酸取代。

[0237] 对于本发明的促凝血蛋白,单克隆抗体或其片段可以是糖基化变体。抗体的糖基化变体是这样的变体:其中抗体的糖基化模式被改变。改变是指删除抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分,向抗体中添加一个或多个碳水化合物部分,改变糖基化组成(糖基化模式)、糖基化程度。

[0238] 在抗体恒定区的保守位置对其进行糖基化(Jefferis和Lund, *Chem. Immunol.* 1997;65:111-128;Wright和Morrison, *Trends Biotechnol.* 1997;15:26-32)。免疫球蛋白的寡糖侧链可影响蛋白的功能(Boyd等人, *Mol. Immunol.* 1996;32:1311-1318),而且糖蛋白各部分之间的分子内相互作用可影响糖蛋白的构象和所呈现的三维表面。根据特异

性识别结构，寡糖也可起到将指定糖蛋白靶向某些分子的作用。例如，已经报道在无半乳糖基化IgG中，寡糖部分“弹出(flip)”CH2间空间且末端N-乙酰基葡糖胺残基变成可用于结合甘露糖结合蛋白(Malhotra等人, Nature Med. 1995;1:237-243)。通过糖肽酶去除来自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞所产生的CAMPATH-1H (一种重组人源化鼠单克隆IgG1抗体，其识别人淋巴细胞的CDw52抗原)的寡糖，导致补体介导的溶解作用(CMCL)的完全减少(Boyd等人, *Mol. Immunol*. 1996;32:1311-1318)，而使用神经氨酸酶选择性去除唾液酸残基却不会损失DMCL。也已经报道了抗体的糖基化影响抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。具体地讲，具有β(1,4)-N-乙酰基葡糖胺基转移酶III (GnTIII，一种催化形成二等分GlcNAc的糖基转移酶)的四环素调控的表达的CHO细胞据报道具有改进的ADCC活性(Umana等人，*Nature Biotech*. 1999;17:176-180)。

[0239] 抗体的糖基化通常是N-连接的或O-连接的。N-连接的是指碳水化合物部分连接到天冬酰胺残基的侧链上。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸)，是碳水化合物部分与天冬酰胺侧链的酶促连接的识别序列。因此，这些三肽序列中任一个在多肽中的存在，建立了潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰基半乳糖胺、半乳糖、或木糖中的一个与羟基氨基酸(通常是丝氨酸或苏氨酸，尽管5-羟基脯氨酸或5-羟基赖氨酸也可使用)的连接。

[0240] 通过改变氨基酸序列，使得它含有上述三肽序列中的一个或多个，可便利地完成将糖基化位点添加到抗体上(对于N-连接的糖基化位点)。这样的改变也可通过将一个或多个丝氨酸残基或苏氨酸残基添加到原始抗体的序列上或用一个或多个丝氨酸残基或苏氨酸残基取代原始抗体的序列而完成(对于O-连接的糖基化位点)。同样，可通过在抗体的天然糖基化位点内的氨基酸改变而完成对糖基化位点的去除。

[0241] 通常通过改变基础核酸序列而改变氨基酸序列。通过本领域已知的各种方法，制备编码TLT-1抗体的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源中分离(在天然产生的氨基酸序列变体的情况下)或通过TLT-1抗体的较早制备的变体或非变体形式的寡核苷酸-介导的(或定点)诱变、PCR诱变和盒诱变而制备。

[0242] 也可改变抗体的糖基化(包括糖基化模式)，而不改变氨基酸序列或基础核苷酸序列。糖基化极大地取决于用于表达抗体的宿主细胞。因为用于表达重组糖蛋白例如抗体(作为潜在治疗药)的细胞类型往往不是天然细胞，所以抗体的糖基化模式的显著改变是可预期的(参见例如Hse等人, J. *Biol. Chem*. 1997;272:9062-9070)。除了选择宿主细胞之外，在抗体的重组产生期间，影响糖基化的因素包括生长模式、介质配方、培养密度、氧合作用、pH、纯化方案等。已经提出了不同方法，以改变在特定宿主生物中达到的糖基化模式，包括引入或过量表达参与寡糖产生的某些酶(美国专利号5,047,335;5,510,261和5,278,299)。可从糖蛋白上酶促去除糖基化或某些类型的糖基化，例如使用内切糖苷酶H (Endo H)。另外，可对重组宿主细胞进行遗传工程改造，例如在某些类型的多糖的加工中制造缺陷。这些和类似技术是本领域众所周知的。

[0243] 可通过碳水化合物分析的常规技术，包括凝集素色谱、NMR、质谱、HPLC、GPC、单糖组成分析、连续酶消化和HPAEC-PAD(其使用高pH阴离子交换色谱，根据电荷来分离寡糖)，容易地分析抗体的糖基化结构。为了分析的目的而释放寡糖的方法也是已知的，包括但不限于酶处理，用严格的碱性环境进行消除以主要释放O-连接的结构，和使用无水肼的化学

方法以释放N-和O-连接的寡糖。

[0244] 除了它们的TLT-1-结合部分(其涉及单克隆抗体或其片段)外,本发明的促凝血蛋白还包含凝血因子组分,其功能是在活化的血小板附近上调血液凝集。

[0245] 本发明的促凝血融合蛋白或缀合物的凝血因子可呈其无活性形式或其活化形式。凝血因子可以是丝氨酸蛋白酶,在这种情况下,无活性形式的凝血因子对应于酶原形式,活性形式对应于催化的活性形式。凝血因子可以是FVII多肽(FVII或FVIIa)、FVIII多肽(即FVIII或FVIIIa)、FIX多肽(FIX或FIXa)、FX多肽(FX或FXa)或FXI多肽(FXI或FXIa)。本发明的FVII、FVIII、FIX、FX和FXI多肽也包括所述凝血因子的变体(例如截短的变体)和衍生物。FVII、FIX、FX和FXI变体将包括截短的des-Gla变体,即缺乏负责与所述凝血因子的磷脂膜相互作用的Gla-结构域的所述凝血因子变体。

[0246] 如果凝血因子是FVII多肽,则FVII组分可能够结合到组织因子上并且它优选能够裂解FIX或FX。如果凝血因子是FVIII多肽,则该FVIII组分优选能够结合到FIXa上并支持对FX的裂解。如果凝血因子是FIXa多肽,则它优选能够裂解FX。如果凝血因子是FXa,则它优选能够裂解凝血酶原(FII)。如果凝血因子是FXIa多肽,则它优选能够裂解FIX。

[0247] 在一个具体实施方案中,所述凝血因子是FV多肽。因子V是由肝脏合成并且分泌的因子V在血浆中作为330-kDa单链多肽(是无活性的促凝血剂)循环(Huang等人(2008) Haemophilia 14: 1164-9)。FV由2196个氨基酸组成,包括28个氨基酸信号肽。它由A1 (Aa 30-329)、A2 (Aa 348-684)、B (Aa 692-1573)、A3 (Aa 1578-1907)、C1 (Aa 1907-2061)和C2 (Aa 2066-2221) 6个结构域组成。两个蛋白的A结构域和C结构域与FVIII的等同结构域具有大约40%同源性,但B结构域不是保守的。在FVIII的情况下,通过位点特异性蛋白水解而严格地调节FV活性。凝血酶,和在更低程度上,因子Xa (FXa),主要负责FV活化,即通过在位置Arg^{709}-Ser^{710}、Arg^{1018}-Thr^{1019}和Arg^{1545}-Ser^{1546}的蛋白水解性裂解。这些裂解释放出B结构域并产生由含A1和A2结构域的105-kDa重链和含A3、C1和C2结构域的71-至74-kDa轻链组成的二聚体分子。这2条链通过在残基Asp^{139}和Asp^{140}上的钙和疏水性相互作用而维持在一起。所述重链为FXa和凝血酶原这两者提供了接触,而对于Fva与磷脂表面的相互作用,需要轻链中的2个C结构域。因此,对于凝血酶复合物的Fxa,因子V作为辅因子是有活性的,而且活化的FXa酶需要钙和Fva,从而在细胞表面的膜上将凝血酶原转化为凝血酶。轻链中的A3结构域参与FXa和磷脂的相互作用。总之,2条FVa链将Fxa连接到损伤部位上由血小板栓塞(platelet plug)所形成的磷脂表面并使Fxa能有效结合和裂解凝血酶原,产生凝血酶。因子V能够结合到活化的血小板上。尽管FV在血浆中主要作为可溶性组分存在,FV的一部分也存在于血小板的α-颗粒中,其对于正常止血而言是重要的,这由血小板特异性因子V缺乏而证实(Janeway等人(1996) Blood 87: 3571-8)。

[0248] 一个野生型人因子V序列在SEQ ID NO: 155中提供。本文的术语“因子V多肽”是指野生型因子V分子以及FV变体、FV衍生物和FV缀合物。这样的变体、衍生物和缀合物与野生型人因子V相比可表现出基本上相同的或改进的生物学活性。

[0249] 为了本发明的目的,因子V可以是血浆衍生的或重组产生的,使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可因所选宿主细胞及其生长条件的不同而异。

[0250] 可用市售的凝血测定来测试因子V多肽,所述测定例如体外凝血因子V试剂测定

(*in vitro* Hemoclot Factor V Reagent assay, Aniara, Ohio, USA: 目录号ACK071K)。

[0251] 在一个具体实施方案中,凝血因子是FVIIa多肽。因子VII (FVII)是一种主要产生于肝脏的糖蛋白。成熟的蛋白由406个氨基酸残基组成并且由按照同源性定义的4个结构域组成。有N-端Gla结构域,接着是2个表皮生长因子(EGF)-样结构域和C-端丝氨酸蛋白酶结构域。FVII在血浆中以单链分子循环。当活化成活化FVII (FVIIa)之后,该分子在残基Arg152和Ile153之间裂解,产生由二硫键联系在一起的双链蛋白。其轻链含有Gla和EGF-样结构域,而其重链是蛋白酶结构域。FVIIa需要结合到其细胞表面辅因子组织因子上而变成具有完全的生物学活性。

[0252] 本文的术语"因子VII(a)"包括未裂解的酶原、因子VII、以及裂解的并因此而活化的蛋白酶、因子VIIa。"因子VII(a)"包括FVII(a)的天然等位变体,其可在不同个体中存在和出现。在SEQ ID NO: 157中、以及在Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:2412-2416中提供了一个野生型人因子VIIa序列。

[0253] 本文的术语"因子VII(a)多肽"是指野生型因子VIIa分子以及FVII(a)变体、FVII(a)衍生物和FVII(a)缀合物。这样的变体、衍生物和缀合物与野生型人因子VIIa相比可表现出基本上相同的或改进的生物学活性。

[0254] 本文所用的术语"FVII(a)变体"旨在表示具有SEQ ID NO: 157的序列的因子FVII,其中母体蛋白(parent protein)的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸取代和/或其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已缺失和/或其中已经将一个或多个氨基酸插入到蛋白中和/或其中已经将一个或多个氨基酸添加到母体蛋白上。这样的添加可发生在母体蛋白的N-末端或C-末端或这两者。该定义内的"类似物"仍然具有其活化形式的FVII活性。在一个实施方案中,变体与SEQ ID NO: 157的序列具有至少90%同一性。在另一个实施方案中,变体与SEQ ID NO: 157的序列具有至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性。如本文所用的,对特定位置的任何提及都是指SEQ ID NO: 157中的相应位置。

[0255] 与重组野生型人因子VII(a)相比具有基本上相同的或增加的蛋白水解活性的FVII(a)变体的非限制性实例包括以下文献中所公开的那些:WO 01/83725、WO 02/22776、WO 02/077218、WO 03/027147、WO 03/037932、WO 04/029090、WO 05/024006、WO 07/031559和EP 05108713.8、US 7173000 B2和JP4451514 B2。

[0256] 术语"改进的生物学活性"是指表现出以下的FVII(a)多肽:i) 在组织因子存在和/或不存在时与重组野生型人因子VIIa相比基本上相同的或增加的蛋白水解活性或ii) 与重组野生型人因子VIIa相比,具有基本上相同的或增加的TF亲和力的FVII(a)多肽或iii) 与重组野生型人因子VIIa相比具有基本上相同的或增加的血浆半衰期的FVII(a)多肽,或iv) 具有对于活化血小板的基本上相同的或增加的亲和力的FVII(a)多肽。FVIIa多肽的生物学活性可用本领域技术人员已知的各种测定来测量,例如实施例26和27中描述的体外水解和体外蛋白水解测定。

[0257] 为了本发明的目的,因子VII(a)可以是血浆衍生的或重组产生的,使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。

[0258] 以下FVII序列中的γ-羧化残基表示为"γ"。

[0259] *SEQ ID NO: 157: 野生型人凝血因子 VII*

[0260] ANAFLγγLRPGSLγRγCKγγQCSFγγARγIFKDAγRTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSCDQLQSYICF
CLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCKIP
ILEKNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFKIKNWRNLIAVL
GEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFV
RFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSKDSCK
GDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCAVGHFGVYTRV SQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP

[0261] 在另一个具体的实施方案中，所述凝血因子是FVIII多肽。因子VIII (FVIII)是一种主要由肝细胞产生的大而复杂的糖蛋白。FVIII由2351个氨基酸(包括信号肽)组成，并且含有按照同源性定义的若干独特结构域。有3个A-结构域，1个独特的B结构域和2个C-结构域。结构域的顺序可被列为NH2-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII在血浆中以在B-A3边界分开的两条链循环。所述链通过二价金属离子结合而连接。A1-A2-B链称为重链(HC)，而A3-C1-C2称为轻链(LC)。A1 (a_1区)和A2 (a_2区)的小的酸性区C-端以及A3结构域N-端(a_3区)在与其它凝血蛋白的相互作用中起到重要作用，所述其它凝血蛋白包括凝血酶和von Willebrand因子(vWF或VWF)、FVIII的体内载体蛋白。

[0262] 内源FVIII分子在体内以具有不同大小的B结构域的分子合并物的形式循环，最短的具有位置740上的C-端，即在A2-a_2的C-端。具有不同长度的B-结构域的这些FVIII分子都具有完全的促凝血活性。一旦被凝血酶活化之后，FVIII在位置372的A1-a_1的C-端、在位置740的A2-a_2的C-端、和在位置1689的介于a_3和A3之间被裂解，后一裂解释放出a_3区，同时损失对vWF的亲和力。活化的FVIII分子被称为FVIIIa。活化允许FVIIIa与磷脂表面例如活化的血小板相互作用并且形成活化的因子IX (FIXa): tenase复合物，允许因子X (FX)的有效活化。

[0263] 术语“因子VIII(a)”和“FVIII(a)”包括FVIII和FVIIIa两者。本文的“因子VIII”或“FVIII”是指人血浆糖蛋白，其是固有的凝血途径的成员并且是血液凝集所必需的。“天然FVIII”是源自SEQ ID NO: 159 (氨基酸1-2332)所示的全长序列的人FVIII分子。“FVIII(a)”包括FVIII(a)的天然等位变体，其可在不同个体中存在和出现。

[0264] FVIII分子/变体可以是B结构域-截短的FVIII分子，其中剩余的结构域紧密地对应于SEQ ID NO: 159的氨基酸编号1-740和1649-2332所给出的序列。在这样的变体中，以及在源自全长序列的FVIII中，可引入突变，以便例如降低vWF结合能力。可将氨基酸修饰，例如取代和缺失，引入分子中，从而修饰FVIII与不同的其它组分的结合能力，所述其它组分例如LRP、各种受体、其它凝血因子、细胞表面、糖基化位点的引入和/或消除。也可将不会消除FVIII活性的其它突变安置在FVIII分子/变体中，其可用于本发明的目的。

[0265] FVIII的B结构域跨越SEQ ID NO: 159的氨基酸741-1648。B结构域在若干不同位点被裂解，在循环血浆FVIII分子中产生大的异质性。重度糖基化的B结构域的确切作用尚不知道。所知道的是B结构域对于在凝血级联中的FVIII活性而言是必不可少的。因此往往产生B结构域-缺失的/截短的变体形式的重组FVIII。

[0266] 内源全长FVIII被合成为单链前体分子。分泌之前，前体被裂解为重链和轻链。可通过2种不同策略产生重组B结构域-缺失的FVIII。无B-结构域的重链和轻链被单独合成为2种不同多肽链(双链策略)或者B结构域-缺失的FVIII被合成为单一前体多肽链(单链策

略)，其以与全长FVIII前体相同的方式被裂解为重链和轻链。

[0267] 在通过单链策略而产生的B结构域-缺失的FVIII前体多肽中，重链和轻链部分通常被接头间隔开来。为了尽量降低在B结构域-缺失的FVIII中引入免疫原性表位的风险，接头序列优选源自FVIII B-结构域。最起码，接头必须包含将B结构域-缺失的FVIII前体多肽裂解为重链和轻链的蛋白酶的识别位点。在全长FVIII的B结构域中，氨基酸1644-1648构成该识别位点。在B结构域-缺失的FVIII的活化中导致接头被去除的凝血酶裂解位点位于重链中。因此，接头的大小和氨基酸序列不大可能影响通过凝血酶活化而将其从剩余的FVIII分子上去除。B结构域的缺失/截短对于FVIII生产而言是一个优势。然而，接头中可包括B结构域的部分，而不降低生产率。B结构域对生产率的不利影响并非归因于B结构域的任何特定大小或序列。

[0268] 本发明的FVIII分子在凝血级联中能够发挥作用，其方式在功能上类似于或等同于FVIII，通过与活化的血小板上的FIXa相互作用而诱导形成FXa并且支持凝血块的形成。可使用本领域众所周知的技术，在体外评估FVIII活性。凝血分析、FX活化测定(通常称为显色测定)、凝血酶产生测定和全血血栓弹性描记法(thromboelastography)是这类体外技术的实例，其中2种描述于实施例28和29。本发明的FVIII分子具有至少是天然人FVIII的FVIII活性。

[0269] 本文所用的术语“FVIII变体”旨在表示具有SEQ ID NO: 159序列的因子FVIII，其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸取代和/或其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已缺失和/或其中已经将一个或多个氨基酸插入到蛋白中和/或其中已经将一个或多个氨基酸添加到母体蛋白上。这样的添加可发生在母体蛋白的N-末端或C-末端或这两者。该定义内的“类似物”仍然具有其活化形式的FVIII活性。在一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 159的序列具有至少90%同一性。在另一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 159的序列具有至少95%、例如至少96%、例如至少97%、例如至少98%、例如至少99%同一性。如本文所用的，对特定位置的任何提及都是指SEQ ID NO: 159中的相应位置。

[0270] 为了本发明的目的，FVIII可以是血浆衍生的或重组产生的，使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。

[0271] 在另一个具体的实施方案中，所述凝血因子是因子IX多肽。因子IX (FIX)的活性形式FIXa是胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶，其在止血中起到关键作用，即在凝血期间，产生大部分的支持适当凝血酶形成所需的因子Xa(作为tenase复合物的一部分)(综述见(Hoffman和Monroe, III 2001))。

[0272] 因子IX (FIX)是维生素K依赖性凝血因子，其结构类似于因子VII、凝血酶原、因子X和蛋白C。循环酶原形式由415个氨基酸组成，这些氨基酸分为4个独特结构域，包括N-端富含γ-羧基谷氨酸(Gla)结构域、2个EGF结构域和C-端胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶结构域。FIX的活化通过有限的蛋白水解而发生在Arg^{145}-Ala^{146}和Arg^{180}-Val^{181}上，释放出35-aa片段，所谓的活化肽(Schmidt和Bajaj 2003)。活化肽是重度糖基化的，含有2个N-连接的和至多4个O-连接的聚糖。

[0273] 本文所用的“因子IX”或“FIX”是指人血浆因子IX糖蛋白，其是固有的凝血途径的成员并且是血液凝集所必须的。“因子IX(a)”包括FIX(a)的天然等位变体，其可在不同个体

中存在和出现。因子IX(a)可以是血浆衍生的或重组产生的，使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。除非另有说明或指出，否则因子IX是指在凝血中起正常作用的任何功能性人因子IX蛋白分子，包括其任何片段、类似物和衍生物。

[0274] “野生型FIX”的一个实例是全长人FIX分子，如SEQ ID NO: 161中所示。

[0275] 本文所用的术语“FIX类似物”旨在表示具有SEQ ID NO: 161序列的因子FIX，其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸取代和/或其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已缺失和/或其中已经将一个或多个氨基酸插入到蛋白中和/或其中已经将一个或多个氨基酸添加到母体蛋白上。这样的添加可发生在母体蛋白的N-末端或C-末端或这两者。该定义内的“类似物”仍然具有其活化形式的FIX活性。在一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 161的序列具有至少90%同一性。在另一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 161的序列具有至少95%同一性。如本文所用的，对特定位置的任何提及都是指SEQ ID NO: 161中的相应位置。与重组野生型人因子IX(a)相比具有基本上相同的活性、FVIII旁路活性或增加的蛋白水解活性的FIX(a)变体的非限制性实例包括以下文献中公开的那些：Milanov P, Ivanciu L, Abriss D, Quade-Lyssy P, Miesbach W, Alesci S, Tonn T, Grez M, Seifried E, Schüttrumpf (2012) J.Blood 119: 602-11和US 2011/0217284 A1。除非另有说明，否则因子IX结构域包括以下氨基酸残基: Gla结构域是从残基Tyr1到残基Lys43的区；EGF1是从残基Gln44到残基Leu84的区；EGF2是从残基Asp85到残基Arg145的区；活化肽是从残基Ala146到残基Arg180的区；和蛋白酶结构域是从残基Val181到Thr414的区。轻链是指包含Gla结构域、EGF1和EGF2的区，而重链是指蛋白酶结构域。

[0276] 因子IX可以是血浆衍生的或重组产生的，使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。

[0277] 称为‘Hyphen BioMed显色因子IX试剂盒(Aniara)’的市售测定试剂盒可用于评估FIX多肽的活性水平。在该测定中，因子Xia将因子IX活化为因子IXa，其与活化因子VIII:C、磷脂和Ca^{2+}一起，将因子X活化为因子Xa。在405 nm处，通过从因子Xa特异性显色底物SXa-11中释放的pNA的量，测定所产生的因子Xa的量。

[0278] 以下FVII序列中的γ-羧化残基表示为”γ”。

[0279] *SEQ ID NO: 161: 野生型人凝血因子 IX*

[0280] YNSGKLγγFVQGNLγRγCMγγKCSFγγARγVFγNTγRTTγFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSY ECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRV SVSQTSKLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGK VDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYN AAINKYNH DIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLR STKFTYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYV NWIKEKTKLT

[0281] 在另一个具体的实施方案中，所述凝血因子是FX多肽。凝血因子X (FX)是维生素K-依赖性凝血因子，其结构类似于因子VII、凝血酶原、因子IX (FIX)和蛋白C。其在合成时具有40-残基前-原-序列(pre-pro-sequence)，含有靶向用于分泌的蛋白的疏水性信号序列(Aa 1-31)。该原-肽对于指导γ-羧化到因子X的轻链上是重要的。循环人FX酶原由445个

氨基酸组成，所述氨基酸分为4个独特结构域，包括N-端富含γ-羧基谷氨酸(Gla)的结构域、2个EGF结构域和C-端胰蛋白酶-样丝氨酸蛋白酶结构域。成熟的双链形式FX由通过二硫桥(Cys^{172}-Cys^{342})连接在一起的轻链(Aa41-179)和重链(Aa183-488)组成。其轻链含有11个Gla残基，这对于将FX的Ca^{2+}-依赖性结合到带负电荷的磷脂膜上而言是重要的。野生型人凝血因子X在活化肽中具有2个N-糖基化位点(Asn^{221}和Asn^{231})和2个O-糖基化位点(Thr^{199}和Thr^{211})。β-羟化作用发生在第一个EGF结构域中的Asp^{103}上，产生β-羟基天冬氨酸(Hya)。FX的活化通过有限蛋白水解发生在Arg^{234}-Ile^{235}上，释放出52个氨基酸的活化肽(Aa 183-234)。在这个非固有的途径中，这发生在内皮下细胞膜上的组织因子(TF)暴露给血浆之后，并且随后是FVIIa的活化。通过非固有途径的活化在与因子IXa、因子VIIIa、钙和酸性磷脂表面相互作用时发生。凝血酶原是因子Xa的最重要底物，但活化需要FXa的辅因子因子Va、钙和酸性磷脂表面。FX缺乏是一种罕见的常染色体隐性出血障碍，在普通人群中的发生率为1:1,000,000 (Dewerchin等人(2000) Thromb Haemost 83: 185-190)。尽管它产生可变的出血倾向，但患有严重FX缺乏的患者在患有罕见凝血缺陷的患者中倾向于最严重地被影响。杂合FX缺乏的患病率为约1:500，但通常在临床上无症状。

[0282] “野生型FX”的一个实例是全长人FX分子，如SEQ ID NO: 163中所示。

[0283] 本文中的“因子X多肽”是指能够激活凝血酶的任何功能性因子X蛋白分子，包括SEQ ID NO: 163的片段、类似物和衍生物。

[0284] 本文所用的术语“FX类似物”意指具有SEQ ID NO: 163序列的因子FX，其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸取代和/或其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已缺失和/或其中已经将一个或多个氨基酸插入到蛋白中和/或其中已经将一个或多个氨基酸添加到母体蛋白上。这样的添加可发生在母体蛋白的N-末端或C-末端或这两者。该定义内的“类似物”仍然具有其活化形式的FX活性。在一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 163的序列具有至少90%同一性。在另一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 163的序列具有至少95%同一性。如本文所用的，对特定位置的任何提及都是指SEQ ID NO: 163中的相应位置。

[0285] FX可以是血浆衍生的或重组产生的，使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化、γ-羧化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。

[0286] 在另一个具体的实施方案中，凝血因子是因子XI多肽。因子XI (FXI)是凝血蛋白酶的酶原，因子XIa (FXIa)，其通过因子IX的活化而有助于止血。该因子是由肝脏产生(Emsley等人(2010) Blood 115:2569-77)。所述蛋白是160-kDa的由相同的607个氨基酸亚基经二硫键连接的二聚体，每个含有4 90-或91-氨基酸重复序列，称为苹果结构域(apple domain) (从N-末端: A1: Aa 20-103、A2: Aa 110-193、A3: Aa 200-283、A4: Aa 291-374)和C-端胰蛋白酶-样催化结构域。所述蛋白与信号肽Aa1-18一起表达。其结构不同于良好表征的维生素K-依赖性凝血蛋白酶的那些。FXI在血液中作为与高分子量激肽原(HK)的复合物循环。前激肽释放酶(PK)，蛋白酶-激肽释放酶的酶原，是具有相同结构域结构的FXI的单体同系物，其也以与HK的复合物而循环。酶原因子被因子XIIa (FXIIa)，凝血酶而活化成因子Xia，并且是自催化的。裂解活化发生在含有Arg369-Ile370裂解位点的活化环上。因为FXI缺陷引起相对轻度的出血，所以FXI在早期纤维蛋白产生中具有推测性的作用。FXIa被推测是反馈环的组成部分，所述环通过FIX活化而维持凝血酶的产生，以巩固凝血。具有稳健的纤维蛋白溶解活性的某些组织对于FXIa活性而言似乎是重要的，所述组织包括

口咽部和尿道，因为这些是FXI-缺陷型患者的常见出血部位。先天性FXI缺陷与轻度至中度出血障碍有关。已经报道了超过180种FXI缺陷相关的其它FXI基因突变(http://www.factorxi.org, http://www.isth.org)，包括超过100个单一氨基酸(错义)取代。严重缺陷在犹太血统人群中是普遍的(Seligsohn等人(2007) Thromb Haemost. 98:84-89)。在Ashkenazi犹太人中的携带率大约5%，每450人中有1人具有严重(纯合的)缺陷。作为实例，在Glu117Stop的严重突变导致截短的蛋白和纯合子完全缺乏血浆FXI抗原。

[0287] 因子XIa通过选择性裂解Arg^{145}-Ala^{146}和Arg^{180}-Val^{181}而活化因子IX。

[0288] 本文所用的术语“FXI类似物”旨在表示具有SEQ ID NO: 165的序列的因子XI，其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已被另一氨基酸取代和/或其中母体蛋白的一个或多个氨基酸已缺失和/或其中已经将一个或多个氨基酸插入到蛋白中和/或其中已经将一个或多个氨基酸添加到母体蛋白上。这样的添加可发生在母体蛋白的N-末端或C-末端或这两者。该定义内的“类似物”仍然具有其活化形式的FX活性。在一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 165的序列具有至少90%同一性。在另一个实施方案中，变体与SEQ ID NO: 165的序列具有至少95%同一性。如本文所用的，对特定位置的任何提及都是指SEQ ID NO: 165中的相应位置。

[0289] FXI可以是血浆衍生的或重组产生的，使用众所周知的生产和纯化方法。糖基化和其它翻译后修饰的程度和位置可取决于所选宿主细胞及其生长条件而变化。

[0290] 如本领域已知的，术语“同一性”表示2个或更多个多肽的序列之间的关系，这通过比较所述序列而确定。在本领域中，“同一性”也表示多肽之间的序列相关性程度，这通过2个或更多个氨基酸残基的串之间的匹配数目而确定。“同一性”度量2个或更多个序列中的更小者之间的相同匹配的百分比，其中通过特定数学模型或计算机程序(即，“算法”)处理空位比对(如果有的话)。通过已知的方法，可容易地计算相关多肽的同一性。这样的方法包括、但不限于在下述参考文献中描述的那些方法：Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., 编, Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., 编, Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, 第1部分, Griffin, A. M.,和Griffin, H. G., 编, Humana Press, New Jersey, 1994;Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987;Sequence Analysis Primer, Gribskov, M.和Devereux, J., 编, M. Stockton Press, New York, 1991;和Carillo等人, SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988)。

[0291] 用于确定同一性的优选方法被设计成产生所测序列之间的最大匹配。确定同一性的方法被描述在公众可得到的计算机程序中。用于确定2个序列之间的同一性的优选计算机程序方法包括GCG程序包，包括GAP (Devereux等人, Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.)、BLASTP、BLASTN和FASTA (Altschul等人, J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(NCBI)和其它来源(BLAST Manual, Altschul等人NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul等人, 同上)公开得到。众所周知的Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0292] 例如，使用计算机算法GAP (Genetics Computer Group, University of

Wisconsin, Madison, Wis.),可针对它们的各个氨基酸的最佳匹配(通过算法确定的“匹配的跨度”),比对待确定序列同一性百分比的2个多肽。与所述算法结合使用空位开放罚分(将其计算为对角线均值的3倍;“对角线均值”是所用比较矩阵的对角线的均值;“对角线”是由特定比较矩阵分配给每个完美氨基酸匹配的评分或数字)和空位延伸罚分(它通常是{分数(1/10)}x空位开放罚分)以及比较矩阵(诸如PAM 250或BLOSUM 62)。所述算法也使用标准的比较矩阵(关于PAM 250比较矩阵,参见Dayhoff等人, Atlas of Protein Sequence and Structure, vol. 5, supp.3 (1978);关于BLOSUM 62比较矩阵,参见Henikoff等人, Proc. Natl. Acad. Sci USA 89, 10915-10919 (1992))。

[0293] 用于肽序列比较的优选参数包括下述的:算法:Needleman等人, J. Mol. Biol. 48, 443-453 (1970);比较矩阵:来自Henikoff等人, PNAS USA 89, 10915-10919 (1992)的BLOSUM 62;空位罚分:12,空位长度罚分:4,相似性的阈值:0。

[0294] GAP程序可使用上述参数。前述参数是使用GAP算法进行肽比较的默认参数(与末端空位没有罚分一起)。

[0295] 因此,本发明的促凝血蛋白包含(i) 至少一种凝血因子组分和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合受体和/或其片段,其中所述受体仅存在于(在该词的非遍在的意义上)活化的血小板的表面上。在一个优选的实施方案中,所述受体是TLT-1。本发明的促凝血蛋白优选经工程改造,使得它们的组成部分可彼此独立地起作用。例如,所述的本发明的凝血因子组分能够上调凝血。同样,所述本发明的“抗体”组分优选地能够结合受体例如TLT-1,不会受到所述凝血因子组分存在的阻碍。所述凝血因子组分的羧基端可共价连接到构建体的抗体组分的氨基端上,或反之亦然。所述构建体的抗体组分将优选地不结合任何其它的在髓样细胞上表达的触发受体(TREM)或者表现出对TREM极少的亲和力。本发明的构建体可包含或可不含介于所述凝血因子与所述抗体组分之间的接头。所述任选的接头可以是表3中所述的接头中的任一种,或可以是同时连接凝血因子和构建体的抗体组分这两者的任何其它接头,使得这两者都有功能。在一个实施方案中,凝血因子和抗TLT-1组分表达为融合蛋白。在一个实施方案中,凝血因子和抗TLT-1组分经化学缀合。

[0296] 其中部分(ii)是mAb的促凝血蛋白可包含2个凝血因子多肽(部分(i))。凝血因子可融合到mAb的HC上;凝血因子可融合到mAb的LC上。凝血因子可融合到抗体或其片段上,所述抗体或其片段继而融合到mAb的HC或mAb的LC上。

[0297] 因此,本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FV多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合TLT-1。

[0298] 本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FVII多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合TLT-1。

[0299] 本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FVIII多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合TLT-1。

[0300] 本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FIX多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合TLT-1。

[0301] 本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FX多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合TLT-1。

[0302] 本发明的促凝血蛋白可包含(i) 至少一种FXI多肽和(ii)抗体或其片段,所述抗

体或其片段能够结合TLT-1。

[0303] 促凝血蛋白可进一步包含接头。接头氨基酸序列的非限制性实例(其可在制备所述促凝血蛋白为融合蛋白时使用)示于表3中。因此,所述接头可以是L1。所述接头可以是L2。所述接头可以是L3。所述接头可以是L4。所述接头可以是L5。所述接头可以是L6。所述接头可以是L7。所述接头可以是L8。所述接头可以是L9。所述接头可以是L10。

[0304] *表3:任选的接头的非限制性实例*

[0305]

接头ID	长度(氨基酸)	接头序列
L0	0	没有接头
L1	2	GS
L2	7	GSGGGGS
L3	12	GSGGGGSGGGGS
L4a	17	GSGGGGSGGGGSGGGGS
L4b	17	GGGGSGGGGSGGGGSGS
L5	22	GGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L6	27	GGGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L7	32	GGGGSGGGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L8	37	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L9	42	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGSGGGGSGGGGSGGGGS
L10	16	YGPPSPSSPAPEFLGG

[0306] 如上所述,TLT-1的胞外部分由免疫球蛋白-样结构域和茎组成。本发明的促凝血蛋白可能够结合它们中的任一个。当促凝血蛋白的部分(ii)能够结合免疫球蛋白-样结构域时,更长的接头可允许所述融合蛋白的部分(i)适应在活化血小板表面上的功能上有关的位置和取向,从而促进它的功能。

[0307] 能够结合TLT-1的茎的促凝血蛋白临近血小板膜。能够结合所述茎的促凝血蛋白可包含接头,但是,接头的包含不一定影响融合蛋白的凝血因子部分的功能。

[0308] 如上所述,本发明的促凝血蛋白能够结合受体,所述受体存在于正经历活化的血小板或已经完全活化的血小板上,例如TLT-1。术语"结合亲和力"意指促凝血蛋白或促凝血蛋白的抗体组分结合或不结合其靶标的性质。通过测定抗体组分与其靶标的结合常数(K_D),可量化结合亲和力。类似地,以与抗体和另一种非靶标分子的结合常数相比抗体对它的靶标的比较结合常数(K_D)的方式,可定义抗体组分对它的靶标的结合特异性。

[0309] 通常,抗体相对于靶标的K_D是相对于其它非靶标分子(诸如无关的物质或环境中的伴随物质)的K_D的1/2倍、优选1/5、更优选1/10倍。更优选地,所述K_D是其它非靶标分子的K_D的1/50倍、甚至更优选1/100、还更优选1/200。

[0310] 通过众所周知的方法,可直接测定该结合常数的值,且通过诸如在例如Caceci等人(Byte 9:340-362, 1984)中所提出的那些方法,甚至可计算复杂混合物的值。例如,使用双滤硝酸纤维素滤膜结合测定,诸如Wong & Lohman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 5428-5432, 1993)公开的测定,可建立K_D。用于评价抗体对靶标的结合能力的其它标准测定是本领域已知的,包括例如,ELISA、蛋白印迹、RIA和流式细胞术分析。通过本领域已知的标准测定,诸如通过表面等离振子共振(SPR)分析,也可评估抗体的结合动力学(例如,缔合

速率和解离速率常数)和结合亲和力。

[0311] 可进行竞争性结合测定,其中将抗体对靶标的结合与所述靶标的另一种已知配体或另一种抗体对所述靶标的结合相比较。

[0312] 本发明的抗体或其片段的K_D值也可以是至少1 x 10^{-15}M、诸如至少1 x 10^{-14}M、诸如至少1 x 10^{-13}M、诸如至少1 x 10^{-12}M、诸如至少1 x 10^{-11}M、诸如至少1 x 10^{-10}M、诸如大约3 x 10^{-9}M、诸如至少1 x 10^{-9}M或至少1 x 10^{-8}M。本发明的抗体对它的靶标的Kd (或Ki)可以是1 x 10^{-7}M或更小、1 x 10^{-8}M或更小或1 x 10^{-9}M或更小。

[0313] 所述抗体或其片段的优选的K_D值可以是1 x 10^{-15}M至1 x 10^{-14}M,诸如1 x 10^{-14}M至1 x 10^{-13}M、1 x 10^{-13}M至1 x 10^{-12}M,诸如1 x 10^{-12}M至1 x 10^{-11}M,诸如1 x 10^{-11}M至1 x 10^{-10}M,诸如1 x 10^{-10}M至1 x 10^{-9}M,诸如大约3 x 10^{-9}M,诸如1 x 10^{-9}M至2 x 10^{-8}M。

[0314] 特异性地结合它的靶标的抗体或其片段可以以高亲和力(诸如上面讨论的K_D)结合它的靶标,且可以以更低的亲和力结合其它的非靶标分子。例如,所述抗体可以以1 x 10^{-6}M或更大、更优选1 x 10^{-5} M或更大、更优选1 x 10^{-4} M或更大、更优选1 x 10^{-3} M或更大、甚至更优选1 x 10^{-2} M或更大的K_D结合非靶标分子。本发明的促凝血蛋白优选地能够以下述亲和力结合它的靶标:所述亲和力是它对另一种非靶标分子(诸如除了TLT-1以外的其它TREM)的结合亲和力的至少2倍、10倍、50倍、100倍、200倍、500倍、1,000倍或10,000倍或更高。

[0315] 借助于各种体外和体内实验,可评估本发明的促凝血蛋白的功能效果。可将体外实验设计成评估融合蛋白(作为整体以及作为它们的组分(i) 凝血因子和(ii)抗体部分)的功能。在体内,可在输注了人血小板的血友病小鼠的尾出血模型中测试融合蛋白。此外,在体内,可在插入了人TLT-1基因(关于TLT-1 “人源化的”)的血友病小鼠的尾出血模型中测试融合蛋白。

[0316] 如上所述,促凝血蛋白可以以融合蛋白或化学缀合物的形式提供。在前一种情况中,本发明也涉及编码本发明的促凝血蛋白的多核苷酸。因此,本发明的多核苷酸可编码本文所述的任何促凝血蛋白。术语“核酸分子”和“多核苷酸”在本文中可互换使用,是指任何长度的聚合形式的核苷酸,无论是脱氧核糖核苷酸还是核糖核苷酸或它们的类似物。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、信使RNA (mRNA)、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、任意序列的分离的DNA、任意序列的分离的RNA、核酸探针和引物。本发明的多核苷酸可以以分离的或纯化的形式提供。

[0317] “编码”选择的多肽的核酸序列是这样的核酸分子:当置于适当调节序列控制下时,其在体内被转录(在DNA的情况下)和翻译(在mRNA的情况下)成多肽。编码序列的边界由在5’ (氨基)末端处的起始密码子和在3’ (羧基)末端处的翻译终止密码子决定。为了本发明的目的,这样的核酸序列可包括但不限于:来自病毒、原核或真核mRNA的cDNA,来自病毒或原核DNA或RNA的基因组序列,和甚至合成的DNA序列。转录终止序列可位于编码序列的3’。

[0318] 根据本领域众所周知的方法,例如如在Sambrook等人(1989, Molecular Cloning - a laboratory manual (分子克隆-实验室手册); Cold Spring Harbor Press)中所述,可合成本发明的多核苷酸。

[0319] 本发明的核酸分子可以以表达盒的形式提供,所述表达盒包括可操作地连接到插

入的序列上的控制序列，因而允许在体内表达本发明的抗体。这些表达盒通常又提供在载体(例如，质粒或重组病毒载体)内。这样的表达盒可直接地给予宿主受试者。或者，可将包含本发明的多核苷酸的载体给予宿主受试者。优选地，使用遗传载体，制备和/或给予所述多核苷酸。合适的载体可以是能够携带足够量的遗传信息并允许表达本发明多肽的任意载体。

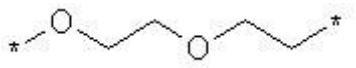
[0320] 本发明因而包括包含这样的多核苷酸序列的表达载体。在分子生物学领域中，常规地构建这样的表达载体，且可例如包括使用质粒DNA和适当的起始子、启动子、增强子和其它元件，例如可能必要的聚腺苷酸化信号，且它们以正确的取向放置，以便允许表达本发明的肽。其它合适的载体是本领域技术人员显而易见的。作为这方面的其它实例，我们参考Sambrook等人。

[0321] 本发明也包括分离的细胞，所述细胞已经被修饰成表达根据本发明的融合蛋白。这样的细胞包括瞬时的、或优选地稳定的高等真核细胞系，诸如哺乳动物细胞或昆虫细胞；低等真核细胞，诸如酵母；或原核细胞诸如细菌细胞。可通过插入编码本发明构建体的载体或表达盒而修饰的细胞的具体实例包括：哺乳动物HEK293T、CHO、HeLa和COS细胞。优选地，选择的细胞系是这样的：其不仅是稳定的，而且允许多肽的成熟糖基化和细胞表面表达。

[0322] 使用常规方法，可培养本发明的这样的细胞系，以生产根据本发明的融合蛋白或构建体。或者，可将本发明多核苷酸、表达盒或载体离体地给予来自受试者的细胞，然后将所述细胞返回受试者的体内。

[0323] 或者，促凝血蛋白可通过将抗体(例如mAb)或其片段与凝血因子化学缀合而获得。在这种情况下，这两种蛋白之间的接头可含有不存在于由DNA编码的那些氨基酸的一个或多个化学部分。

[0324] 在一个实施方案中，接头中使用的化学部分包含具有以下结构的二基团

[0325] 

[0326] 其中*表示该二基团的连接位置。

[0327] 术语“二基团”是指具有2个彼此独立起作用的自由基中心的偶电子化合物。

[0328] 在另一个实施方案中，接头中使用的化学部分包含聚合物：由通常通过共价化学键相连的重复结构单元组成的大分子。这样的聚合物可以是亲水性的。

[0329] 术语亲水性的或“水溶性的”是指在水中具有一定程度的可检测溶解度的部分。检测和/或量化水溶性的方法是本领域众所周知的。

[0330] 示例性的本发明的水溶性聚合物包括肽类、糖类、(聚)醚类、(聚)胺类、(聚)羧酸类等。肽可具有混合序列且可由单一氨基酸组成，例如，(聚)赖氨酸。示例性的多糖是(聚)唾液酸。示例性的(聚)醚是(聚)乙二醇。(聚)乙烯亚胺是示例性的聚胺，(聚)丙烯酸是代表性的(聚)羧酸。

[0331] 本发明的亲水性聚合物优选地是非天然产生的。在一个实例中，非天然产生的修饰基团是聚合修饰基团，其中至少一个聚合部分为非天然产生的。在另一个实例中，非天然产生的修饰基团是经修饰的碳水化合物。选择被修饰基团官能化的位点，从而使它不会阻止“经修饰的糖”酶促地添加到多肽上。“经修饰的糖”也是指任何糖基模拟部分，其被修饰基团官能化并且是天然的或修饰的酶(例如糖基转移酶)的底物。

[0332] 许多其它的聚合物也适用于本发明。非肽的和水溶性的聚合物主链在本发明中特别有用。合适的聚合物的实例包括但不限于，其它聚(烷撑二醇)例如聚(丙二醇) ("PPG")、乙二醇和丙二醇的共聚物等，聚(氧乙基化的多元醇)，聚(烯醇)，聚(乙烯吡咯烷酮)，聚(羟丙基甲基丙烯酰胺)，聚(α-羟酸)，聚(乙烯醇)，聚磷腈，聚噁唑啉，聚(N-丙烯酰吗啉)，例如通过引用全部结合到本文中的美国专利号5,629,384中所述的那些，以及它们的共聚物、三元共聚物和混合物。

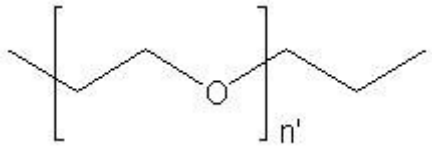
[0333] 聚合的接头可改变促凝血蛋白的性质，例如其生物利用度、生物学活性或其在体内的半衰期。

[0334] 聚合的接头优选地是线性的。

[0335] 尽管各单个的聚合物链的分子量可变化，但它的范围通常是在从约1,000 Da (1 kDa)至约40,000 Da (40 kDa)、例如约1,000 Da至约12,000 Da、例如约2,000 Da至约11,000 Da、例如约2,000 Da至约3,000 Da；约3,000 Da至约4,000 Da；约4,000至约5,000 Da；约5,000至约6,000 Da；约6,000至约7,000 Da；约7,000至约8,000 Da；约8,000至约9,000 Da；约9,000至约10,000 Da；或约10,000至约11,000 Da。应当理解，这些大小代表估计值，而不是精确测量值。根据优选的实施方案，本发明的分子与亲水聚合物的异质群体缀合。

[0336] 在一个具体实施方案中，接头中所用的化学部分包含聚乙二醇 (PEG)。

[0337] 本文所用的术语"PEG"是指包含以下结构的二基团：

[0338] 

，

[0339] 其中n'是大于1的整数。

[0340] PEG是由环氧乙烷聚合而制备的并且在宽的分子量范围内是市售可得的。用于本发明的PEG优选地是线性的。

[0341] 此外，"PEG"可指聚乙二醇化合物或其衍生物，有或无偶联剂、偶联的或活化的部分(例如与羧酸/活化酯、酮基、烷氧基胺、硫醇基、三氟甲磺酸基(triflate)、甲磺酸基(tresylate)、氮杂环丙烷、环氧乙烷、炔烃、叠氮化物或马来酰亚胺部分)。

[0342] 在一个具体实施方案中，用于本发明的PEG是单分散的。在另一个具体的实施方案中，用于本发明的PEG是多分散的。

[0343] 多分散的PEG由具有不同分子量的PEG分子组成。可通过其重均分子量(Mw)及其数均分子量(Mn)，统计地表征其大小分布，其比率称为多分散性指数(Mw/Mn) (参见例如"Polymer Synthesis and Characterization", J. A. Nairn, University of Utah, 2003)。可通过质谱法测定Mw和Mn。

[0344] 多分散性指数可以是大于等于1的数字，并且可根据凝胶渗透色谱数据来估计。当多分散性指数是1时，产物是单分散的并因此是由单一分子量的化合物组成。当多分散性指数大于1时，聚合物就是多分散的，并且多分散性指数表明具有不同分子量的聚合物的分布有多宽。多分散性指数通常随PEG分子量而增加。在具体的实施方案中，用于本发明的PEG的多分散性指数是i) 低于1.06, ii) 低于1.05, iii) 低于1.04, iv) 低于1.03或v) 介于1.02和1.03之间。

[0345] 可得到不同形式的PEG，这取决于聚合过程所用的引发剂。

[0346] 缀合PEG取代基的多种方法描述于*Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, *54*, 459 -476, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, *2*, 214-221 DOI:10.1038/nrd1033, *Adv Polym Sci*, 2006, *192*, 95-134, DOI 10.1007/12_022, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 2005,以及其中的参考文献。或者,亲水性聚合物取代基的缀合可通过使用酶学方法而发生。这样的方法例如WO2003/031464中所述的使用糖基转移酶或WO2006134148中所述的使用转谷氨酰胺酶。

[0347] 为了实现聚合物分子与多肽的共价连接,以活性形式提供聚合物分子的羟基末端基团,即用反应性官能团。合适的活化聚合物分子是市售的,例如来自Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA, Rapp Polymere GmbH, Tübingen, 德国,或来自PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK。或者,聚合物分子可通过本领域已知的常规方法来活化,例如WO 90/13540中所公开的方法。活化PEG聚合物的具体实例公开于美国专利号5,932,462和美国专利号5,643,575。此外,以下出版物公开了有用的聚合物分子和/或PEG化化学:WO2003/031464、WO2004/099231。

[0348] 单克隆抗体、其片段或凝血因子与活化聚合物分子的缀合可通过使用任何常规方法而进行,所述方法例如以下参考文献中描述的(其也描述了用于聚合物分子活化的合适方法): R. F. Taylor, (1991), "Protein immobilisation. Fundamental and applications", Marcel Dekker, N.Y.;S. S. Wong, (1992), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Raton;G. T. Hermanson等人, (1993), "Immobilized Affinity Ligand Techniques ", Academic Press, N.Y., 'Bioconjugate Techniques, 第二版, Greg T. Hermanson, 2008, Amsterdam, Elsevier)。技术人员将会知道所用的活化方法和/或缀合化学取决于多肽的连接基团(其实例在上文已给出)、以及聚合物的官能团(例如是胺、羟基、羧基、醛、巯基、琥珀酰亚胺基、马来酰亚胺、乙烯砜或卤乙酸基)。PEG化可以是将缀合指向多肽上的所有可用的连接基团(即暴露在多肽表面上的这类连接基团)或可指向一个或多个特定连接基团,例如N-端氨基基团。此外,可以以一个步骤的方式或以逐步方式完成缀合。

[0349] 在另一个实施方案中,用作接头的化学部分是羟乙基淀粉。本文所用的术语"羟乙基淀粉" (HES/HAES)"是指非离子型淀粉衍生物。羟乙基淀粉的不同类型通常根据它们的平均分子量来描述,通常在约130至200 kDa。

[0350] 在另一个实施方案中,接头中使用的化学部分包含多唾液酸。

[0351] 在另一个实施方案中,接头中使用的化学部分将至少一种蛋白质连接到聚糖:多糖或寡糖,其连接到蛋白上。

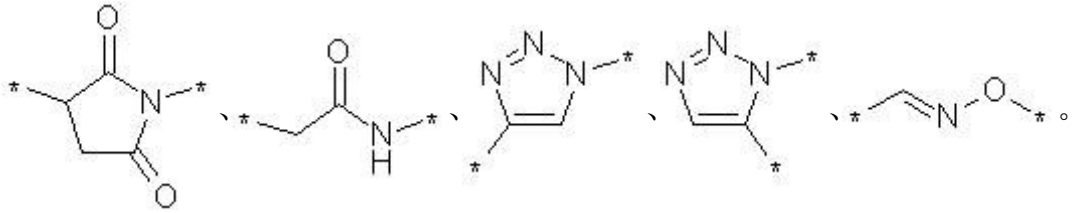
[0352] 在另一个实施方案中,接头中使用的化学部分将至少一种蛋白连接到*O*-连接的聚糖上。

[0353] 在另一个实施方案中,接头中使用的化学部分将至少一种蛋白质连接到*N*-连接的聚糖上。

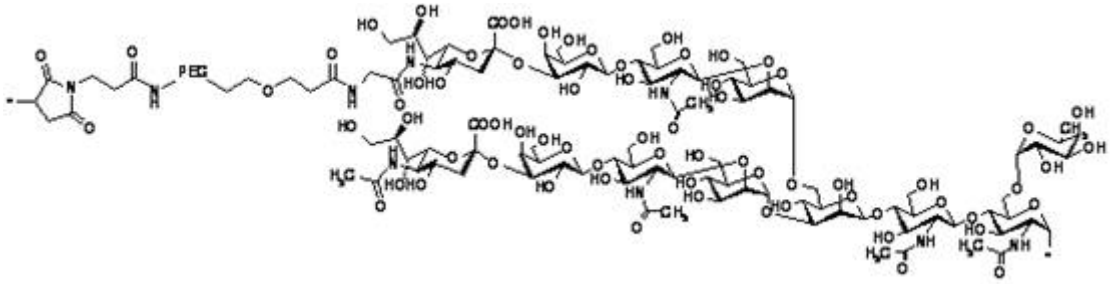
[0354] 通过产生蛋白质的细胞,可将N-聚糖和O-聚糖两者连接到这些蛋白质例如mAb和凝血因子。当初生蛋白从核糖体中易位到内质网时,细胞的N-糖基化机器识别氨基酸链中的N-糖基化信号(N-X-S/T基序)并使之糖基化(Kiely等人1976;Glabe等人1980)。同样,O-聚糖连接到氨基酸链中的特定O-糖基化位点,但与N-糖基化信号相比,所述基序触发的O-

糖基化不均一得多，而且我们对氨基酸序列中的O-糖基化位点的预测能力仍然是不足的(Julenius等人2004)。将多肽与不同聚合物侧基缀合的方法描述于例如WO0331464。

[0355] 在另一个实施方案中，接头中使用的化学部分包含化学部分，其用于将所述接头连接到具有以下二基团的所选结构的蛋白的至少一个上：

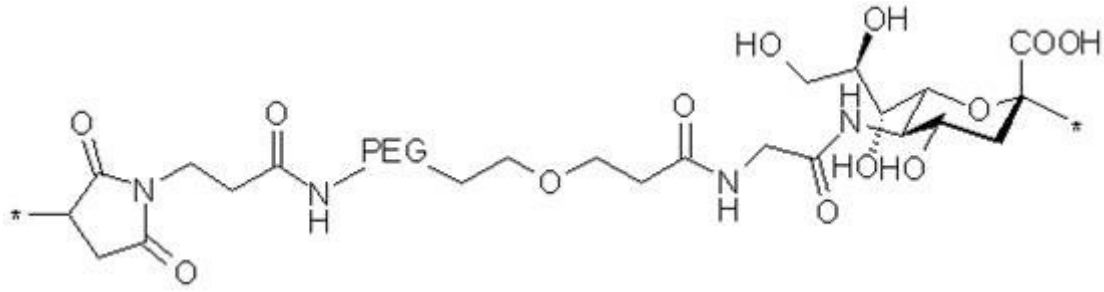
[0356] 

[0357] 在一个实施方案中，所述接头包含以下的二基团结构：

[0358] 

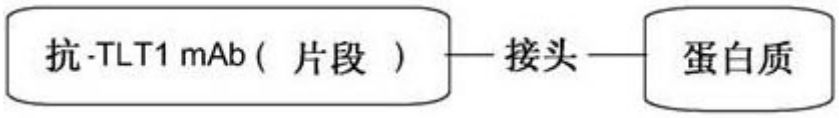
，其中*表示该二基团的连接位置。

[0359] 在另一个实施方案中，所述接头包含以下结构：

[0360] 

，其中*表示该二基团的连接位置。

[0361] 以下通式的化合物

[0362] 

[0363] 其中“抗TLT-1 mAb (片段)”可以是针对TLT-1的全长mAb或其片段或在知识上源自它的类似物例如但不限于FAB-片段或sc-FAB，其具有0个、1个或多个点突变；所述接头可以是水溶性聚合物，例如但不限于例如PEG、多唾液酸或羟乙基淀粉；而蛋白质是当连接到抗TLT-1 mAb (片段)时被认为具有一个或多个改进的性能的任何蛋白质，其可以是例如在两步骤程序中制备的。

[0364] 在第一步骤期间，可将具有2个不同反应性基团RS1和RS2的接头连接到抗TLT-1 mAb (片段)上。该反应可以以低位点选择性或以选择性方式来进行，从而使RS1仅在抗TLT-1 mAb (片段)的一个或少数位置上反应。作为非排他性实例，RS1可以是醛并通过还原性胺化而反应，通过还原性胺化仅与抗TLT-1 mAb (片段)的N-末端反应，这是本领域技术人员已知的。另一个非排他性实例RS1可以是马来酰亚胺基团，其可与抗TLT-1 mAb (片段)上的

游离硫醇基反应。

[0365]

[0366] 在第二步骤期间，反应性基团RS2可以以低位点选择性或以位点选择性方式与FVIIa分子反应。作为非排他性实例，可获得在FVIIa的位点选择性反应，当RS2是唾液酸衍生物时，其可在合适的酶例如但不限于ST3Gal-III存在下与N-连接的聚糖反应，其不排他性地以唾液酸为末端。

[0367]

[0368] 接头与这2种蛋白质(即抗TLT-1 mAb (片段)和所述蛋白质)的连接顺序可变换，从而将RS1-接头-RS2分子先连接到蛋白质分子上，再连接到抗TLT-1 mAb (片段)上。

[0369] 另一方面，本发明提供了组合物和制剂，其包含本发明的分子，诸如本文所述的融合蛋白、多核苷酸、载体和细胞。例如，本发明提供了药物组合物，其包含一种或多种与药学上可接受的载体一起配制的本发明的融合蛋白。

[0370] 因此，本发明的一个目的是提供药物制剂，其包含以0.25 mg/ml-250 mg/ml的浓度存在的抗体，且其中所述制剂具有2.0-10.0的pH。所述制剂可另外包含缓冲液系统、防腐剂、张度剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂。防腐剂、等渗剂、螯合剂、稳定剂和表面活性剂在药物组合物中的应用是技术人员众所周知的。可参考:Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第19版, 1995。

[0371] 在一个实施方案中，所述药物制剂是水性制剂。这样的制剂通常是溶液剂或混悬剂。术语“水性制剂”被定义为包含至少50%w/w水的制剂。同样地，术语“水性溶液剂”被定义为包含至少50%w/w水的溶液剂，术语“水性混悬剂”被定义为包含至少50%w/w水的混悬剂。

[0372] 在另一个实施方案中，所述药物制剂是冷冻干燥的制剂，在使用之前，医师或患者向其中加入溶剂和/或稀释剂。

[0373] 又一方面，所述药物制剂包含这样的抗体和缓冲剂的水性溶液，其中所述抗体以1 mg/ml或以上的浓度存在，且其中所述制剂具有约2.0至约10.0的pH。

[0374] 本文使用的术语“治疗”是指有此需要的任何人或其它动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已经经历由医学从业人员进行的体格检查，所述从业人员已经给出暂时的或最终的诊断，该诊断指示:所述特定治疗的使用对所述人或其它动物受试者的健康有益。所述治疗的时机和目的可随个体不同而异，取决于受试者的健康现状。还考虑了预防性或防治性给予本发明的抗体，其中预防定义为延迟或避免疾病或病症的一个或多个症状表现恶化。因而，所述治疗可以是预防性的、治标的、针对症状的和/或治愈的。

[0375] 关于本发明，预防性的、治标的、针对症状的和/或治愈的治疗可代表本发明的单独方面。

[0376] 导致增加的出血倾向的凝血病可由以下造成:正常凝血级联的任何促凝血组分的任何定性或定量缺乏，或纤维蛋白溶解的任何上调。这样的凝血病可以是先天性的和/或获得性的和/或医源性的，且可由本领域技术人员鉴别。

[0377] 先天性的低凝血病的非限制性实例是A型血友病、B型血友病、因子VII缺乏、因子X缺乏、因子XI缺乏、血管性血友病和血小板减少症，诸如Glanzmann氏血小板无力症

(Glanzmann's thombasthenia)和伯-苏综合征(Bernard-Soulier syndrome)。

[0378] 获得性凝血病的一个非限制性实例是由维生素K缺乏造成的丝氨酸蛋白酶缺乏;这样的维生素K-缺乏可由维生素K拮抗剂(诸如华法林)的给予造成。获得性的凝血病也可发生在大面积创伤以后。在该情况下,另外称作"出血性恶性循环",其特征在于血稀释(稀释性血小板减少和凝血因子的稀释)、低体温、凝血因子的消耗和代谢紊乱(酸中毒)。液体疗法(Fluid therapy)和增加的纤维蛋白溶解可能恶化该情形。所述出血可来自身体的任何部分。

[0379] 具有"抑制剂"(也就是说,针对因子VIII的同种异体抗体)的A型血友病和具有"抑制剂"(也就是说,针对因子IX的同种异体抗体)的B型血友病,是部分先天性的和部分获得性的凝血病的非限制性实例。

[0380] 医源性凝血病的一个非限制性实例是,抗凝血药物(诸如肝素、阿司匹林、华法林和其它血小板聚集抑制剂)的超量给药,所述药物可开处方用于治疗血栓栓塞性疾病。医源性凝血病的第二个非限制性实例是由过度的和/或不适当的液体疗法诱发的凝血病,诸如可由输血诱发的凝血病。

[0381] 在本发明的一个实施方案中,出血与A型或B型血友病有关。在另一个实施方案中,出血与具有获得性抑制剂的A型或B型血友病有关。在另一个实施方案中,出血与血管性血友病有关。在另一个实施方案中,出血与严重组织损伤有关。在另一个实施方案中,出血与严重创伤有关。在另一个实施方案中,出血与手术有关。在另一个实施方案中,出血与出血性胃炎和/或肠炎有关。在另一个实施方案中,所述出血是血崩(profuse uterine bleeding),诸如在胎盘早剥中。在另一个实施方案中,出血发生在具有有限的机械止血可能性的器官中,诸如颅内地、耳内地或眼内地。在另一个实施方案中,出血与抗凝血药治疗有关。

[0382] 在又一实施方案中,出血可与血小板减少症有关。在具有血小板减少症的个体中,本发明的构建体可与血小板共同给予。

[0383] 下面是本发明实施方案的非限制性列表:

[0384] *实施方案1:* 促凝血蛋白,其包含:(i) 至少一种凝血因子,其共价地连接到(ii)抗体或其片段,所述抗体或其片段能够结合(iii) TLT-1和/或其片段或变体。

[0385] *实施方案2:* 实施方案1的促凝血蛋白,其中(iii)是TLT-1或其片段或变体。

[0386] *实施方案3:* 实施方案2的促凝血蛋白,其中(iii)是TLT-1 (16-162)。

[0387] *实施方案4:* 实施方案2的促凝血蛋白,其中(iii)是TLT-1 (20-125)。

[0388] *实施方案5:* 实施方案2的促凝血蛋白,其中(iii)是TLT-1 (126-162)。

[0389] *实施方案6:* 实施方案1-2中任一个的促凝血蛋白,其中(i)是丝氨酸蛋白酶或其衍生物。

[0390] *实施方案7:* 实施方案3的促凝血蛋白,其中(i)是因子VII多肽。

[0391] *实施方案8:* 实施方案3的促凝血蛋白,其中(i)是因子IX多肽。

[0392] *实施方案9:* 实施方案3的促凝血蛋白,其中(i)是因子X多肽。

[0393] *实施方案10:* 实施方案1-2中任一个的促凝血蛋白,其中(i)是因子V多肽。

[0394] *实施方案11:* 实施方案1-2中任一个的促凝血蛋白,其中(i)是因子VIII多肽。

[0395] *实施方案12:* 实施方案1-2中任一个的促凝血蛋白,其中(i)是因子XI多肽。

[0396] *实施方案13:* 实施方案1-6中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是单克隆抗体或其片段。

[0397] *实施方案14:* 实施方案10的促凝血蛋白,其中(ii)是Fab片段、$F(ab')_2$片段、Fab'片段、Fd片段、Fv片段、ScFv片段、dAb片段或分离的互补决定区(CDR)。

[0398] *实施方案15:* 实施方案11的促凝血蛋白,其中(ii)是Fab片段。

[0399] *实施方案16:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 5的V17、Q18、C19、H20、Y21、R22、L23、Q24、D25、V26、K27、A28、L63、G64、G65、G66、L67、L68、G89、A90、R91、G92、P93、Q94、I95和L96。

[0400] *实施方案17:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是抗体或其片段,其能够结合到与mAb0023相同的表位。

[0401] *实施方案18:* 实施方案16-17中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0402] · SEQ ID NO: 34的氨基酸50-54 (dyfmy)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0403] · SEQ ID NO: 34的氨基酸69-85 (yisnggdsssypdtvkg)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0404] · SEQ ID NO: 34的氨基酸118-129 (nknwddyydmdy)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0405] *实施方案19:* 实施方案16-18中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的轻链包含:

[0406] · SEQ ID NO: 35的氨基酸44-60 (KSSQSLLNSRTRKNYLA)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0407] · SEQ ID NO: 35的氨基酸76-82 (WASTRES)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0408] · SEQ ID NO: 35的氨基酸115-122 (KQSYNLLT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0409] *实施方案20:* 实施方案16-17中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0410] · SEQ ID NO: 34的氨基酸50-54 (dyfmy)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0411] · SEQ ID NO: 34的氨基酸69-85 (yisnggdsssypdtvkg)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0412] · SEQ ID NO: 34的氨基酸118-129 (nknwddyydmdy)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0413] 和其中(ii)的轻链包含:

[0414] · SEQ ID NO: 35的氨基酸44-60 (KSSQSLLNSRTRKNYLA)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0415] · SEQ ID NO: 35的氨基酸76-82 (WASTRES)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0416] · SEQ ID NO: 35的氨基酸115-122 (KQSYNLLT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0417] *实施方案21:* 实施方案20的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0418] · SEQ ID NO: 34的氨基酸50-54 (DYFMY)的CDR1序列;和

[0419] · SEQ ID NO: 34的氨基酸69-85 (YISNGGDSSSYPDTVKG)的CDR2序列;和

[0420] · SEQ ID NO: 34的氨基酸118-129 (NKNWDDYYDMDY)的CDR3序列,

[0421] 和其中(ii)的轻链包含:

[0422] · SEQ ID NO: 35的氨基酸44-60 (KSSQSLLNSRTRKNYLA)的CDR1序列;和

[0423] · SEQ ID NO: 35的氨基酸76-82 (WASTRES)的CDR2序列;和

[0424] · SEQ ID NO: 35的氨基酸115-122 (KQSYNLLT)的CDR3序列。

[0425] *实施方案22:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 5的L36、P37、E38、G39、C40、Q41、P42、L43、V44、S45、S46、A47、V73、T74、L75、Q76、E77、E78、D79、A80、G81、E82、Y83、G84、C85、M86、R91、G92、P93、Q94、I95、L96、H97、R98、V99、S100和L101。

[0426] *实施方案23:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是抗体或其片段,其能够结合到与mAb0051相同的表位。

[0427] *实施方案24:* 实施方案22-23中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0428] · SEQ ID NO: 36的氨基酸50-54 (DYSMH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0429] · SEQ ID NO: 36的氨基酸69-85 (VISTYYGDVRYNQKFKG)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0430] · SEQ ID NO: 36的氨基酸118-129 (APMITTGAWFAY)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0431] *实施方案25:* 实施方案22-24中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的轻链包含:

[0432] · SEQ ID NO: 37的氨基酸44-54 (KASQSVSNDVA)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代;和/或

[0433] · SEQ ID NO: 37的氨基酸70-76 (YASSRYT)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0434] · SEQ ID NO: 37的氨基酸109-117 (QQDYSSPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0435] *实施方案26:* 实施方案22-23中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0436] · SEQ ID NO: 36的氨基酸50-54 (DYSMH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0437] · SEQ ID NO: 36的氨基酸69-85 (VISTYYGDVRYNQKFKG)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0438] · SEQ ID NO: 36的氨基酸118-129 (APMITTGAWFAY)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0439] 和其中(ii)的轻链包含:

[0440] · SEQ ID NO: 37的氨基酸44-54 (KASQSVSNDVA)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代;和/或

[0441] · SEQ ID NO: 37的氨基酸70-76 (YASSRYT)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0442] · SEQ ID NO: 37的氨基酸109-117 (QQDYSSPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0443] *实施方案27:* 实施方案26的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0444] · SEQ ID NO: 36的氨基酸50-54 (DYSMH)的CDR1序列;和

[0445] · SEQ ID NO: 36的氨基酸69-85 (VISTYYGDVRYNQKFKG)的CDR2序列;和

[0446] · SEQ ID NO: 36的氨基酸118-129 (APMITTGAWFAY)的CDR3序列;

[0447] 和其中(ii)的轻链包含:

[0448] · SEQ ID NO: 37的氨基酸44-54 (KASQSVSNDVA)的CDR1序列;和

[0449] · SEQ ID NO: 37的氨基酸70-76 (YASSRYT)的CDR2序列;和

[0450] · SEQ ID NO: 37的氨基酸109-117 (QQDYSSPYT)的CDR3序列。

[0451] *实施方案28:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 5的V17、Q18、C19、H20、Y21、R22、L23、Q24、D25、V26、K27、A28、R91、G92、P93、Q94、I95、L96、H97、R98、V99、S100和L101。

[0452] *实施方案29:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是抗体或其片段,其能够结合到与mAb0062相同的表位。

[0453] *实施方案30:* 实施方案28-29中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0454] · SEQ ID NO: 42的氨基酸50-54 (SHWIE)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0455] · SEQ ID NO: 42的氨基酸69-85 (EILPGSGNTNYNEKFKG)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0456] · SEQ ID NO: 42的氨基酸118-130 (GYYGLNYDWYFDV)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0457] *实施方案31:* 实施方案28-30中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的轻链包含:

[0458] · SEQ ID NO: 39的氨基酸44-54 (RASQDISNYLN)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代;和/或

[0459] · SEQ ID NO: 39的氨基酸70-76 (YTSRLHS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0460] · SEQ ID NO: 39的氨基酸109-117 (QQDTKLPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0461] *实施方案32:* 实施方案28-31中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0462] · SEQ ID NO: 42的氨基酸50-54 (SHWIE)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0463] · SEQ ID NO: 42的氨基酸69-85 (EILPGSGNTNYNEKFKG)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0464] · SEQ ID NO: 42的氨基酸118-130 (GYYGLNYDWYFDV)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0465] 和其中(ii)的轻链包含:

[0466] · SEQ ID NO: 39的氨基酸44-54 (RASQDISNYLN)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代;和/或

[0467] · SEQ ID NO: 39的氨基酸70-76 (YTSRLHS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0468] · SEQ ID NO: 39的氨基酸109-117 (QQDTKLPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0469] *实施方案33:* 实施方案32的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0470] · SEQ ID NO: 42的氨基酸50-54 (SHWIE)的CDR1序列;和

[0471] · SEQ ID NO: 42的氨基酸69-85 (EILPGSGNTNYNEKFKG)的CDR2序列;和

[0472] · SEQ ID NO: 42的氨基酸118-130 (GYYGLNYDWYFDV)的CDR3序列;

[0473] 和其中(ii)的轻链包含:

[0474] · SEQ ID NO: 39的氨基酸44-54 (RASQDISNYLN)的CDR1序列;和

[0475] · SEQ ID NO: 39的氨基酸70-76 (YTSRLHS)的CDR2序列;和

[0476] · SEQ ID NO: 39的氨基酸109-117 (QQDTKLPYT)的CDR3序列。

[0477] *实施方案34:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 7的E5、T6、H7、K8、I9、G10、S11、L12、A13、E14、N15、A16、F17、S18、D19、P20和A21。

[0478] *实施方案35:* 实施方案34的促凝血蛋白,其中所述残基是K8、I9、G10、S11、L12、A13、N15、A16、F17、S18、D19、P20和A21。

[0479] *实施方案36:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 6的K118、I119、G120、S121、L122、A123、E124、N125、A126、F127。

[0480] *实施方案37:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是抗体或其片段,其能够结合到与mAb0061或mAb0082相同的表位。

[0481] *实施方案38:* 实施方案34-37中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0482] · SEQ ID NO: 40的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0483] · SEQ ID NO: 40的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYNPSLKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0484] · SEQ ID NO: 40的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0485] *实施方案39:* 实施方案34-38中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的轻链包含:

[0486] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0487] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (kvsnrfs)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0488] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (sqsthvpyt)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0489] *实施方案40:* 实施方案34-39中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0490] · SEQ ID NO: 40的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0491] · SEQ ID NO: 40的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYNPSLKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0492] · SEQ ID NO: 40的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0493] 和其中(ii)的轻链包含:

[0494] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0495] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0496] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0497] *实施方案41:* 实施方案40的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0498] · SEQ ID NO: 40的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列;和

[0499] · SEQ ID NO: 40的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYNPSLKD)的CDR2序列;和

[0500] · SEQ ID NO: 40的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列;

[0501] 和其中(ii)的轻链包含:

[0502] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列;和

[0503] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列;和

[0504] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列。

[0505] *实施方案42:* 实施方案34-37中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0506] · SEQ ID NO: 50的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0507] · SEQ ID NO: 50的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYAPSLKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0508] · SEQ ID NO: 50的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;

[0509] 和其中(ii)的轻链包含:

[0510] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0511] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0512] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0513] *实施方案43:* 实施方案42的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0514] · SEQ ID NO: 50的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列;和

[0515] · SEQ ID NO: 50的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYAPSLKD)的CDR2序列;和

[0516] · SEQ ID NO: 50的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列;

[0517] 和其中(II)的轻链包含:

[0518] · SEQ ID NO: 41的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFH)的CDR1序列;和

[0519] · SEQ ID NO: 41的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列;和

[0520] · SEQ ID NO: 41的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列。

[0521] *实施方案44:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的互补位包含一个或多个选自以下的残基:抗TLT-1 轻(L)链(SEQ ID NO: 33)的H50、N52、Y56、H58、Y73、F79、S115、T116、V118和Y120,以及抗TLT-1重(H)链(SEQ ID NO: 32)的残基V20、F45、R49、Y50、W51、E68、T75、N77、S116、G117、V118和T120。

[0522] *实施方案45:* 实施方案13-15和44中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的表位包含一个或多个选自以下的残基:SEQ ID NO: 4的K133、I134、G135、S136、L137、A138、N140、A141、F142、S143、D144、P145和A146。

[0523] *实施方案46:* 实施方案13-15中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是抗体或其片段,其能够结合到与mAb0012相同的表位。

[0524] *实施方案47:* 实施方案44-46中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0525] · SEQ ID NO: 32的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0526] · SEQ ID NO: 32的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYTPSLKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0527] · SEQ ID NO: 32的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代。

[0528] *实施方案48:* 实施方案44-47中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的轻链包含:

[0529] · SEQ ID NO: 33的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0530] · SEQ ID NO: 33的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0531] · SEQ ID NO: 33的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0532] *实施方案49:* 实施方案44-48中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0533] · SEQ ID NO: 32的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1个可被不同氨基酸取代;和/或

[0534] · SEQ ID NO: 32的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYTPSLKD)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0535] · SEQ ID NO: 32的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1、2或3个可被不同氨基酸取代,

[0536] 和其中(ii)的轻链包含:

[0537] · SEQ ID NO: 33的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH)的CDR1序列,其中这些氨基酸中的1、2、3或4个可被不同氨基酸取代;和/或

[0538] · SEQ ID NO: 33的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代;和/或

[0539] · SEQ ID NO: 33的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列,其中这些氨基酸中的1个或2个可被不同氨基酸取代。

[0540] *实施方案50:* 实施方案49的促凝血蛋白,其中(ii)的重链包含:

[0541] · SEQ ID NO: 32的氨基酸49-53 (RYWMT)的CDR1序列;和

[0542] · SEQ ID NO: 32的氨基酸68-84 (EINPDSSTINYTPSLKD)的CDR2序列;和

[0543] · SEQ ID NO: 32的氨基酸117-121 (GVFTS)的CDR3序列;

[0544] 和其中(ii)的轻链包含:

[0545] · SEQ ID NO: 33的氨基酸43-58 (RSSQSLVHRNGNTYFTH)的CDR1序列;和

[0546] · SEQ ID NO: 33的氨基酸74-80 (KVSNRFS)的CDR2序列;和

[0547] · SEQ ID NO: 33的氨基酸113-121 (SQSTHVPYT)的CDR3序列。

[0548] *实施方案51:* 实施方案1-50中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是人单克隆抗体或其片段。

[0549] *实施方案52:* 实施方案1-50中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是嵌合抗体或其片段。

[0550] *实施方案53:* 实施方案1-50中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)是人源化抗体或其片段。

[0551] *实施方案54:* 实施方案51-53中任一个的促凝血蛋白,其中(ii)的同种型是IgG。

[0552] *实施方案55:* 实施方案54的促凝血蛋白,其中所述同种型是IgG1、IgG2或IgG4。

[0553] *实施方案56:* 实施方案55的促凝血蛋白,其中所述同种型是IgG4。

[0554] *实施方案57:* 实施方案1-56中任一个的促凝血蛋白,其还包含介于(i)和(ii)之间的接头。

[0555] *实施方案58:* 实施方案1-57中任一个的促凝血蛋白,其是融合蛋白。

[0556] *实施方案59:* 实施方案1-57中任一个的促凝血蛋白,其是 (i)和(ii)的缀合物。

[0557] *实施方案60:* 实施方案59的缀合物,其中(i)和(ii)通过包含聚乙二醇(PEG)的接头而共价连接。

[0558] *实施方案61:* 实施方案59-60中任一个的缀合物,其中(i)和(ii)通过至少一种所述蛋白的聚糖而共价缀合。

[0559] *实施方案62:* 一种制备包含实施方案59-61中任一个的至少一种缀合物的组合物的方法,所述方法包括:(i) 将TLT-1抗体或其片段与接头的一个反应性基团(RS1)化学缀合,和(ii) 使凝血因子与所述接头的另一反应性基团(RS2)反应。

[0560] *实施方案63:* 实施方案62中限定的方法,其中(i)是单克隆抗体。

[0561] *实施方案64:* 实施方案62中限定的方法,其中(i)是单克隆抗体的片段。

[0562] *实施方案65:* 实施方案64中限定的方法,其中(i)是Fab片段。

[0563] *实施方案66:* 实施方案65中限定的方法,其中所述Fab片段在恒定区含有一个Cys突变。

[0564] *实施方案67:* 实施方案62中限定的方法,其中(i)是sc-Fab片段。

[0565] *实施方案68:* 实施方案62-67的任一个中限定的方法,其中(ii)是FV多肽。

[0566] *实施方案69:* 实施方案62-67的任一个中限定的方法,其中(ii)是FVIIa多肽。

[0567] *实施方案70:* 实施方案62-67的任一个中限定的方法,其中(ii)是FVIII多肽。

[0568] *实施方案71:* 实施方案62-67的任一个中限定的方法,其中(ii)是FIX多肽。

[0569] *实施方案72:* 实施方案62-67的任一个中限定的方法,其中(ii)是FX多肽。

[0570] *实施方案73：* 实施方案62-67的任一个中限定的方法，其中(ii)是FXI多肽。

[0571] *实施方案74：* 实施方案62-73的任一个中限定的方法，其中所述接头是水溶性的。

[0572] *实施方案75：* 实施方案62-74的任一个中限定的方法，其中所述接头是聚合物。

[0573] *实施方案76：* 实施方案74-75的任一个中限定的方法，其中(ii)是聚乙二醇(PEG)。

[0574] *实施方案77：* 实施方案74-75的任一个中限定的方法，其中(ii)是多唾液酸。

[0575] *实施方案78：* 实施方案74-75的任一个中限定的方法，其中(ii)是羟乙基淀粉。

[0576] *实施方案79：* 实施方案62-78的任一个中限定的方法，其中RS1是醛。

[0577] *实施方案80：* 实施方案62-78的任一个中限定的方法，其中RS1是马来酰亚胺基团。

[0578] *实施方案81：* 实施方案62-78的任一个中限定的方法，其中RS1是能够在酶催化反应中起反应的活化的碳水化合物衍生物。

[0579] *实施方案82：* 实施方案81中限定的方法，其中RS1是能够在酶催化反应中起反应的活化的唾液酸衍生物。

[0580] *实施方案83：* 实施方案82中限定的方法，其中RS1是O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸。

[0581] *实施方案84：* 实施方案62-83的任一个中限定的方法，其中RS2是醛。

[0582] *实施方案85：* 实施方案62-83的任一个中限定的方法，其中RS2是马来酰亚胺基团。

[0583] *实施方案86：* 实施方案62-83的任一个中限定的方法，其中RS2是能够在酶催化反应中起反应的活化的碳水化合物衍生物。

[0584] *实施方案87：* 实施方案62-83的任一个中限定的方法，其中RS2是唾液酸衍生物。

[0585] *实施方案88：* 实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白，其中(ii)的K_D小于100 nM，例如小于10 nM。

[0586] *实施方案89：* 将凝血因子或其功能性片段靶向活化的血小板表面的方法，所述方法包括将活化的血小板与实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白接触。

[0587] *实施方案90：* 用作药物的实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白。

[0588] *实施方案91：* 用作促凝血剂的实施方案87的促凝血蛋白。

[0589] *实施方案92：* 一种药物制剂，所述制剂包含实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白。

[0590] *实施方案93：* 用于治疗凝血病的实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白，或实施方案92的药物制剂。

[0591] *实施方案94：* 实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白在制备用于治疗凝血病的药物中的用途。

[0592] *实施方案95：* 实施方案93或94中任一个的用途，其中所述凝血病是有或没有抑制剂的A型血友病，或者有或没有抑制剂的B型血友病。

[0593] *实施方案96：* 一种治疗凝血病的方法，所述方法包括将有效量的实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白，或实施方案93的制剂给予有此需要的个体。

[0594] *实施方案97：* 实施方案95的方法，其中所述凝血病是有或没有抑制剂的A型血友

病，和有或没有抑制剂的B型血友病。

[0595] *实施方案98：* 一种多核苷酸，其编码实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白。

[0596] *实施方案99：* 一种分离的细胞，其包含实施方案1-61中任一个的融合蛋白和/或实施方案97的多核苷酸。

[0597] *实施方案100：* 实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白，其中(ii)结合到TLT-1上，而不与纤维蛋白原竞争性结合到TLT-1上。

[0598] *实施方案101：* 实施方案1-61中任一个的促凝血蛋白，其中(ii)不抑制血小板聚集。

[0599] 下面的实施例进一步例证了本发明，所述实施例不应当解释为进一步限制。在本申请中引用的所有附图和所有参考文献的内容明确通过引用并入本文。

实施例

[0600] 在实施例中，抗TLT-1抗体及其片段(例如Fab片段)用于将凝血因子靶向活化的血小板。为了容易地解释实施例中给出的数据，表3a概述了进一步描述于下文的某些抗TLT-1抗体及其片段的相关信息。在表3A中，参考母体mAb和蛋白类型，列出了母体抗体、其变体、片段、融合物和缀合物。名称是指蛋白的名称，母体是指抗TLT-1 mAb、Fab或融合物/缀合物所源自的抗体，类型限定了蛋白是否是mAb、Fab、具有凝血因子的DNA融合物(融合物)或具有凝血因子的化学缀合物(缀合物)。

[0601] *表3A:抗*体(mAb)、抗体片段(Fab)和融合蛋白的概述

[0602]

名称	母体	类型
mAb0012	mAb0012	mAb
mAb0023	mAb0023	mAb
mAb0051	mAb0051	mAb
mAb0052	mAb0052	mAb
mAb0061	mAb0012	mAb
mAb0062	mAb0052	mAb
mAb0082	mAb0012	mAb
Fab0003	mAb0052	Fab
Fab0004	mAb0023	Fab
Fab0012	mAb0012	Fab
Fab0023	mAb0023	Fab
Fab0051	mAb0051	Fab
Fab0052	mAb0052	Fab
Fab0061	mAb0012	Fab
Fab0074	mAb0051	Fab
Fab0082	mAb0012	Fab
Fab0084	mAb0012	Fab

FVIIa-Fab1001	mAb0012	缀合物(FVIIa)
FVIIa-Fab1029	mAb0012	缀合物(FVIIa)
FVII-Fab5001	mAb0052	融合物(FVII)
FVIIa-Fab9015	mAb0012	缀合物(FVIIa)
FIX-Fab0135	mAb0012	融合物(FIX)
FIX-mAb0145	mAb0012	缀合物(FIX)
FIX-Fab0155	mAb0012	缀合物(FIX)

[0603] 实施例1: hTLT-1 ECD-His抗原的克隆和表达。

[0604] 使用含有HindIII识别位点以及kozak序列的正向引物和含有终止密码子和EcoRI识别位点的反向引物(图2),PCR扩增编码人TLT-1 (hTLT-1)的胞外结构域的核苷酸序列(图1)以及C-端His-6标签。将HindIII-和EcoRI消化的PCR片段插入基于pTT的表达载体的HindIII-和EcoRI位点中。pTT载体基本上如Durocher,Y.等人, (2002) Nucleic Acid Res, 30: E9所述。得到的表达质粒被命名为pTT-hTLT-1 ECD-His。hTLT-1 ECD-His的核苷酸序列和氨基酸序列示于SEQ ID NO: 3和4。将pTT-hTLT-1 ECD-His转染进HEK293-6E悬浮细胞中,以便短暂表达hTLT-1 ECD-His。在补充了1%P/S (GIBCO目录号15140-122)、0.1% pluronic (GIBCO,目录号24040-032)和25 ug/mL遗传霉素(GIBCO,目录号10131-019)的Freestyle HEK293培养基(GIBCO,目录号12338-018)中培养HEK293-6E细胞,使用293fectin (Invitrogen,目录号12347-019),以1 mill/mL的细胞密度转染细胞。对于每升HEK293-6E细胞,如下进行转染:将1 mg pTT-hTLT-1 ECD-His DNA稀释进30 mL Optimem (稀释液A)中,并将1 mL 293fectin稀释进30 mL Optimem (GIBCO,目录号51985-026, 稀释液B)中。混合稀释液A和B,并在室温温育30分钟。此后,将转染混合物加入HEK293-6E细胞,并在加湿培养箱中在定轨旋转(125 rpm)下在37℃温育细胞。转染后5-7天,通过离心去除细胞,并无菌过滤得到的含有hTLT-1 ECD-His的上清液,然后纯化。

[0605] 实施例2: hTLT-1 ECD-His蛋白的纯化和表征。

[0606] 按照如下组成的2步法纯化hTLT1 ECD-His蛋白:1)使用钴装载的树脂TALON (Clontech,目录号635506)的His-亲和色谱法,和2)使用细颗粒树脂Source 15Q (GE Healthcare,目录号17-0947)的阴离子交换色谱法。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare,目录号18-1112-41)进行纯化。用于第一个纯化步骤的缓冲液系统是:由20 mM Hepes(pH 7.0)、150 mM NaCl组成的平衡缓冲液,由20 mM Hepes(pH 7.0)、0.5 M NaCl组成的洗涤缓冲液,和由20 mM Hepes(pH 7.0)、150 mM咪唑组成的洗脱缓冲液。不经任何调节,将细胞上清液直接加样到预平衡的TALON柱。用20柱体积的平衡缓冲液、20柱体积的洗涤缓冲液和最后的20柱体积的平衡缓冲液,洗涤所述柱。在约5柱体积的洗脱缓冲液中,等度洗脱蛋白。使用SDS-PAGE/考马斯NuPage 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen,目录号NP0321BOX)和安置在Micro-flex系统(Bruker Daltonics)上的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS),分析洗脱的蛋白的分子质量。在这里,观察到几乎等量的约16.7和33.4 kDa的2种不同的蛋白质量。观察到的质量对应着hTLT1 ECD-His的单体和二聚体形式。还原所述蛋白导致33.4 kDa蛋白的完全消除,同时增强了16.7 kDa蛋白,这从SDS-PAGE/考马斯分析判断出。因而,hTLT-1 ECD-His蛋白含有互连的C-C二聚体。为了使单体与

二聚体分离，采用第二个纯化步骤。用于该纯化步骤的缓冲液系统是：由50 mM Hepes(pH 8.0)组成的平衡缓冲液，由50 mM Hepes(pH 8.0)、1 M NaCl组成的洗脱缓冲液。使用1 M NaOH，将样品调节至pH 8.0，然后稀释至约10 mS/cm的电导率。将蛋白加样到预平衡的Source 15Q柱，用5柱体积的平衡缓冲液洗涤，使用0 - 100%洗脱缓冲液经20柱体积洗脱。基于UV280监测，2个峰是明显的，几乎基线分离。使用SDS-PAGE/考马斯、MALDI-TOF MS和使用Dynapro仪器(Wyatt Technology)的动态光散射(DLS)分析，分析这2个峰内的流分，显示单体hTLT-1 ECD-His蛋白存在于第一洗脱的峰中，Cys-Cys二聚体存在于第二洗脱的峰中。制备仅含有单体hTLT-1 ECD-His蛋白的合并物(pool)。基于安置在Agilent LC 1100/1200系统上的大小排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)方法，并使用BIOSep-SEC-S3000 300x7.8mm柱(Phenomenex，目录号00H-2146-K0)和由200 mM磷酸钠pH 6.9、300 mM NaCl和10%异丙醇组成的电泳缓冲液，分析最终的蛋白完整性。所述蛋白洗脱为单个对称峰，保留时间为约9.9 min，流速为1 ml/min。

[0607] 为生产单克隆抗-TLT1抗体的免疫研究制备一批hTLT-1 ECD-His。因而，使用Slide-A-Lyzer透析盒10kDa MWCO (Pierce，目录号66453)，将蛋白透析进等渗PBS缓冲液中。为了测量最终的蛋白浓度，使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific)，且消光系数为0.55。

[0608] 实施例3: 单克隆TLT-1抗体的制备。

[0609] 通过注射50 μg hTLT-1 ECD-His来免疫RBF小鼠。皮下FCA以后，2次注射在FIA中的20μg hTLT-1 ECD-His。用25μg hTLT-1 ECD-His静脉内地强化免疫(boost)高应答小鼠，3天以后收获脾脏。将脾细胞与骨髓瘤Fox细胞系融合。在特异性ELISA中和在FACS测定(分别使用hTLT-1-或模拟转染的CHO细胞作为阳性和阴性靶细胞)中，筛选上清液中的hTLT-1特异性抗体生产。在人、食蟹猴、狗、兔或小鼠来源的静止的相对于双激动的活化血小板上进行第二筛选。

[0610] 实施例4: 来自杂交瘤的抗TLT-1 mAb LC和HC cDNA的克隆和测序。

[0611] 从4个如下命名的表达不同抗-TLT-1 mAb的杂交瘤中提取总RNA：0012Hyb、0023Hyb、0051Hyb和0052Hyb。使用RNeasy微型试剂盒(Qiagen，目录号74106)，从杂交瘤细胞提取RNA，将得到的RNA的等分试样用作第一链cDNA合成的模板，其中按照生产商关于5’RACE的说明书使用SMART RACE cDNA扩增试剂盒(Clontech，目录号634914)，并使用5’RACE CDS引物A以及SMART II A RNA寡核苷酸。此后，使用UPM正向引物混合物，以及小鼠LC κ特异性的反向引物(反向引物编号339、348或610)或识别小鼠IgG1、IgG2a、IgG2b或IgG3序列的反向引物(反向引物编号341、347、613、614、615或616，引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中)，PCR扩增来自4个抗TLT-1 杂交瘤中的每一个的轻链(LC)和重链(HC)编码区cDNA。使用phusion PCR混合物(FinnZymes，目录号: F-531L)，进行PCR反应。使用用于测序的Zero blunt Topo PCR克隆试剂盒(Invitrogen，目录号K287540)，克隆得到的PCR片段，并测序。0012LC和HC的可变结构域序列如图3所示。

[0612] 实施例5: pTT-0012HC、pTT-0023HC、pTT-0051HC和pTT-0052HC表达构建体的开发。

[0613] 使用为了克隆目的而含有HinDIII限制性酶位点的正向引物和含有NheI限制性酶位点的反向引物，PCR扩增从4个不同的抗TLT-1杂交瘤中的每一个分离出的编码HC可变结

构域(V_H)的DNA序列。使用phusion PCR混合物(FinnZymes,目录号F-531L),分别使用下面的引物编号对,PCR扩增0012V_H、0023V_H、0051V_H和0052V_H DNA序列:490 (正向) + 491 (反向)、546 (正向) + 547 (反向)、627 (正向) + 628 (反向)和617 (正向) + 618 (反向,引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中),并插入命名为pTT-hIgG4的基于pTT的载体的HinDIII和NheI限制性酶位点,所述pTT-hIgG4含有编码人IgG4 HC序列的恒定区(即CH1-铰链-CH2-CH3)。所述pTT载体基本上如Durocher, Y.等人, (2002) Nucleic Acid Res, 30: E9 (图22)所述。得到的载体被命名为pTT-0012HC (图5)、pTT-0023HC、pTT-0051HC和pTT-0052HC。显示了由表达载体编码的抗TLT-1 HC氨基酸序列(SEQ. ID NO.: 0012HC: 32、0023HC: 34、0051HC: 36、0052HC: 38)。

[0614] 实施例6: pTT-0012LC、pTT-0023LC、pTT-0051LC和pTT-0052LC表达构建体的开发。

[0615] 使用为了克隆目的而含有HinDIII限制性酶位点的正向引物和含有BsiWI限制性酶位点的反向引物,PCR扩增从4个不同的抗TLT-1 杂交瘤中的每一个分离出的编码LC可变结构域(V_L)的DNA序列。分别使用下面的引物编号对,PCR扩增0012V_L、0023V_L、0051V_L和0052V_L DNA序列:493 (正向) + 495 (反向)、548 (正向) + 549 (反向)、492 (正向) + 494 (反向)和619 (正向) + 620 (反向引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中),并插入命名为pTT-hLCκ的基于pTT的载体的HinDIII和BsiWI限制性酶位点,所述pTT-hLCκ含有编码人LCκ序列的恒定区。得到的载体被命名为pTT-0012LC、pTT-0023LC、pTT-0051LC和pTT-0052LC。显示了由表达载体编码的抗TLT-1 LC氨基酸序列(SEQ ID NO: 0012LC: 33、0023LC: 35、0051LC: 37、0052LC: 39)。

[0616] 实施例7: pTT-0012HC.T60N、pTT-0012HC.T60A、pTT-0012LC.C36A和pTT-0052HC.C91Y的开发。

[0617] 0012V_H氨基酸序列含有潜在的N-连接的糖基化位点(T60,Kabat编号),且0012V_L和0052V_H氨基酸序列各自含有未成对的Cys (分别是C36和C91,Kabat编号)。按照生产商的说明书,使用定点诱变(Quickchange II, Stratagene,目录号20523-5),开发了编码0012HC.T60N或0012HC.T60A或0012LC.C36A或0052HC.C91Y的表达载体。如下进行定点诱变反应:a)对于pTT-0012HC.T60N,使用pTT-0012HC DNA作为模板,并使用引物编号682 (正向) + 683 (反向),b)对于pTT-0012HC.T60A,使用pTT-0012HC DNA作为模板,并使用引物编号688 (正向) + 689 (反向),c)对于pTT-0012LC.C36A,使用pTT-0012LC DNA作为模板,并使用引物编号598 (正向) + 599 (反向),d)对于pTT-0052HC.C91Y,使用pTT-0052HC DNA作为模板,并使用下述引物编号684 (正向) + 685 (反向,引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中)。将得到的表达载体测序,以便验证DNA序列。显示了由pTT-0012HC.T60N、pTT-0012HC.T60A和pTT-0012LC.C36A表达载体编码的抗TLT-1 HC和LC氨基酸序列(SEQ ID NO: 0012HC.T60N (也称为0061HC): 40, 0012HC.T60A (也称为0082HC): 43, 0012LC.C36A (也称为0061LC): 41)。在SEQ ID NO: 153中也显示了0012LC.C36A氨基酸序列,不含N-端信号肽序列。

[0618] 实施例8: pTT-0012LC-HPC4、pTT-0012LC.C36A-HPC4、pTT-0023LC-HPC4、pTT-0051LC-HPC4和pTT-0052LC-HPC4表达构建体的开发。

[0619] 使用为了克隆目的而含有HinDIII限制性酶位点的正向引物和含有BsiWI限制性

酶位点的反向引物，PCR扩增从4个不同的抗TLT-1 杂交瘤中的每一个分离出的编码V_L的DNA序列。使用phusion PCR混合物(FinnZymes，目录号F-531L)，分别使用下面的引物编号对，PCR扩增0012V_L、0012V_L.C36A、0023V_L、0051V_L和0052V_L DNA序列：493 (正向) + 495 (反向)、493 (正向) + 495 (反向)、548 (正向) + 549 (反向)、492 (正向) + 494 (反向)和619 (正向) + 620 (反向，引物序列示于表4和SEQ ID NO: 60-145中)。使用正向引物编号486和反向引物编号485，PCR扩增人C_Lκ编码序列。正向引物编号486含有BsiWI限制性酶位点，反向引物485编码HPC4标签(接着是终止密码子)，并含有用于克隆目的的3'侧接EcoRI位点。使用phusion PCR混合物(FinnZymes，目录号F-531L)，进行PCR反应。将HindIII+BsiWI消化的0012V_L PCR片段与BsiWI+EcoRI消化的人C_L，κ-HPC4 PCR片段混合，并插入基于pTT的表达载体的HinDIII + EcoRI位点，产生pTT-0012LC-HPC4 (图4)。为了开发编码剩余的4种抗TLT-1 LC序列的LC-HPC4形式的对应表达载体，用HinDIII+ BsiWI切除pTT-0012LC-HPC4中的0012V_L序列，并用HinDIII+BsiWI消化的0023V_L、0051V_L、0052V_L和0012V_L.C36A PCR片段替换。得到的4种表达载体被命名为：pTT-0023LC-HPC4、pTT-0051LC-HPC4、pTT-0052LC-HPC4和pTT-0012LC.C36A.HPC4 (图4B)。由pTT-0012LC.C36A-HPC4、pTT-0023LC-HPC4、pTT-0051LC-HPC4和pTT-0052LC-HPC4编码的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 0012LC.C36A-HPC4 (也称为0061LC-HPC4)：167，0023LC-HPC4：179，0051LC-HPC4：177，0052LC-HPC4 (也称为0062LC-HPC4)：174。

[0620] 实施例9：pTT-0012V_H.T60N-CH1-YGPPC、pTT-0023V_H-CH1-YGPPC、pTT-0051V_H-CH1-YGPPC和pTT-0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC表达构建体的开发。

[0621] 分别使用下述正向和反向引物对，分别从pTT-0012HC.T60N、pTT-0023HC、pTT-0051HC和pTT-0052HC.C91Y经PCR扩增0012V_H.T60N-CH1-YGPPC、0023V_H-CH1-YGPPC、0051V_H-CH1-YGPPC和0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC序列(YGPPC是部分人IgG4铰链氨基酸序列)：572 (正向) + 698 (反向)、576 (正向) + 698 (反向)、627 (正向)+698 (反向)和617 (正向)+698 (反向)。为了克隆目的，正向引物含有HinDIII限制酶位点，反向引物698含有终止密码子和EcoRI位点。所得PCR片段用HinDIII+EcoRI消化，然后插入到基于pTT的载体的HinDIII+EcoRI位点上。所得表达载体被命名为pTT-0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (图4A)、pTT-0023V_H-CH1-YGPPC、pTT-0051V_H-CH1-YGPPC和pTT-0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC。由pTT-0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (图4A)、pTT-0023V_H-CH1-YGPPC、pTT-0051V_H-CH1-YGPPC和pTT-0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC所编码的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 0012V_H.T60N-CH1-YGPPC (也称为0061VH-CH1-YGPPC)：171，0023V_H-CH1-YGPPC：178，0051V_H-CH1-YGPPC 176，0052V_H.C91Y-CH1-YGPPC (也称为0062VH-CH1-YGPPC)：175。

[0622] 实施例10：pTT-0012V_H-CH1、pTT-0012V_H-CH1-HPC4、pTT-0023V_H-CH1、pTT-0023V_H-CH1-HPC4、pTT-0051V_H-CH1、pTT-0051V_H-CH1-HPC4、pTT-0052V_H-CH1和pTT-0052V_H-CH1-HPC4表达构建体的开发。

[0623] 使用phusion PCR混合物(FinnZymes，目录号F-531L)，并分别使用以下引物编号，PCR扩增从0012Hyb、0023Hyb、0051Hyb、0052Hyb分离出的0012V_H、0023V_H、0051V_H和0052V_H序列：490 (正向) + 491 (反向)、546 (正向) + 547 (反向)、627 (正向) +628 (反向)、617 (正向) + 618 (反向，引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中)。为了克隆目的，所有正向引物(490、546、627和617)含有HinDIII位点，且所有反向引物(491、547、628和618)含有

NheI位点。使用引物编号489 (正向) + 488 (反向)或引物编号489 (正向) + 487 (反向),PCR扩增人IgG_4 CH1区。正向引物编号489含有NheI位点,反向引物编号488含有终止密码子和EcoRI位点,反向引物编号487含有HPC4标签编码序列、终止密码子和随后的用于克隆目的的EcoRI位点。将HinDIII+NheI消化的$0012V_H$ PCR片段与NheI+EcoRI消化的人IgG_4 CH1 PCR片段合并,或与NheI+EcoRI消化的人IgG_4 CH1-HPC4 PCR片段合并,并克隆进基于pTT的载体的HindIII+EcoRI位点。得到的载体分别被命名为pTT-$0012V_H$-CH1和pTT-$0012V_H$-CH1-HPC4。pTT-$0012V_H$-CH1-HPC4载体示于图5B。$0012V_H$-CH1-HPC4氨基酸和DNA序列示于SEQ ID NO 168-169。通过HindIII+NheI消化,切除pTT-$0012V_H$-CH1和pTT-$0012V_H$-CH1-HPC4的V_H结构域,并插入HinDIII+NheI消化的0197-0000-$0023V_H$、0197-0000-$0051V_H$和0197-0000-$0052V_H$ PCR片段。得到的表达载体被命名为:pTT-$0023V_H$-CH1、pTT-$0023V_H$-CH1-HPC4、pTT-$0051V_H$-CH1、pTT-$0051V_H$-CH1-HPC4、pTT-$0052V_H$-CH1和pTT-$0052V_H$-CH1-HPC4。

[0624] 实施例11: pTT-$0012V_H$.T60N-CH1、pTT-$0012V_H$.T60N-CH1-HPC4、pTT-$0052V_H$.C91Y-CH1和pTT-$0052V_H$.C91Y-CH1-HPC4表达构建体的开发。

[0625] 使用phusion PCR混合物(FinnZymes,目录号F-531L),分别从pTT-0012HC.T60N和pTT-0052HC.C91Y PCR扩增$0012V_H$.T60N-CH1和$0052V_H$.C91Y-CH1序列(包括信号肽编码序列)。对于$0012V_H$.T60N-CH1 PCR片段,使用为了克隆目的含有HinDIII限制性酶位点的正向引物编号572和含有EcoRI位点的反向引物编号488或含有HPC4标签编码序列以及用于克隆目的的EcoRI位点的反向引物487。对于$0052V_H$.C91Y-CH1 PCR片段,使用正向引物编号617以及反向引物编号488或487 (引物序列示于表4和SEQ ID NO 60-145中)。所得PCR片段用HinDIII+ EcoRI消化,并插入到基于pTT的载体的HinDIII + EcoRI位点。所得表达载体被命名为pTT-$0012V_H$.T60N-CH1、pTT-$0012V_H$.T60N-CH1-HPC4、pTT-$0052V_H$.C91Y-CH1和pTT-$0052V_H$.C91Y-CH1-HPC4。由pTT-$0012V_H$.T60N-CH1所编码的氨基酸序列示于SEQ ID NO: $0012V_H$.T60N-CH1 (也称为0061VH-CH1): 146,而没有N-端信号肽序列的相应氨基酸序列示于SEQ ID NO: 152。

[0626] 实施例12: pTT-FIX-L4b-0012LC和pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A表达构建体的开发。

[0627] 使用正向引物753和反向引物754,从人FIX DNA序列PCR扩增FIX DNA序列(包括信号肽编码序列)。为了克隆目的,将正向引物753插入5'末端HinDIII限制酶位点,将反向引物754插入含有3'末端BamHI限制酶位点的17个氨基酸长的甘氨酸-丝氨酸接头(L4b: GGGGSGGGGSGGGGSGS)。将FIX-L4b PCR片段插入到pTT-hTF.1-219-L4b-0012LC的HinDIII + BamHI位点,即替换hTF.1-219 DNA序列,得到FIX-L4b-0012LC表达构建体,命名为pTT-FIX-L4b-0012LC (图5A)。FIX-L4b-0012LC氨基酸和DNA序列示于SEQ ID NO: 172-173。

[0628] 为了开发编码pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A的表达质粒,使用pTT-0012LC.C36A作为模板并使用含有5'末端BamHI位点的正向引物1055和含有终止密码子和为了克隆目的的EcoRI位点的反向引物1056,PCR扩增不包括信号肽序列的0012LC.C36A编码区(表4)。将所得PCR片段插入到pTT-FIX-L4b-0012LC的BamHI和EcoRI位点,即用0012LC.C36A DNA序列替换0012LC DNA序列。所得表达载体被称为pTT-FIX-L4b-0012LC.C36A并编码示于SEQ ID NO: FIX-L4b-0012LC.C36A (也称为FIX-L4b-0061LC): 182的氨基酸序列。

[0629] 实施例13: pTT-FVII-L4b-$0052V_H$.C91Y-CH1-HPC4表达构建体的开发。

[0630] 使用正向引物751和反向引物752,从人FVII DNA序列PCR扩增人FVII DNA序列(包括信号肽编码序列)。为了克隆目的,将正向引物751插入5'末端HinDIII限制酶位点,将反向引物752插入含有3'末端BamHI限制酶位点的17个氨基酸长的甘氨酸-丝氨酸接头(L4b:GGGGSGGGGSGGGGSGS)。将FVII-L4b PCR片段插入到pTT-hTF.1-219-L4b-0012LC的HinDIII + BamHI位点,即替换hTF.1-219 DNA序列,得到FVII-L4b-0012LC表达构建体,命名为pTT-FVII-L4b-0012LC。使用pTT-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4载体作为模板并使用含有5'末端BamHI限制酶位点的正向引物1236和使用含有终止密码子和为了克隆目的的EcoRI位点的反向引物1095,PCR扩增编码0052V_H C91Y-CH1-HPC4的DNA序列。将所得PCR片段插入到pTT-FVII-L4b-0012LC的BamHI + EcoRI位点,即替换0012LC序列,得到表达载体,命名为pTT-FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4。FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4氨基酸示于SEQ ID NO:FVII-L4b-0052VH.C91Y-CH1-HPC4 (也称为FVII-L4b-0062VH-CH1-HPC4): 180。

[0631] 实施例14: HEK293-6E细胞的瞬时转染。

[0632] 通过将表达质粒瞬时转染进细胞中,在HEK293-6E悬浮细胞中表达所有mAb、Fab和融合蛋白。在表5中显示了作为得到的具体蛋白化合物的基础的单个质粒组合。在补充了1% P/S (GIBCO,目录号15140-122)、0.1%pluronic (GIBCO,目录号24040-032)和25 ug/mL遗传霉素(GIBCO,目录号10131-019)的Freestyle HEK293培养基(GIBCO,目录号12338-018)中培养HEK293-6E细胞,根据生产商的说明书,使用293fectin (Invitrogen,目录号12347-019),以大约1 mill/mL的细胞密度,转染细胞。简而言之,对于每升HEK293-6E细胞,通过将总共1 mg DNA稀释进30 mL Optimem (稀释液A)中,并将1 mL 293fectin稀释进30 mL Optimem (GIBCO,目录号51985-026, 稀释液B)中,进行转染。混合稀释液A和B,并在室温温育30分钟。此后,将转染混合物加入HEK293-6E细胞,并在加湿培养箱中在定轨旋转(125 rpm)下在37℃温育细胞。转染后5-7天,通过离心去除细胞,并无菌过滤得到的细胞培养物上清液,然后纯化。对于使用2个表达质粒的共转染的所有瞬时转染实验,对于每升要转染的HEK293-6E细胞使用1mg DNA总量,以1:1 (ug:ug)质粒比率共转染质粒。

[0633] *表4: 引物编号和序列。*

[0634]

引物编号	引物序列(5'至3')
339	act gga tgg tgg gaa gat gga tac agt
341	aga tcc agg ggc tag cgg ata gac aga
347	cct gta gga cca gag ggc tcc aag gac act
348	gga gct ggt ggt ggc atc tca gga cct ttg
448	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg gag acc cct gcc tgg ccc cgg gtc
467	gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc ttc tct aaa ttc ccc ttt ctc ctg gcc cat
484	gaa ttt agc ggc cgc gaa ttc gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc
485	aaa ttt gaa ttc tta ctt gcc gtc gat cag tct ggg gtc cac ctg gtc ctc aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt tgt gac
486	a cgg atc tct agc aag ctt cgt acg gtg gc
487	aaa ttt gaa ttc tta ctt gcc gtc gat cag tct ggg gtc cac ctg gtc ctc ttt gga ctc aac tct ctt gtc cac ctt ggt
488	aaa ttt gaa ttc tta ttt gga ctc aac tct ctt gtc cac ctt ggt
489	acg gat ctc tag c aag ctt gct agc ac caa

490	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt gct
491	aaa ttt gct agc tgc aga gac agt gac cag agt ccc ttg gcc cca
492	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aag tca cag acc cag gtc ttc gta ttt
493	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aag ttg cct gtt ggg ctg ttg gtg ctg
494	aaa ttt cgt acg ttc tat ttc cag ctt ggt ccc ccc tc
495	aaa ttt cgt acg ttt tat ttc cag ctt ggt ccc ccc tcc gaa
546	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aac ttg ggg ctc agc ttg att ttc ctt gtc
547	aaa ttt gct agc tga gga gac ggt gac tga ggt tcc ttg acc
548	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat tca cag gcc cag gtt ctt ata ttg ctg
549	aaa ttt cgt acg ttt cag ctc cag ctt ggt ccc agc acc gaa
551	aaa ttt aaa ttt gga tcc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc
572	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gat ttt ggg ctg att ttt ttt att gtt gct
576	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg aac ttg ggg ctc agc ttg att ttc ctt
598	gga aac acc tat ttt cat tgg gcc ctg cag aaa cca ggc cag tct
599	aga ctg gcc tgg ttt ctg cag ggc cca atg aaa ata ggt gtt tcc
610	gctctaga cta aca ctc att cct gtt gaa gct ctt g
613	aaaaa tctagaata gac aga tgg ggg tgt cgt ttt ggc
614	aaaaa tctaga ctt gac cag gca tcc tag agt ca
615	aaaaa tctaga agg ggc cag tgg ata gac tga tgg
616	aaaaa tctaga agg gac caa ggg ata gac aga tgg
617	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg gaa tgg acc tgg gtc ttt ctc ttc ct
618	aaa ttt gct agc tga gga gac ggt gac cgt ggt ccc tgc
619	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg atg tcc tct gct cag ttc ctt ggt
620	aaa ttt cgt acg ttt cat ctc cag ttt ggt ccc ccc tcc
627	aaa ttt aag ctt gcc gcc acc atg ggt tgg agc tgt atc atc ttc ttt ct
628	aaa ttt gct agc tgc aga gac agt gac cag agt ccc ttg
682	gat agc agt acg ata aac tat aac cca tct cta aag gat aaa ttc
683	gaa ttt atc ctt tag aga tgg gtt ata gtt tat cgt act gct atc
684	tct gag gac tct gcc gtc tat tac tgt gca aga ggg tac tac ggt
685	acc gta gta ccc tct tgc aca gta ata gac ggc aga gtc ctc aga
688	gat agc agt acg ata aac tat gcg cca tct cta aag gat aaa ttc
689	gaa ttt atc ctt tag aga tgg cgc ata gtt tat cgt act gct atc
698	ttt aaa gaa ttc tca gca tgg ggg acc ata ttt gga ctc aac tct ctt
751	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg gtc tcc cag gcc ctc agg ctc ctc
752	ttt aaa gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc ggg aaa tgg ggc tcg cag gag gac tcc tgg
753	ttt aaa aag ctt gcc gcc acc atg cag cgc gtg aac atg atc atg gca g
754	ttt aaa gga tcc gga acc tcc ccc gcc tga tcc ccc gcc acc aga ccc gcc acc tcc agt gag ctt tgt ttt ttc ctt aat cca gtt gac ata
1055	aaa ttt gga tcc gat gtt gtg atg acc caa act cca ctc tcc

1056	aaa ttt gaa ttc cta aca ctc tcc cct gtt gaa gct ctt tgt
1095	Aaatgatttgccctcccatatgtccttc
1236	aaa ttt ggatcc cag gtc cag ctg cag cag tct gga gct

[0635] *表5:作为蛋白ID 0061 (SEQ40+41)、0023 (SEQ34+35)、0051 (SEQ36+37)、0062 (SEQ42+39)、0084 (SEQ171+SEQ167)、0074 (SEQ176+177)、0003 (SEQ175+174)、0004*

(SEQ178+179)、0135 (SEQ169+SEQ173)、0145 (SEQ32+173)和蛋白ID 5001 (SEQ180+39)的表达的基础的质粒组合的概述。

[0636]

蛋白ID	LC质粒	HC质粒	蛋白名称
0061	pTT-0012LC.C36A	pTT-0012HC.T60N	抗TLT-1 0061mab: (0012HC.T60N)$_2$:(0012LC.C36A)$_2$
0023	pTT-0023LC	pTT-0023HC	抗TLT-1 0023mab: (0023HC)$_2$:(0023LC)$_2$
0051	pTT-0051LC	pTT-0051HC	抗TLT-1 0051mab: (0051HC)$_2$:(0051LC)$_2$
0062	pTT-0052LC	pTT-0052HC.C91Y	抗TLT-1 0062mab: (0052HC.C91Y)$_2$:(0052LC)$_2$
0084	pTT-0012LC.C36A-HPC4	pTT-0012VH.T60N-YGPPC	抗TLT-1 0084Fab-YGPPC: (0012VH.T60N-CH1-YGPPC):(0012LC.C36A-HPC4)
0074	pTT-0051LC-HPC4	pTT-0051VH-CH1-YGPPC	抗TLT-1 0074Fab-YGPPC: (0051LC-HPC4):(0051VH-CH1-YGPPC)
0003	pTT-0052LC-HPC4	pTT-0052VH.C91Y-CH1-YGPPC	抗TLT-1 0003Fab-YGPPC (0052LC-HPC4):(0052VH.C91Y-CH1-YGPPC)
0004	pTT-0023LC-HPC4	pTT-0023VH-CH1-YGPPC	抗TLT-1 0004Fab-YGPPC (0023LC-HPC4):(0023VH-CH1-YGPPC)
0135	pTT-FIX-L4b-0012LC	pTT-0012VH-CH1-HPC4	FIX-抗TLT-1 Fab: (FIX-L4b-0012LC):(0012VH-CH1-HPC4)
0145	pTT-FIX-L4b-0012LC	pTT-0012HC	FIX-抗TLT-1 mAb: (FIX-L4b-0012LC)$_2$:(0012HC)$_2$
5001	pTT-0052LC	pTT-FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4	FVII-抗TLT-1 Fab: (0052LC):(FVII-L4b-0052V_H.C91Y-CH1-HPC4)

[0637] 实施例15:重组表达的抗TLT-1 Fab (Fab0084、Fab0074、Fab0003和Fab0004)的纯化和表征。

[0638] 使用基于树脂kappaSelect(GE Healthcare, 目录号17-5458-01)的亲和色谱进行抗TLT-1 Fab (0084、0074、0003和0004)的纯化。这4种Fab含有单个游离的半胱氨酸残基,各自包含在序列内。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare,目录号18-1112-41),进行所述纯化。用于纯化步骤的缓冲液系统是:由10 mM磷酸钠pH 7.5和150 mM NaCl组成的平衡/洗涤缓冲液,和由20 mM甲酸pH 3.0组成的洗脱缓冲液。澄清细胞上清液在加样到填装有kappaSelect树脂的预平衡柱之前无需进行调整。用5柱体积的平衡/洗涤缓冲液洗涤所述柱。在大约4柱体积的洗脱缓冲液中等度洗脱所述蛋白。使用0.5 M磷酸钠, pH 9.0,将洗出液调整到pH 7。使用SDS-PAGE/考马斯NuPage 4-12% Bis-Tris凝胶(Invitrogen,目录号NP0321BOX)和安置在Agilent 6210仪器和脱盐柱MassPREP (Waters, 目录号USRM10008656)上的液相色谱电喷雾电离飞行时间质谱方法,分析所洗脱的蛋白的分子量。观察到具有预期分子量的纯的且均质的蛋白。也进行安置在Agilent LC 1100/1200系统上的大小排阻高效液相色谱(SEC-HPLC)分析,并使用BIOSep-SEC-S3000 300x7.8mm柱(Phenomenex,目录号00H-2146-K0)和由200 mM磷酸钠pH 6.9、300 mM NaCl和10%异丙醇组成的运行缓冲液。在这里,蛋白洗脱为单个对称峰,保留时间为约9.1 min,流速为1 ml/min。为了测量最终的蛋白浓度,使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific),且消光系数为1.29。

[0639] 实施例16:重组表达的FIX-抗TLT-1 Fab融合蛋白(FIX-Fab0135)的纯化和表征。

[0640] 使用基于抗HPC4树脂(Roche, 目录号11815024001)的亲和色谱进行FIX-Fab0135的纯化。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare,目录号18-1112-41),进行所述纯化。

用于纯化步骤的缓冲液系统是:由20 mM Hepes, pH 7.5, 1.0 mM $CaCl_2$、100 mM NaCl和0.005% (v/v)吐温-80组成的平衡缓冲液,由20 mM Hepes, pH 7.5, 1.0 mM $CaCl_2$、1.0 M NaCl和0.005% (v/v)吐温-80组成的洗涤缓冲液,和由20 mM Hepes, pH 7.5, 5.0 mM EDTA和100 mM NaCl组成的洗脱缓冲液。用终浓度1 mM $CaCl_2$, pH 7.5调整细胞上清液,并加样到预平衡的抗HPC4柱。柱子用5柱体积的平衡缓冲液、5柱体积的洗涤缓冲液和最后5柱体积的平衡缓冲液洗涤。在大约4柱体积的洗脱缓冲液中等度洗脱所述蛋白。使用SDS-PAGE/考马斯和安置在Micro-flex系统(Bruker Daltonics)上的基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS),分析所述蛋白,显示出得到纯的和均质的蛋白,分子量106 kDa。因为FIX-Fab0135构建体的氨基酸序列的理论质量为95.9 kDa,所表达的蛋白含有翻译后修饰。为了测定最终的蛋白浓度,使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific),且消光系数为1.29。

[0641] 实施例17: pcDNA3.1(+)-hTLT-1 ECD-HPC4 ala突变型质粒。

[0642] 根据表6,设计了40个hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变型表达构建体。由外部承包商GENEART AG (Im Gewerbepark B35, 93059 Regensburg, 德国)开发出所述表达构建体,且基于命名为pcDNA3.1(+)的表达载体,制备所有40个表达构建体。将40个hTLT-1 ECD-HPC4 pcDNA3.1(+)表达构建体中的每一个的DNA的等分试样转染进HEK293-6E悬浮细胞中,以便瞬时表达每种hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变蛋白(表6)。如在实施例14中所述,进行HEK293-6E细胞的瞬时转染和培养。

[0643] *表6*

wt	野生型
1	L22A
2	V25A
3	Q27A
4	V30A
5	L35A
6	H39A
7	R41A
8	L42A
9	Q43A
10	K46A
11	Q48A
12	F54A

[0644]

[0645]

13	L55A
14	P56A
15	E57A
16	Q60A
17	D68A
18	R69A
19	R70A
20	R75A
21	L82A
22	L86A
23	E90A
24	M91A
25	T93A
26	Q95A
27	E96A
28	E97A
29	D107A
30	R110A
31	H116A
32	R117A
33	S119A
34	P125A
35	E126A
36	E128A
37	E130A
38	S136A
39	N140A
40	K159A

[0646] 实施例18:单克隆抗TLT-1抗体(mAb0012、mAb0023、mAb0051、mAb0061、mAb0062)的纯化和表征。

[0647] 通过由亲和色谱(使用蛋白A MabSelect SuRe树脂(GE Healthcare,目录号17-5438-01))和凝胶过滤色谱(使用26/60 Superdex 200 PrepGrade柱(GE Healthcare,目录号17-1071-01))组成的2步法,对表5中所述的重组表达的单克隆抗-TLT-1抗体进行纯化。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare,目录号18-1112-41),进行纯化。用于亲和纯化步骤的缓冲液系统是:由20 mM磷酸钠pH 7.2、150 mM NaCl组成的平衡缓冲液,由10 mM甲酸pH 3.5组成的洗脱缓冲液,和由0.5 M磷酸钠pH 9.0组成的pH-调节缓冲液。将细胞上清液不经任何调节地直接加样到预平衡的MabSelect SuRe柱。用15柱体积的平衡缓冲液洗涤所述柱,并用约2-5柱体积的洗脱缓冲液等度洗脱单克隆抗体。在洗脱后,立即使用所述

的pH-调节缓冲液，将合并的流分调节至中性pH。使用所述凝胶过滤柱，进一步纯化所述蛋白，并进行缓冲液更换。用于大小排阻色谱法的运行缓冲液是25 mM His pH 6.5、135 mM NaCl。使用的流速是2.5 ml/min，单克隆抗-TLT1抗体在约0.4柱体积时作为单个峰洗脱。基于使用先前所述的SEC-HPLC方法(如在实施例2中所述)对整个峰内的流分的分析，制备合并物，其含有在约8.5 min作为对称峰洗脱的纯抗体蛋白和极少含量的较早洗脱的高分子量蛋白。

[0648] 使用先前所述的SDS-PAGE/考马斯(如在实施例2中所述)和SEC-HPLC方法，表征纯化的抗体，表明生产的所有抗体蛋白制备物是高度均质的。当在运行SDS-PAGE/考马斯分析之前使用还原条件时，所有抗体表现出预期的约50 kDa的重链组分和约25 kDa的轻链组分。使用液相色谱法电喷雾电离飞行时间质谱法(安装在Agilent 6210仪器上)和脱盐柱MassPREP (Waters，目录号USRM10008656)，进行完整分子质量测定。使用的缓冲液系统是：由在LC-MS级-H_2O中的0.1%甲酸组成的平衡缓冲液，和由在LC-MS级-ACN中的0.1%甲酸组成的洗脱缓冲液。所有抗体表现出147.2 - 148.6 kDa的完整分子质量，这比每种抗体的氨基酸序列的理论质量高约2.7 - 3.1 kDa。因而，所有重组表达的抗-TLT-1抗体表现出与预期的HC N-糖基化相对应的翻译后修饰。6种抗体得到最终的95 - 99%纯度。为了验证克隆的和纯化的抗-TLT-1抗体的N-端序列，使用自动化的序列分析仪系统(Applied Biosystems 494蛋白测序仪)，进行EDMAN降解。对于每种抗体，进行10-20个降解循环。在这里，证实了6种克隆的抗-TLT-1抗体的预期轻链和重链序列。为了测量最终的蛋白浓度，使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific)，且6种抗体中的每一种的比消光系数是在1.34-1.51范围内。

[0649] 实施例19: mAb结合和不同mAB竞争结合TLT-1。

[0650] 材料：

[0651] *表7: 试剂*

[0652]

试剂	来源
TLT-1-His	实施例 1
mAb0061 mAb0023 mAb0051 mAb0062 Fab0074 Fab0084 Fab0003 Fab0004	实施例 18 实施例 18 实施例 18 实施例 18 实施例 15 实施例 15 实施例 15 实施例 15
所有其它试剂	Biacore 人抗体捕获试剂盒 (BR-1008-39) 抗 His mAb (R&D # MAB050)

[0653] 方法: 将目标mAb直接地固定化在CM5芯片上,或通过固定化在CM5芯片上的人Fc捕获mAb进行捕获,而TLT-1-His通过抗His mAb CM5芯片(用于分析Fab)进行捕获而固定化。使用的试剂如表7所示。

[0654] *mAb直接捕获:* 使用供应商推荐的标准程序,将TLT-1 mAb以约500-1000 RU的水平固定化在CM5芯片上(50 μg/ml,在乙酸钠中稀释,pH 4.0)。测试了TLT1的2倍稀释液(从200 nM至0.2 nM)对mAB的结合。运行和稀释缓冲液:10 mM HEPES,150 mM,0.005% p20,pH 7.4。通过10 mM甘氨酸pH 1.7,获得再生。

[0655] *通过人Fc mAb进行mAb捕获:以* 约10.000 RU固定化人Fc mAb。加入目标mAb (约100 nM)。测试了TLT1的2倍稀释液(从200 nM至0.2 nM)。运行和稀释缓冲液:10 mM HEPES,150 mM,0.005% p20,pH 7.4。在3 M $MgCl_2$中获得再生。

[0656] *通过抗His mAb* (R&D # MAB050)进行*TLT-1-His捕获:以* 约9.000 RU固定化抗His mAb。使用供应商推荐的标准程序,将TLT-1-His加到约30-40 RU的水平(10 μg/ml,稀释在10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%吐温-20中)。测试了Fab的从3至0.047 μg/ml的8倍稀释液对TLT-1-His的结合。运行和稀释缓冲液:10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005%吐温-20。通过3 M $MgCl_2$,获得再生。

[0657] 使用Biacore T100评价软件,假定TLT1和纤维蛋白原的1:1相互作用,测定动力学常数和结合常数(k_{on}、k_{off}、K_D)。

[0658] *竞争:*通过在Biacore T-100中的表面等离振子共振,进行竞争性结合相互作用分析,其分析了当TLT-1结合在固定化的mAb0012 (或备选mAb)上时,不同TLT-1 mAb与TLT-1的结合。在10 mM乙酸钠pH 4.5-5.0中,实现了以5000-10000 RU的水平,将mAb直接固定化在CM5芯片上。随后,结合50 nM TLT-1,并在解离2 min以后,结合3种要测试的其它mAb的竞争。运行和稀释缓冲液:10 mM HEPES,150 mM,0.005% p20,pH 7.4。通过10 mM甘氨酸pH

1.7,获得再生。

[0659] 结果:

[0660] *表8*

[0661]

TLT-1 结合	ka (1/M)	kd (1/s)	K_D (M) TLT-1	Biacore技术
mAb0061	9.32E+05	0.003499	3.75E-09	捕获
mAb0023	2.87E+05	0.00125	4.36E-09	直接
mAb0051	2.45E+05	0.00472	19.3E-09	直接
mAb0062	3.26E+05	0.00134	4.12E-09	直接
Fab0074	3.35E+06	0.00798	2.38E-09	捕获
Fab0084	5.31E+06	0.00524	0.99E-09	捕获
Fab0003	5.36E+05	0.00279	5.20E-09	捕获
Fab0004	1.15E+06	0.00195	1.70E-09	捕获

[0662] *表9: SPR分析。结合TLT-1的结合常数。与mAB0012的竞争*

[0663]

mAb ID	与mAb0012的竞争	与mAb0023的竞争	与mAb0051的竞争	与mAb0062的竞争
mAb0061	是	否	否	否
mAb0023		是	否	是
mAb0051			是	否
mAb0062				是

[0664] 结论: 通过Biacore分析,估测mAb0061、mAb0023、mAb0051和mAb0062以及Fab0074、Fab0084、Fab0003和Fab0004的结合常数(参见表8)。mAb 0061和mAB 0051不与任何其它mAb竞争结合(参见表9)。mAb 0023和mAb 0062确实相互竞争(参见表9)。

[0665] 实施例20: 20:80 PS:PC囊泡的制备,和TLT-1的克隆、表达、重新折叠和重新脂质化。

[0666] 如在Smith和Morrissey (2005) J. Thromb. Haemost., 2, 1155-1162中所述,但是使用TLT-1替代TF,使用Triton X-100作为去垢剂,制备在20:80 PS:PC囊泡中的重新脂质化的TLT-1。

[0667] 材料

[0668] LB培养基卡那霉素(50 mg/ml)。卡那霉素Sigma K-0254

[0669] 1000 mM IPTG (IPTG Sigma I-6758)

[0670] 裂解缓冲液:在50mM Tris-HCl、100mM NaCl、2mM EDTA、pH 8.0中的1x Bugbuster (Novagen)。加入0.5mg/ml溶菌酶+ DNAseI。加入1x完全抑制剂混合液(Complete Inhibitor Coctail, Roche)

[0671] IB-洗涤缓冲液1:在IB-缓冲液中的1:10 bugbuster。加入50μg/ml溶菌酶+ 0.5x完全抑制剂混合液(Roche)

[0672] IB-洗涤缓冲液2:在IB-缓冲液中的1:10 Bugbuster

[0673] IB-缓冲液:50mM Tris-HCl,100mM NaCl,2mM EDTA,pH 8.0

[0674] GndHCl缓冲液:6M盐酸胍,50mM Tris-HCl,50 mM NaCl,0.1%Triton X-100 red., pH 8.0

[0675] 重新折叠缓冲液:50mM Tris-HCl,800mM精氨酸,0.1%Triton X-100 red.,5mM还

原型谷胱甘肽,0.5mM氧化型谷胱甘肽pH 8.5

[0676] 透析缓冲液:20mM Tris-HCl,0.1%Triton X-100,pH 8.0

[0677] DTT:还原型谷胱甘肽(Sigma G4251),氧化型谷胱甘肽Sigma G4376

[0678] PC:在氯仿中的10mg/ml L-α-磷脂酰胆碱(鸡蛋)(Avanti Polar Lipids Inc.),目录号840051C。分子量760.09

[0679] PS:在氯仿中的10mg/ml L-α-磷脂酰丝氨酸钠盐(猪脑) (Avanti Polar Lipids Inc.),目录号840032C。分子量812.05

[0680] Triton X-100:10%Triton X-100,氢化的蛋白级去垢剂,经无菌过滤。Calbiochem. 目录号648464,浓度159 mM (分子量628)

[0681] HBS缓冲液:50mM HEPES,100mM NaCl,pH 7.4

[0682] Bio-Beads:Bio-Beads SM2吸附剂,20-50目BioRad Laboratories,目录号152-3920

[0683] 方法

[0684] 表达:使用引物1004 (SEQ ID NO: 150)和1005 (SEQ ID NO: 151),并使用pTT-hTLT-1作为模板,将包括胞外结构域、接头和跨膜结构域的TLT-1 (hTLT-1.18-188;SEQ ID NO: 149)克隆进pET24a中。采用用于DNA制备的标准技术。转化进BL21 (DE3)中。过夜培养:1 x 50 ml LB培养基在250 ml烧瓶(塑料)中,混合50 μl 50 mg/ml卡那霉素+ 来自BL21平板的1个菌落(转化)。在37℃、220 rpm将培养物温育过夜。起始物培养:2 x 500 ml LB培养基在2L烧瓶(塑料)中,加入了300 μl 50 mg/ml卡那霉素。向10 ml过夜培养物中加入在BL21 (DE3)中的TLT-1 lip/pET24a,并监测OD600。在37℃、220 rpm温育。

[0685] 诱导:2 x 500 ml在LB中的TLT-1 lip/pET24a ~ BL21 (DE3)。25℃,当OD_{600}达到0.6 - 0.8之间时,加入约0.2 mM IPTG(100 μl,1M)到细胞培养物中。将其在25℃、220 rpm温育3h。3h以后,收获培养物,并在4600 rpm离心30 min。抛弃上清液。在-20℃保存沉淀物。

[0686] 包涵体的裂解:以5ml裂解缓冲液/g沉淀物,重新悬浮大肠杆菌沉淀物。加入$MgSO_4$至5mM,以支持DNAseI活性。在室温在摇动平台上温育细胞悬浮液20 min。通过在4℃、20000g (8500 rpm)离心20 min,澄清裂解物。将沉淀物重新悬浮于100 ml IB-洗涤缓冲液中。通过轻轻涡旋,混合悬浮液,并在室温温育5 min。在4℃、20000g离心悬浮液20 min,以收集包涵体。将包涵体重新悬浮于100 ml IB-洗涤缓冲液2中。在4℃、20000g离心样品20 min,以收集包涵体。将沉淀物重新悬浮于100 ml水中,并在4℃、20000g离心20 min,以收集包涵体。

[0687] 重新折叠:将沉淀物重新溶解于x ml GdnHCl缓冲液(20 ml)中。TLT-1的终浓度(测量A280)是1-2 mg/ml。加入DTT (400 μl)至20 mM终浓度。通过在室温磁力搅拌约1-2.5小时(1.5 h),确保完全溶解。通过在20000g离心20 min,去除不溶物。在4℃,缓慢地(过夜)使用蠕动泵,将GdnHCl/蛋白溶液(20 ml)转移至>20x重新折叠缓冲液(400 ml)。快速搅拌所述重新折叠缓冲液,以确保快速稀释。在流速1x、速度2.5、4℃,运行泵,并在4℃放置过夜。通过在50 ml管中在20000g (8500 rpm)离心30 min,去除沉淀的蛋白。在Amico-过滤器(76mm直径, 10.000 MWCO)中,在4.5巴,将TLT1 lip从400 ml浓缩至120 ml。通过乙醇沉淀法,在SDS-Page上检查蛋白(因为样品中存在GdnHCl)。使用10.000 MWCO,在0.5 ml试管中浓缩2x 500 μl和2x 25 μl。混合50 μl样品+ 9体积的冰冷的99%EtOH (450 μl),并在-20

℃放置10 min。在全速13.000 rpm离心样品5 min。抛弃上清液。用450 µl冰冷的96%EtOH + 50 µl MQ洗涤沉淀物。再次离心。让其干燥(在SDS-PAGE以前,必须消除EtOH)。将100 µl重新悬浮于1x样品缓冲液中。

[0688] PS:PC制备和重新脂质化:完全按照在Smith SA & Morrissey JH (2004)"Rapid and efficient incorporation of tissue factor into liposomes". *J. Thromb. Haemost.* 2:1155-1162中所述的方案,重新脂质化TLT-1。

[0689] 实施例21:分析纤维蛋白原与TLT-1的结合以及TLT-1 mAb和纤维蛋白原之间的结合竞争。

[0690] 通过SPR分析,测试了TLT-1与纤维蛋白原的结合。此外,通过Biacore T100仪器中的SPR分析,测试了纤维蛋白原和4种mAb中的每一种的同时结合:mAb 0012、mAb 0023、mAb 0051和mAb 0062。

[0691] 使用的材料如表10所示。

[0692] *表10*

[0693]

试剂	来源
TLT-1	实施例 2
mAb0012 mAb0023 mAb0051 mAb0062	实施例 18 实施例 18 实施例 18 实施例 18
纤维蛋白原	HCI-0150R Haematologic technologies
所有其它试剂	Biacore GE Healthcare

[0694] 方法:

[0695] 使用供应商推荐的标准程序,以约1000 RU的水平,将人TLT-1固定化在CM5芯片(50 µg/ml,在乙酸钠中稀释,pH 4.0)上。测试了人纤维蛋白原的4倍稀释液(从200 nM至0.2 nM)与固定化的TLT1的结合。运行和稀释缓冲液:10 mM HEPES,150 mM,0.005% p20,pH 7.4。通过10 mM甘氨酸pH 1.7,获得再生。使用Biacore T100评价软件,假定TLT1和纤维蛋白原的1:1 相互作用,测定动力学常数和结合常数(k_{on}、k_{off}、K_D) (表11)。

[0696] 同时如下测试不同mAb与TLT-1和纤维蛋白原的结合的竞争:以大约10000-15000 RU,将每种mAb固定化在CM5芯片上,随后结合50 nM TLT-1,在解离2-3 min以后,测试不同浓度的mAb的竞争。通过10 mM甘氨酸pH 1.7,获得芯片的再生(表12)。

[0697] 结果:

[0698] *表11: TLT-1与纤维蛋白原的结合*

[0699]

	ka (1/M)	kd (1/s)	K_D (M)
TLT-1-纤维蛋白原结合	4171	3.92×10^{-4}	9.40E-08

。

[0700] *表12: 与纤维蛋白原的竞争。将目标mAb固定化在芯片上。加入TLT-1以后,加入纤*

维蛋白原(夹心)。

[0701]

mAb ID	与纤维蛋白原的竞争
mAb0012	否
mAb0023	是
mAb0051	否
mAb0062	是

[0702] 结论：

[0703] TLT-1 (HCI-0150R)结合纤维蛋白原。mAb 0023和mAb 0062竞争该结合位点。mAb 0012和mAb 0051不竞争。

[0704] 实施例22: 通过氢交换质谱(HX-MS)进行表位作图。

[0705] HX-MS技术已经被用于鉴别4种单克隆抗体mAb0023、mAb 0051、mAb0062和mAb0061所覆盖的TLT-1结合表位。

[0706] 对于作图实验，使用分别对应于SEQ ID NO 5、6和7的hTLT-1.20-125、hTLT-1.16-162和hTLT-1.126-162。在实验之前，将所有蛋白缓冲液更换进PBS pH 7.4中。

[0707] *方法*: HX-MS实验.

[0708] *仪器使用和数据记录*。由LeapShell软件(Leap Technologies Inc.)操纵的Leap机器人(H/D-x PAL; Leap Technologies Inc.)，使HX实验自动化，其执行氘交换反应的开始、反应时间控制、猝灭反应、向UPLC系统的注射和消化时间控制。Leap机器人配有2个温度控制堆，对于缓冲液储存和HX反应，其维持在20 ℃，对于蛋白和猝灭溶液的储存，其维持在2 ℃。Leap机器人另外含有冷却的Trio VS单元(Leap Technologies Inc.)，其容纳胃蛋白酶柱、前置柱和分析柱、以及LC管道阀和切换阀(在1 ℃)。所述切换阀已经从HPLC升级至Microbore UHPLC切换阀(Cheminert, VICI AG)。对于线内胃蛋白酶消化，使用200 μL/min的等度流速(0.1%甲酸:CH_3CN 95:5)，装载100 μL含有200 pmol TLT-1的猝灭的样品，并穿过Poroszyme®固定化的胃蛋白酶筒(2.1 ×30 mm (Applied Biosystems))。捕获得到的肽，并在VanGuard前置柱BEH C18 1.7 μm (2.1 ×5 mm (Waters Inc.))上脱盐。随后，切换阀门，将前置柱放置成与分析柱UPLC-BEH C18 1.7 μm (2.1 ×100 mm (Waters Inc.))在线内，并使用从AQUITY UPLC系统(Waters Inc.)以150 μL/min递送的15-40% B梯度分离肽9 min。流动相由以下组成:A: 0.1%甲酸，和B: 在CH_3CN中的0.1%甲酸。使用Q-Tof Premier MS (Waters Inc.)，以阳离子模式，获得ESI MS数据和单独的数据依赖性的MS/MS获取(CID)和高能(MS^E)实验。亮氨酸-脑啡呔用作锁质量($[M+H]^+$离子，在*m/z* 556.2771)，并以连续谱模式收集数据

[0709] *数据分析*。使用标准的CID MS/MS或MS^E方法(Waters Inc.)，在单独的实验中，鉴别胃酶解肽。使用BiopharmaLynx 1.2 (017版)，处理MS^E数据。使用MassLynx软件和内部的MASCOT数据库，分析CID数据-依赖性的MS/MS获取。

[0710] 对HX-MS原始数据文件进行连续的锁质量校正。使用HX-Express ((β版本); Weis等人, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 17, 1700 (2006))，进行数据分析(即，氘化肽的形心测定和交换曲线绘图)。

[0711] *mAb0023的表位作图:* 在mAb 0023存在或不存在的情况下，通过在对应的氘化缓冲液(*即* 在D_2O中制备的PBS，96%D_2O最终的，pH 7.4 (未校正值))中30倍稀释hTLT-1.20-

125,开始酰胺氢/氘交换(HX)。所有HX反应在20°C进行,并含有4 μM hTLT-1.20-125(2.4 μM mAb 0023存在或不存在的情况下),从而产生1.2倍摩尔过量的mAb结合位点。在从10秒至8小时的适当时间间隔,用等体积的冰冷的猝灭缓冲液(1.35M TCEP)猝灭HX反应的等分试样,产生2.6的最终pH(未校正值)。

[0712] *mAb 0051和0062的表位作图:* 使用hTLT-1.20-125,在单独的实验中进行mAb 0051和mAb 0062的表位作图,并与上述的mAb 0023作图类似地进行。

[0713] *mAb0061的表位作图:* 使用hTLT-1.16-162蛋白或hTLT-1.126-162肽,在2个单独的实验中,进行mAb 0061的表位作图。

[0714] 与上文对于mAb 0023所述类似地进行实验。但是,使用hTLT-1.126-162,将胃蛋白酶柱放置在室温进行实验。这导致增加的胃蛋白酶消化功效,具有极小的额外交换损失。

[0715] 结果

[0716] *mAb0023的表位作图*

[0717] 在mAb 0023存在和不存在的情况下,监测20种肽(覆盖100%的TLT-1一级序列)的HX时程10秒至8小时。

[0718] 在mAb 0023存在或不存在的情况下观察到的交换模式可分成2个不同的组:一组TLT-1肽表现出不受mAb 0023的结合影响的交换模式,另一组TLT-1肽表现出在mAb 0023结合以后被免于交换的保护。表现出在mAb 0023结合以后的保护的区域包括覆盖TLT-1残基36-51、79-91和105-120的肽。通过比较在每种肽内的交换保护的相对量,可将mAb 0023的表位缩窄至:残基36-47, VQCHYRLQDVKA (50%);残基82-87,LGGGLL (30%);残基108-115,GARGPQIL (20%),每个区段的相对交换保护标注在括号内。在图16中,显示了0023表位的肽图谱的概要。

[0719] *mAb0051的表位作图*

[0720] 在mAb 0051存在和不存在的情况下,监测22种肽(覆盖100%的TLT-1一级序列)的HX时程10秒至1000秒。

[0721] 在mAb 0051存在或不存在的情况下观察到的交换模式可分成2个不同的组:一组TLT-1肽表现出不受mAb 0051的结合影响的交换模式,另一组受影响。表现出在mAb 0051结合以后的保护的区域包括覆盖残基52-66、92-120的肽。通过比较在每种肽内的交换保护的相对量,可将mAb 0051的表位缩窄至:残基55-66,LPEGCQPLVSSA (75%)和残基110-120,RGPQILHRVSL (25%);以及在残基92-105段内的弱相互作用。在图7中,显示了0051表位的肽图谱的概要。

[0722] *mAb0062的表位作图*

[0723] 在mAb 0062存在和不存在的情况下,监测22种肽(覆盖100%的TLT-1一级序列)的HX时程10秒至1000秒。

[0724] 在mAb 0062存在或不存在的情况下观察到的交换模式可分成2个不同的组:一组TLT-1肽表现出不受mAb 0062的结合影响的交换模式,另一组TLT-1肽表现出保护。表现出在mAb 0062结合以后的保护的区域包括覆盖残基36-51和105-120的肽。通过比较在每种肽内的交换保护的相对量,可将mAb 0062的表位缩窄至:残基36-47,VQCHYRLQDVKA (60%)和残基110-120,RGPQILHRVSL (40%)。在图8中,显示了0062表位的肽图谱的概要。

[0725] *mAb0061的表位作图*

[0726] 使用hTLT-1.16-162蛋白或hTLT-1.126-162,在2个单独实验中,对mAb 0061的表位作图。

[0727] 对于hTLT-1.16-162,在mAb 0061存在和不存在的情况下,监测19种肽(覆盖85%的TLT-1一级序列)的HX时程10秒至8小时。由于在残基S148处的O-糖基化,没有记录下在残基141以外的信息。

[0728] 在mAb 0061存在或不存在的情况下观察到的交换模式可分成2个不同的组:一组TLT-1肽表现出不受mAb 0061的结合影响的交换模式,另一组TLT-1肽表现出在mAb 0061结合以后免于交换的保护。表现出在mAb 0061结合以后的保护的区域包括覆盖残基121-141的肽。但是,重要的是,注意到在该实验中没有给出关于残基142及其之外的信息。通过比较在每种肽内的交换保护的相对量,可将mAb 0061的表位缩窄至在残基130处开始。

[0729] 为了获得关于mAb 0061表位的充分信息,使用肽hTLT-1.126-162,重复作图实验。该肽以高亲和力结合mAb 0061,且它未被糖基化修饰。因而,应该能够得到关于整个区域的HX-MS信息。

[0730] 在mAb 0061存在和不存在的情况下,监测12种肽(覆盖整个126-162 TLT-1区域)的HX时程10秒至3000秒。

[0731] 在该126-162区域中的所有肽表现出在mAb 0061结合以后免于交换的保护。通过比较在每种肽内的交换保护的相对量,可将mAb 0061的表位缩窄至在残基130-145(ETHKIGSLAENAFSDP)内。在图9和图10中,显示了0061表位的肽图谱的概要。

[0732] 实施例23: hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变体的保护、表征和结合分析。

[0733] 根据表6,设计了hTLT-1 ECD-HPC4丙氨酸突变型构建体。由外部承包商GENEART AG (Im Gewerbepark B35, 93059 Regensburg, 德国)开发出所述表达构建体,且基于命名为pcDNA3.1(+)的表达载体,制备所有表达构建体。将40个hTLT-1 ECD-HPC4 pcDNA3.1(+)表达构建体中的每一个的DNA的等分试样转染进HEK293-6E悬浮细胞中,以便短暂表达每种hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变蛋白(表6)。如在实施例A中所述,进行HEK293 6e细胞的瞬时转染和培养。

[0734] 转染后7天,通过离心去除细胞,无菌过滤得到的含有hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变蛋白的上清液,然后分析。使用RP-HPLC和SDS-PAGE/考马斯分析组合,测定表达的hTLT-1 ECD-HPC4 Ala突变蛋白在澄清的细胞上清液中的浓度。它们在4 - 40 μg/mL范围内,包含可变程度的二聚体形成。如先前关于用于免疫实验的hTLT蛋白的生产所述,对于所有hTLT ECD-HPC4 Ala突变型构建体,观察到表达的蛋白的单体/二聚体形式。通过SDS-PAGE/考马斯,估测单体/二聚体hTLT1 ECD-HPC4蛋白的相对浓度,并计算每种突变型制备物的平均分子量。

[0735] 所有结合研究在25℃进行,在ProteOn分析仪(BioRad)上的样品隔室中在15 ℃保存样品,所述ProteOn分析仪通过表面等离振子共振实时测量分子相互作用。ProteOn报告的信号(RU,应答单位)与在单个传感器芯片表面斑点上的质量直接相关。

[0736] 使用0.4 M EDAC [1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐]和0.1 M硫代-NHS [N-羟基硫代琥珀酰亚胺]的1:1混合物,将抗-hFc多克隆抗体固定化在GLM传感器芯片的单个流动池上。在10 mM乙酸钠pH 5.0中稀释每种抗体至50 μg/ml的浓度,并以30 μl/min固定化在单个流动池上240s。将抗体固定化在流动池A1-A6 (水平方向)上。在固定化以

后，用1 M乙醇胺封闭流动池上的活性部位。在一个实验中，捕获抗体的最终固定化水平通常在大约9,000至10,000 RU范围内。如下捕获抗-TLT1抗体mAb0023、mAb0051、mAb0061和mAb0062：在HBS-EP缓冲液(10 mM HEPES、150 mM NaCl、3mM EDTA、0.05%表面活性剂P20、pH 7.4)中稀释至0.5 μg/ml，在垂直方向以30 μl/min注射60s，建立仅含有抗-人Fc抗体的斑点间参照点。在一个实验中，测试抗体的最终捕获水平通常在大约200至300 RU范围内。如下进行野生型或Ala突变型hTLT-1 ECD-HPC4蛋白的结合：在水平方向注射经过平行的流动池，以允许比较分析与不同的捕获的抗-TLT1抗体的结合(相对于与斑点间参照的结合)。基于计算的平均分子量，在HBS-EP缓冲液中将每种hTLT-1 ECD-HPC4蛋白稀释至100 nM，并以30 μl/min注射240s。在分析物的每个注射周期以后，如下再生GLM芯片：以100 μl/min，注射1 M甲酸18s，随后注射50 mM NaOH 18s。该再生步骤从固定化的捕获抗体表面去除抗-TLT-1抗体和任何结合的TLT-1，并允许下一个测试样品对的随后结合。再生程序不会从芯片表面去除直接固定化的抗-人-Fc捕获抗体。

[0737] 使用ProteOn ManagerTM软件，进行数据分析。没有观察到与斑点间对照表面的显著非特异性结合。通过双参照(减去斑点间对照表面信号以及经过捕获的抗-TLT-1抗体的空白缓冲液注射)，处理结合曲线。这允许校正样品注射过程中的仪器噪音、体积迁移(bulk shift)和漂移。将在停止分析物注射以后10s的结合信号标准化为捕获的抗-TLT-1抗体的水平，并呈现为相对于野生型hTLT-1 ECD-HPC4蛋白的结合。

[0738] 下述的Ala突变显示出与相应抗-TLT-1的结合的显著降低(与野生型hTLT-1 ECD-HPC4蛋白相比)。mAb 0051: F54A < 0.4野生型；M91A < 0.2野生型；R117A < 0.2野生型；S119A < 0.6野生型；mAb 0062: R41A < 0.2野生型；L42A < 0.6野生型；Q43A < 0.4野生型；F54A < 0.6野生型；M91A < 0.4野生型；R110A < 0.2野生型；H116A < 0.6野生型；mAb 0023: L42A < 0.2野生型；Q43A < 0.2野生型；K46A < 0.2野生型；M91A < 0.4野生型；R110A < 0.2野生型。由于可观察到hTLT1 ECD-HPC4突变型M91A对所有4种抗-TLT-1抗体的降低的结合，残基可能对蛋白稳定性具有重要影响，而不是实际表位的一部分。mAb 0061没有表现出与测试的任意突变型TLT-1变体的降低的结合，这表明，所述表位未被在结合研究中引入的突变体覆盖。

[0739] 实施例24:抗TLT-1 Fab和TLT-1茎肽之间的复合物的晶体结构。

[0740] 用于结晶的抗-TLT-1 Fab，Fab0100 (与Fab0061相同)的表达：根据通用程序，在HEK293细胞中瞬时表达抗-TLT-1 Fab片段Fab0100，其包含与SEQ ID NO 152相对应的重链和与SEQ ID NO 153相对应的轻链。

[0741] 用于结晶的抗-TLT-1 Fab，Fab0100的纯化：通过由亲和色谱(使用kappaSelect树脂(GE Healthcare，目录号17-5458-01))和大小排阻色谱组成的2步法，纯化所述Fab。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare，目录号18-1112-41)，进行所述纯化。用于纯化步骤的缓冲液系统是：由10 mM磷酸钠pH 7.5和150 mM NaCl组成的平衡缓冲液，和由20 mM甲酸pH 3.0组成的洗脱缓冲液。用1 M NaOH将所述上清液调节至pH7.5，并加样到预平衡的kappaSelect柱。用5柱体积的平衡缓冲液洗涤所述柱，并使用大约5柱体积的洗脱缓冲液，等度洗脱Fab蛋白。使用SDS-PAGE/考马斯和LC-MS分析，分析所述Fab蛋白，表明得到纯的且均质的蛋白，预期分子量为46.9 kDa。为了测量蛋白浓度，使用NanoDrop分光光度计(Thermo Scientific)，且消光系数为1.31。使用大小排阻柱(Superdex200)，对Fab蛋白进

行最终的精细纯化(polish)。

[0742] 用于结晶的肽的制备:通过固相肽合成,制备TLT-1-茎肽hTLT-1.126-162 (SEQ ID NO 7)。同样地,制备了与SEQ ID NO 8相对应的茎肽的更短形式hTLT-1.129-142。

[0743] Fab0100:TLT-1复合物的制备、结晶和结构测定:Fab0100:hTLT-1.126-162的制备:如下制备Fab0100和hTLT-1.126-162之间的复合物:将2倍摩尔过量的hTLT-1.126-162加入Fab0100的溶液中,随后通过使用制备型大小排阻色谱分离过量的hTLT-1.126-162,从而分离复合物。因而,通过混合Fab (1100 μl, 98 μM)和hTLT-1.126-162 (155 μl, 1391 μM)(二者都在PBS缓冲液(pH 7.4)中),制备Fab0100: hTLT-1.126-162复合物。使用Superdex 200 HighLoad 26/60 (GE Healthcare)柱,对复合物进行凝胶过滤,用PBS-缓冲液(pH 7.4)洗脱,流速为1 ml/min。收集与3 ml体积相对应的流分。合并含有所需的Fab0100: hTLT-1.126-162复合物的流分,然后使用离心过滤器装置(Amicon, 10 kDa截止)浓缩至8.6 mg/ml的蛋白浓度。将该制备物用于Fab0100:hTLT-1.126-162复合物的结晶。

[0744] Fab0100:hTLT-1.129-142的制备:类似地制备Fab0100和更短的茎肽(hTLT-1.129-142)之间的复合物,不同之处在于,hTLT-1.129-142和Fab之间的摩尔比为1.5:1,并省略凝胶过滤停留(gel filtration stop),这是由于与更长的茎肽(hTLT-1.126-162)相比,hTLT-1.129-142的结合更弱。

[0745] Fab0100:hTLT-1.129-142复合物和Fab0100:hTLT-1.126-162复合物的结晶和数据收集:通过坐滴(sitting drop)方法,在室温结晶Fab0100:hTLT-1.129-142复合物和Fab0100:hTLT-1.126-162复合物。通过以1:2 体积比(沉淀剂:蛋白)向蛋白溶液中加入含有0.04 M磷酸二氢钾、16%w/v PEG 8,000和20%甘油的沉淀溶液,结晶Fab0100:hTLT-1.129-142;同时通过以1:1 体积比(沉淀剂:蛋白)向蛋白溶液中加入含有20%w/v PEG 10,000和0.10 M Hepes(pH 7.5)的沉淀溶液,结晶Fab0100:hTLT-1.126-162复合物。在液氮中快速冷冻Fab0100:hTLT-1.129-142复合物的晶体,并在数据收集期间,通过低温N_2气流保持在100 K。随后使用Rigaku MicroMax-007 HF旋转阳极和marCCD 165 X-射线检测器,收集结晶学数据至2.14 Å分辨率。通过XDS软件包(Kabsch,W. (1993) *J. Appl. Crystallogr.* 26, 795-800),进行空间群测定、数据的积分和标定。晶体的晶胞参数分别被测定为82.10、64.99、107.73 Å、90°、95.12°和90°(对于a、b、c、α、β和γ),空间群被测定为C2。数据集的强度的R_{sym}被计算为6.5%。使用来自PDB-沉积的(Berman,H.M.等人 (2000) *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242) 1NGZ结构(Yin,J.等人*PNAS us* 100, 856-861)的Fab模型的坐标,用于抗-TLT-1 Fab分子的结构测定。所述1NGZ Fab模型被分成2个结构域:可变结构域和恒定结构域,然后在CCP4套件(Bailey,S. (1994) *Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 50, 760-763)的phaser软件程序(Mccoy,A.J.等人*Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 61, 458-464; Mccoy, A.J.等人*J. Appl. Crystallogr.* 40, 658-674)的分子置换运行中将它们用作独立检索模型。ARP-wARP软件包(Evrard,G.X.等人*Acta Crystallographica Section D* 63, 108-117)随后用于自动化建模和定相(phasing)。使用REFMAC5软件程序(Murshudov,G.N.等人*Acta Crystallogr. Sect. D-Biol. Crystallogr.* 53, 240-255)进行额外的晶体学精修,随后使用COOT软件程序(Emsley,P.等人*Acta Crystallogr. Sect. D-Biol.*

Crystallogr. 60, 2126-2132)，进行电子密度图谱的计算机图形学检查、模型校正和建模。循环所述操作，直到对模型不再做出其它重要改进。在3个人工干预周期和随后的精修以后，最终计算的R-和R-free分别是0.185和0.245，所述模型表现出的离理想键长度的均方根偏差(RMSD)为0.022 Å。

[0746] 将Fab0100:hTLT-1.126-162复合物的晶体转移至含有75%沉淀剂溶液和25%甘油的低温溶液。允许所述晶体浸泡约15秒，然后在液氮中快速冷冻，并在数据收集期间，通过低温N_2气流保持在100 K。随后在束线BL911-3 (MAX-lab, Lund, 瑞典)上，收集结晶学数据至1.85 Å分辨率(Ursby,T.等人(2004) AIP Conference Proceedings 705, 1241-1246)。在XDS软件包中，进行空间群测定、数据的积分和标定。同步加速器数据的晶胞参数分别被测定为82.54、65.32、108.05 Å、90°、95.15°和90°(对于a、b、c、α、β和γ)，空间群被测定为C2。数据集的强度的R_{sym}被计算为6.7%。所述晶体与Fab0100:hTLT-1.129-142晶体同形，因此Fab0100:hTLT-1.129-142复合物的刚体精修被用于Fab0100:hTLT-1.126-162的起始相，随后使用ARP-wARP软件包进行自动化的建模和定相。使用REFMAC5软件程序进行额外的晶体学精修，随后使用COOT软件程序，进行电子密度图谱的计算机图形学检查、模型校正和建模。循环所述操作，直到对模型不再做出其它重要改进。在13个人工干预周期和随后的精修以后，最终计算的R-和R-free分别是0.171和0.223，所述模型表现出的离理想键长度的RMSD为0.027 Å(表11)。

[0747] *结果*

[0748] 如表14和15所示，抗TLT-1有效地结合TLT-1的茎。使用CCP4程序套件的软件程序AREAIMOL，计算出在Fab0100和TLT-1之间的成对相互作用中排除的平均面积是764 $Å^2$。对于Fab0100:hTLT-1.126-162复合物，对于抗-TLT-1和TLT-1的成对相互作用中排除的平均面积分别是656和871 $Å^2$。

[0749] 在TLT-1肽(hTLT-1.126-162)中与Fab0100: hTLT-1.126-162复合物中的抗-TLT-1 Fab直接接触的残基被定义为表位，且在Fab0100中与Fab0100: hTLT-1.126-162复合物中的hTLT-1.126-162直接接触的残基被定义为互补位。通过运行CCP4程序套件的contacts软件，使用抗-TLT-1 Fab和TLT-1分子之间的4.0 Å截止距离，鉴别出表位和互补位残基。在表14和15中，显示了Fab0100:hTLT-1.126-162复合物晶体结构的接触计算结果。发现Fab0100的得到的TLT-1表位包含SEQ ID NO 7的下述残基:Lys 8 (133)、Ile 9 (134)、Gly 10 (135)、Ser 11 (136)、Leu 12 (137)、Ala 13 (138)、Asn 15 (140)、Ala 16 (141)、Phe 17 (142)、Ser 18 (143)、Asp 19 (144)、Pro 20 (145)、Ala 21 (146)，其中在括号中的数字是指在SEQ ID NO 2 中的对应残基(表12和13)。

[0750] 得到的互补位包括:与SEQ ID NO 153 (表12)相对应的Fab0100 轻链的残基His 31、Asn 33、Tyr 37、His 39、Tyr 54、Phe 60、Ser 96、Thr 97、Val 99和Tyr 101，和与SEQ ID NO 152 (表13)相对应的Fab0100重链的残基Val 2、Phe 27、Arg 31、Tyr 32、Trp 33、Glu 50、Thr 57、Asn 59、Ser 98、Gly 99、Val 100和Thr 102。在表12和13中也指出了参与氢结合的TLT-1表位残基。

[0751] *表13: 通过软件程序refmac5对观察到的Fab0100:hTLT-1.126-162复合物数据进行X-射线模型精修的结果。*

[0752] 注释3 精修.

[0753] 注释3 程序:REFMAC 5.5.0109

[0754] 注释3 作者: MURSHUDOV,VAGIN,DODSON

[0755] 注释3

[0756] 注释3 精修目标: 最大可能性

[0757] 注释3

[0758] 注释3 在精修中使用的数据.

[0759] 注释3分辨率范围高(埃):1.85

[0760] 注释3分辨率范围低(埃):34.18

[0761] 注释3 数据截止(SIGMA(F)) : 无

[0762] 注释3 范围的完全性(%) : 99.89

[0763] 注释3 反射数目: 46512

[0764] 注释3

[0765] 注释3 拟合至精修中使用的数据.

[0766] 注释3 交叉确认方法:到处

[0767] 注释3 自由R值检验设定选择:随机

[0768] 注释3 R值(工作集+试验集): 0.17330

[0769] 注释3 R值(工作集):0.17070

[0770] 注释3 自由R值:0.22260

[0771] 注释3 自由R值试验集大小(%):5.0

[0772] 注释3 自由R值试验集计数:2463

[0773] 注释3

[0774] 注释3 在最高分辨率BIN中拟合.

[0775] 注释3 使用的BIN的总数:20

[0776] 注释3 BIN分辨率范围高:1.850

[0777] 注释3 BIN分辨率范围低:1.898

[0778] 注释3 在BIN中的反射(工作集):3409

[0779] 注释3 BIN完全性(工作集+试验集) (%):99.81

[0780] 注释3 BIN R值(工作集):0.266

[0781] 注释3 BIN自由R值设定计数:195

[0782] 注释3 BIN自由R值:0.309

[0783] 注释3

[0784] 注释3 在精修中使用的非氢原子的数目.

[0785] 注释3 所有原子:3993

[0786] 注释3

[0787] 注释3 B值.

[0788] 注释3 来自WILSON图(A**2): 空

[0789] 注释3 平均B值(总体, A**2):14.967

[0790] 注释3 总体非均质B值.

[0791] 注释3 B11 (A**2):-0.06

[0792] 注释3 B22 (A**2):0.23

[0793] 注释3 B33 (A**2):-0.24

[0794] 注释3 B12 (A**2):0.00

[0795] 注释3 B13 (A**2):-0.36

[0796] 注释3 B23 (A**2):0.00

[0797] 注释3

[0798] 注释3 估测的总体坐标误差.

[0799] 注释3 基于R值的ESU(A):0.116

[0800] 注释3 基于自由R值的ESU (A):0.123

[0801] 注释3 基于最大可能性的ESU(A):0.084

[0802] 注释3 基于最大可能性的B值的ESU (A**2):6.165

[0803] 注释3

[0804] 注释3 相关系数.

[0805] 注释3 相关系数FO-FC:0.963

[0806] 注释3 相关系数FO-FC FREE:0.939

[0807] 注释3

[0808] 注释3 离理想值计数RMS加权的RMS偏差

[0809] 注释3 键长度精修的原子(A):3538; 0.027; 0.022

[0810] 注释3 键角精修的原子(度):4833; 2.132; 1.958

[0811] 注释3 扭转角,时期1 (度):473; 6.972; 5.000

[0812] 注释3 扭转角,时期2 (度):137;35.607;24.453

[0813] 注释3 扭转角,时期3 (度):583;14.216;15.000

[0814] 注释3 扭转角,时期4 (度):14;23.096;15.000

[0815] 注释3 手性中心约束(A**3):552; 0.180; 0.200

[0816] 注释3 一般平面精修的原子(A):2664; 0.013; 0.021

[0817] 注释3

[0818] 注释3 均质的热因子约束. 计数RMS加权

[0819] 注释3 主链键精修的原子(A**2):2262; 1.399; 1.500

[0820] 注释3 主链角精修的原子(A**2):3679; 2.333; 2.000

[0821] 注释3 侧链键精修的原子(A**2):1276; 3.462; 3.000

[0822] 注释3 侧链角精修的原子(A**2):1139; 5.231; 4.500

[0823] 注释3

[0824] 注释3 NCS约束统计学

[0825] 注释3 NCS组的数目: 空

[0826] 注释3

[0827] 注释3 双晶细节

[0828] 注释3 双晶结构域的数目:空

[0829] 注释3

[0830] 注释3

[0831] 注释3 TLS细节

[0832] 注释3 TLS组的数目:2

[0833] 注释3 原子记录仅含有残余的B因子

[0834] 注释3

[0835] 注释3 TLS组:1

[0836] 注释3 组分组的数目:3

[0837] 注释3 组分C SSSEQI至C SSSEQI

[0838] 注释3 残基范围:L 1 L 109

[0839] 注释3 残基范围:H 1 H 113

[0840] 注释3 残基范围:P 7 P 21

[0841] 注释3 组的起点(A):-4.1790 48.4400 34.3450

[0842] 注释3 T张量

[0843] 注释3 T11:0.1731 T22:0.1937

[0844] 注释3 T33:0.1093 T12:-0.0155

[0845] 注释3 T13:-0.0164 T23:-0.0192

[0846] 注释3 L张量

[0847] 注释3 L11:1.9367 L22:0.4840

[0848] 注释3 L33:3.8383 L12:-0.1522

[0849] 注释3 L13:-1.2215 L23:-0.1172

[0850] 注释3 S张量

[0851] 注释3 S11:0.0447 S12:-0.2657 S13:0.0758

[0852] 注释3 S21:0.0958 S22:-0.0414 S23:-0.0674

[0853] 注释3 S31:0.0036 S32:0.0098 S33:-0.0032

[0854] 注释3

[0855] 注释3 TLS组:2

[0856] 注释3 组分组的数目:2

[0857] 注释3 组分C SSSEQI至C SSSEQI

[0858] 注释3 残基范围:L 114 L 219

[0859] 注释3 残基范围:H 116 H 215

[0860] 注释3 组的起点(A): -24.4360 51.7710 5.9920

[0861] 注释3 T张量

[0862] 注释3 T11:0.0252 T22:0.0170

[0863] 注释3 T33:0.0735 T12:0.0161

[0864] 注释3 T13:0.0018 T23:0.0048

[0865] 注释3 L张量

[0866] 注释3 L11:2.0324 L22:1.6905

[0867] 注释3 L33:0.8461 L12:0.7328

[0868] 注释3 L13:0.0695 L23:0.3337

[0869] 注释3 S张量

[0870] 注释3 S11:-0.0068 S12:0.0156 S13:0.0515

[0871] 注释3 S21:-0.0127 S22:-0.0101 S23:0.1316

[0872] 注释3 S31:-0.0077 S32:-0.0763 S33:0.0168

[0873] 注释3

[0874] 注释3

[0875] 注释3 大量溶剂(BULK SOLVENT)建模.

[0876] 注释3 使用的方法:MASK

[0877] 注释3 用于MASK计算的参数

[0878] 注释3 VDW探测半径:1.40

[0879] 注释3 离子探测半径:0.80

[0880] 注释3 皱缩半径:0.80

[0881] 注释3

[0882] 注释3 其它精修注释:

[0883] 注释3 氢已经添加在骑位(RIDING POSITIONS)

[0884] 注释3 U值:仅残余

[0885] 注释3

[0886]

```
LINKR      SG  CYS L 139          SG ACYS L 199          SS
LINKR      SG  CYS H  22          SG ACYS H  96          SS
LINKR      SG ACYS H 141          SG ACYS H 197          SS
CISPEP   1 THR L   7   PRO L   8          0.00
CISPEP   2 VAL L  99   PRO L 100          0.00
CISPEP   3 TYR L 145   PRO L 146          0.00
CISPEP   4 PHE H 147   PRO H 148          0.00
CISPEP   5 GLU H 149   PRO H 150          0.00
```

[0887] *表14*

[0888] hTLT-1.126-162 “P”(SEQ ID NO 7)与Fab0100轻链(SEQ ID NO 163)相互作用。使用4.0 Å的截止值。通过CCP4套件的CONTACT计算机程序,鉴别接触。在最后一列中,“***”指示,通过CONTACT计算的在该接触处(距离< 3.3 Å)的氢键的高可能性,“*”指示低可能性(距离> 3.3 Å)。空白指示,该程序认为没有氢键的可能性。供体和受体之间的氢键是特异性的,通常是强的,且可容易地鉴别。

[0889]

hTLT-1.126-162			抗 -TLT-1			距离 [Å]	氢键可能性
残基类型	残基编号和链	原子名称	残基类型	残基编号和链	原子名称		
Ile	9P	CB	Tyr	101L	OH	3.76	
Ile	9P	CD1	Ser	96L	O	3.58	
			Thr	97L	O	3.68	
Ile	9P	CG2	Val	99L	CG2	3.51	
Ile	9P	C	Tyr	101L	OH	3.95	
Gly	10P	N	Tyr	101L	OH	3.06	***
Gly	10P	CA	Tyr	101L	OH	3.48	
Gly	10P	C	Tyr	101L	OH	3.67	
Ser	11P	N	Tyr	101L	OH	3.09	***
Ser	11P	CB	Ser	96L	OG	3.89	
			Tyr	37L	CD1	3.94	
			Ser	96L	O	3.37	
Ser	11P	OG	Ser	96L	OG	2.88	***
			Ser	96L	CA	3.76	
			Ser	96L	CB	3.05	
			Ser	96L	C	3.33	
			Ser	96L	O	2.45	***
			Tyr	101L	CE1	3.94	
			Tyr	101L	CZ	3.59	
			Tyr	101L	OH	3.37	*
Ser	11P	O	Tyr	37L	CE1	3.39	
			Tyr	37L	CZ	3.66	
			Tyr	37L	OH	3.55	*
Leu	12P	CG	Asn	33L	ND2	3.41	
			Tyr	37L	OH	3.86	
Leu	12P	CD1	His	31L	CE1	3.73	
			His	31L	NE2	3.38	
			His	31L	CD2	3.63	

[0890]

hTLT-1.126-162			抗 -TLT-1			距离 [Å]	氢键可能性
残基类型	残基编号和链	原子名称	残基类型	残基编号和链	原子名称		
			Tyr	37L	CE2	3.65	
			Asn	33L	ND2	3.68	
			Tyr	37L	CZ	3.84	
			Tyr	37L	OH	3.51	
Leu	12P	CD2	His	31L	CE1	3.57	
			His	31L	NE2	3.91	
			Asn	33L	ND2	3.39	
Phe	17P	CB	Tyr	54L	CG	3.79	
			Tyr	54L	CE1	3.70	
			Tyr	54L	CD1	3.45	
Phe	17P	CG	Tyr	54L	CG	3.98	
			Tyr	54L	CD1	3.63	
Phe	17P	CD1	Tyr	54L	CB	3.74	
Phe	17P	CE1	His	39L	ND1	3.88	
			His	39L	CE1	3.32	
			His	39L	NE2	3.60	
Phe	17P	CZ	His	39L	CE1	3.36	
			His	39L	NE2	3.66	
			Tyr	37L	CD1	3.98	
Phe	17P	CE2	Tyr	37L	CD1	3.79	
			Tyr	37L	CE1	3.84	
Phe	17P	O	Phe	60L	CD1	3.84	
			Phe	60L	CE1	3.31	
Asp	19P	N	Phe	60L	CE1	3.88	
Asp	19P	CA	Phe	60L	CZ	3.80	
Asp	19P	CB	Phe	60L	CZ	3.85	

[0891] *表15*

[0892] hTLT-1.126-162 “P”(SEQ ID NO 7)与Fab0100重链(SEQ ID NO 162)相互作用。使用4.0 Å的截止值。通过CCP4套件的CONTACT计算机程序,鉴别接触。在最后一列中,“***”指示,通过CONTACT计算的在该接触处(距离< 3.3 Å)的氢键的高可能性,“*”指示低可能性(距离> 3.3 Å)。空白指示,该程序认为没有氢键的可能性。供体和受体之间的氢键是特异性的,通常是强的,且可容易地鉴别。

[0893]

hTLT-1.126-162			抗 -TLT-1			距离 [Å]	氢键可能性
残基类型	残基编号和链	原子名称	残基类型	残基编号和链	原子名称		
Lys	8P	C	Asn	59H	OD1	3.95	
Lys	8P	O	Asn	59H	CG	3.69	
			Asn	59H	ND2	3.78	*
			Trp	33H	CH2	3.86	
			Asn	59H	OD1	2.85	***
			Thr	57H	CG2	3.45	
Ile	9P	CA	Trp	33H	CH2	3.91	
			Glu	50H	OE2	3.52	
			Asn	59H	OD1	3.79	
Ile	9P	CB	Glu	50H	OE2	3.81	
Ile	9P	C	Trp	33H	CZ3	4.00	
			Trp	33H	CH2	3.65	
			Glu	50H	OE2	3.62	
			Trp	33H	CZ2	3.87	
Ile	9P	O	Trp	33H	CZ2	3.92	
Gly	10P	N	Glu	50H	CD	3.40	
			Glu	50H	OE1	3.38	*
			Trp	33H	CZ3	3.55	
			Trp	33H	CH2	3.68	
			Glu	50H	OE2	2.77	***
			Trp	33H	CE3	3.85	
			Trp	33H	CZ2	3.99	
Gly	10P	CA	Glu	50H	CD	3.79	
			Glu	50H	OE1	3.40	
			Trp	33H	CZ3	3.80	
			Glu	50H	OE2	3.61	
			Trp	33H	CE2	3.75	
			Trp	33H	CD2	3.55	
			Trp	33H	CE3	3.58	

[0894]

hTLT-1.126-162			抗 -TLT-1			距离 [Å]	氢键可能性
残基类型	残基编号和链	原子名称	残基类型	残基编号和链	原子名称		
			Trp	33H	CZ2	3.99	
Gly	10P	C	Val	100H	CG2	3.82	
Gly	10P	O	Val	100H	CG2	3.86	
Ser	11P	N	Val	100H	CG2	3.78	
Ser	11P	CA	Val	100H	CG2	3.78	
Ala	13P	CB	Trp	33H	CD1	3.60	
			Trp	33H	NE1	3.52	
Asn	15P	CG	Tyr	32H	CD1	3.88	
			Tyr	32H	CE1	3.83	
Asn	15P	ND2	Arg	31H	C	3.94	
			Arg	31H	O	3.09	***
			Tyr	32H	CG	3.98	
			Tyr	32H	CD1	3.76	
			Tyr	32H	CE1	3.70	
			Tyr	32H	CZ	3.88	
			Arg	31H	NH1	3.93	*
Ala	16P	O	Val	100H	CB	3.86	
			Val	100H	CA	3.80	
			Val	100H	N	2.91	***
			Thr	102H	CG2	3.46	
			Gly	99H	CA	3.74	
			Gly	99H	C	3.78	
Phe	17P	CA	Thr	102H	CG2	3.64	
Phe	17P	CD1	Val	100H	O	3.93	
Phe	17P	CE1	Val	100H	CB	3.46	
			Val	100H	CG1	3.52	
			Val	100H	O	3.86	
Phe	17P	CZ	Val	100H	CB	3.81	
			Val	100H	CG1	3.89	
Phe	17P	C	Thr	102H	CG2	3.59	
Phe	17P	O	Thr	102H	CG2	3.79	
Ser	18P	C	Thr	102H	CG2	3.94	

hTLT-1.126-162			抗 -TLT-1			距离 [Å]	氢键可能性
残基类型	残基编号和链	原子名称	残基类型	残基编号和链	原子名称		
Ser	18P	O	Thr	102H	CB	3.48	
			Thr	102H	OG1	3.64	*
			Thr	102H	CG2	3.26	
Pro	20P	CA	Tyr	32H	OH	3.47	
			Tyr	32H	CZ	3.90	
Pro	20P	CB	Val	2H	CG2	3.92	
			Phe	27H	CB	3.93	
			Phe	27H	CD1	3.86	
			Phe	27H	CG	3.78	
Pro	20P	CG	Thr	102H	OG1	3.88	
			Ser	98H	OG	3.54	
Pro	20P	CD	Thr	102H	CB	3.95	
			Thr	102H	OG1	3.83	
Pro	20P	C	Val	2H	CG2	3.98	
Pro	20P	O	Phe	27H	CB	3.52	
Ala	21P	N	Val	2H	CG2	3.51	
Ala	21P	CA	Val	2H	CG2	3.97	
Ala	21P	CB	Val	2H	CG2	3.77	

[0895] 实施例25：通过肽行走(peptide walk)进行表位作图。

[0896] 肽行走ELISA定义了肽的最小结合区。这如下建立：在链霉抗生物素板中，用TLT-1茎区中的1个残基移码包被生物素化的肽，随后结合目标抗体(mAb 0061)。加入用于检测的第二抗体，并在450 nm处测量结合。阳性对照：结合到生物素化的TLT-1。

[0897] 材料

[0898] 10X PBS：10X GPBS 14200 Gibco

[0899] 吐温20：Aldrich目录号27,434-8，批号S30950-315

[0900] 板：96-孔链霉抗生物素包被的板Nunc#466014

[0901] BSA：A7030-100g批号057K0737

[0902] 封闭/稀释缓冲液：1X PBS pH=7.4

[0903] 2% BSA

[0904] 0.5%吐温20

[0905] 洗涤缓冲液：1xPBS + 0.5%吐温20

[0906] 标准：生物素化的TLT-1 04/09-08 1 mg/ml

[0907] mAb：0197-0000-0061-4A - 0.55 mg/ml

[0908] 检测Ab：山羊抗人IgG HRP-标记的1mg/ml产品号NEF802001EA

[0909] TMB底物：即用型，目录号4390L，批号70904

[0910] 终止液：2M H_3PO_4

[0911] 生物素化的TLT-1的稀释

[0912] 1mg/ml -> 6.3ng/ml (158500x稀释)

[0913] 孔中的浓度: 0.63 ng

[0914] 生物素化肽的稀释

[0915] 大致浓度2-5 mg/ml (2.5 mg/ml)

[0916] 2.5mg/ml -> 10000x稀释(25ng/孔): 每孔中每种肽100μl。

[0917] mAb0061的稀释

[0918] 0.55mg/ml ->100ng/ml (5500x稀释)

[0919] 孔中的浓度: 10 ng

[0920] mAb山羊抗人IgG HRP的稀释

[0921] 1mg/ml -> 0.2μg/ml (5000x稀释)

[0922] 在96孔形式中的生物素化肽的合成

[0923] 使用标准的固相肽合成,合成生物素化的肽。使用二异丙基碳二亚胺(DIC),偶联0.3M Fmoc-保护的氨基酸在0.3 M 1-羟基苯并三唑(HOBt)(在N-甲基吡咯烷酮(NMP)中)中的溶液达1-4小时。在96微量滴定滤板(Nunc)中使用Rink酰胺LL树脂(Merck)作为固体支持物,每个孔使用约20 mg树脂。使用来自德国Intavis的Multipep RS肽合成仪,进行所述合成,并使用生产商的方案。使用在NMP中的25%哌啶,去除Fmoc。所有肽在N-端偶联生物素,并使用8-氨基-3,6-二氧杂辛酸作为生物素和肽之间的间隔基。根据所述合成方案(IRIS biotech, 德国),该间隔基也作为Fmoc-保护的结构单元进行偶联。

[0924] 最终脱保护和后处理

[0925] 使用90%三氟乙酸(TFA)、5%三异丙基硅烷和5%H_2O,进行最终脱保护3小时。每个孔使用共1 ml TFA。将TFA过滤至96个深孔(Nunc),通过蒸发,将TFA的体积减小至约100- 200 ul/孔,将二乙醚加入所有孔中,以便沉淀出肽。将肽在二乙醚中的悬浮液转移至solvinert 96孔滤板(0.47 um, Millipore),用二乙醚洗涤肽2次,并干燥。将肽重新溶解于80%DMSO和20%水中,得到约1-3 mg/ml的储备溶液。

[0926] 来自TLT-1的茎区(SEQ ID NO 6)的生物素化的20聚体肽

[0927] 2-5mg/ml,在75% DMSO/H_2O中(在N-端生物素化):

[0928] 肽的编号显示在左侧:

	2	A 2	2619.8	bio-Oeg-L-N-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E
	3	A 3	2620.7	bio-Oeg-N-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N
	4	A 4	2577.7	bio-Oeg-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A
	5	A 5	2611.7	bio-Oeg-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F
	6	A 6	2585.6	bio-Oeg-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S
	7	A 7	2603.6	bio-Oeg-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D
	8	A 8	2603.6	bio-Oeg-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P
	9	A 9	2545.6	bio-Oeg-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A
	10	A10	2473.6	bio-Oeg-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G
[0929]	11	A11	2431.6	bio-Oeg-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S
	12	A12	2373.6	bio-Oeg-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A
	13	B 1	2358.6	bio-Oeg-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N
	14	B 2	2354.6	bio-Oeg-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P
	15	B 3	2330.7	bio-Oeg-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L
	16	B 4	2331.6	bio-Oeg-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E
	17	B 5	2315.5	bio-Oeg-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P
	18	B 6	2345.5	bio-Oeg-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S
	19	B 7	2386.5	bio-Oeg-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q
	20	B 8	2388.4	bio-Oeg-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D
	21	B 9	2446.4	bio-Oeg-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E
	22	B10	2445.5	bio-Oeg-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K
	23	B11	2418.5	bio-Oeg-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S
[0930]	24	B12	2460.6	bio-Oeg-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I
	25	C 1	2410.5	bio-Oeg-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P
	26	C 2	2436.6	bio-Oeg-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L
	27	C 3	2434.7	bio-Oeg-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L-I

[0931] 来自hTLT-1的茎区(SEQ ID NO 6)的生物素化的16聚体肽

[0932] 2-5mg/ml,在75% DMSO/H_2O中:

[0933]

29	C 5	2219.3	bio-Oeg-L-N-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G
30	C 6	2193.2	bio-Oeg-N-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S
31	C 7	2192.3	bio-Oeg-I-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L
32	C 8	2150.2	bio-Oeg-L-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A
33	C 9	2166.1	bio-Oeg-P-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E
34	C10	2183.1	bio-Oeg-P-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N
35	C11	2157.1	bio-Oeg-E-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A
36	C12	2175.2	bio-Oeg-E-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F
37	D 1	2133.2	bio-Oeg-E-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S
38	D 2	2119.2	bio-Oeg-E-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D
39	D 3	2087.2	bio-Oeg-E-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P
40	D 4	2029.2	bio-Oeg-T-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A
41	D 5	1985.2	bio-Oeg-H-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G
42	D 6	1935.2	bio-Oeg-K-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S
43	D 7	1878.1	bio-Oeg-I-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A
44	D 8	1879	bio-Oeg-G-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N
45	D 9	1919	bio-Oeg-S-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P
46	D10	1945.1	bio-Oeg-L-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L
47	D11	1961	bio-Oeg-A-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E
48	D12	1987	bio-Oeg-E-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P
49	E 1	1945	bio-Oeg-N-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S
50	E 2	1959	bio-Oeg-A-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q
51	E 3	2003	bio-Oeg-F-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D
52	E 4	1984.9	bio-Oeg-S-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E
53	E 5	2026	bio-Oeg-D-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K
54	E 6	1998	bio-Oeg-P-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S

[0934]

55	E 7	2014.1	bio-Oeg-A-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I
56	E 8	2040.1	bio-Oeg-G-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P
57	E 9	2096.2	bio-Oeg-S-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L
58	E10	2122.3	bio-Oeg-A-N-P-L-E-P-S-Q-D-E-K-S-I-P-L-I

[0935] 方法

[0936] 表位作图包括:mAb 0061与来自TLT-1的茎区的2个系列的生物素化肽的结合。所述生物素化的肽被结合在链霉抗生物素板上。

[0937] 茎肽:

[0938] LNILPPEEEEETHKIGSLAENAFSDPAGSANPLEPSQDEKSIPL

[0939] 1)用1个残基移码进行20聚体肽作图(20,1) (参见材料)

[0940] 2)用1个残基移码,进行16聚体肽作图(16,1) (参见材料)

[0941] 1. 用250μl洗涤缓冲液预洗涤平板3次

[0942] 2. 加入100μl生物素化的肽-溶液(来自Masterplate 10000 X稀释,每个孔1种

肽)

[0943] 3．在室温温育1小时,或在+5℃温育过夜

[0944] 4．用洗涤缓冲液洗涤3次

[0945] 5．加入100μl第一抗体(稀释度参见上面)

[0946] 6．在室温温育1小时

[0947] 7．用洗涤缓冲液洗涤3次

[0948] 8．加入100μl第二抗体(稀释度参见上面)

[0949] 9．在室温温育1小时

[0950] 10．用洗涤缓冲液洗涤3次

[0951] 11．加入100μl底物/显影缓冲液(反应时间3 min)

[0952] 12．加入100μl 2M H_3PO_4

[0953] 13．在450 nm处读出终点

[0954] 当在450 nm处的吸光度大于3时,将孔中与生物素化的肽的结合记录为“结合”。当信号小于1时,记录“无结合”。将介于其间的信号记录为“弱结合”。

[0955] 结果

[0956] 按照以下方式,将生物素化肽放入孔中：

[0957] A行:肽2-12 (20聚体)

[0958] B行:肽13-24 (20聚体)

[0959] C行:肽25-27 (20聚体)

[0960] C行:肽29-36 (16聚体)

[0961] D行:肽37-48 (16聚体)

[0962] E行:肽49-58 (16聚体)

[0963] 三重测定的结果：

[0964]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		<0.1	<0.1	<0.1	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3	>3
B	>3	>3	>3	>3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C	<0.1	<0.1	<0.1		<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	>3
D	>3	>3	>3	>3	>3	>3	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
E	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1		
F												
G												
H												

[0965] 总之,20聚体-肽(5-16)产生对应于氨基酸IGSLAENAF的强阳性信号(<3)。16聚体肽36-42产生对应于KIGSLAENAF的强阳性信号(<3)。

[0966] 结论

[0967] 肽行走ELISA已经将表位的用于结合mAb 0061的最小结合区定义为下面的氨基酸残基段:KIGSLAENAF。

[0968] 该段实际上是上面通过晶体结构定义的表位(KIGSLA-NAFSDPA)的一部分。

[0969] 实施例26:因子VIIa多肽*体外水解测定*。

[0970] 平行测定天然(野生型)因子VIIa和因子VIIa变体(在下文都称为“因子VIIa”),以直接比较它们的比活(specific activity)。测定在微量滴定板(MaxiSorp, Nunc, 丹麦)上进行。将显色底物D-Ile-Pro-Arg-*p*-硝基苯胺(S-2288, Chromogenix, 瑞典),终浓度1 mM,加入到在50 mM Hepes (pH 7.4,含有0.1 M NaCl、5 mM $CaCl_2$和1 mg/ml牛血清白蛋白)中的因子VIIa (终浓度100 nM)中。在SpectraMax™ 340读板器(Molecular Devices, USA)中在405 nm处连续测量吸光度。在20分钟温育期期间显示的吸光度,在减去不含酶的空白孔的吸光度之后,用于计算变体和野生型因子VIIa的活性的比率:

[0971] 比率= ($A_{405\ nm}$因子VIIa变体)/($A_{405\ nm}$因子VIIa野生型)。

[0972] 实施例27:因子VIIa多肽*体外*蛋白水解测定。

[0973] 平行测定天然(野生型)因子VIIa和因子VIIa变体(在下文中都称为“因子VIIa”),以直接比较它们的比活。测定在微量滴定板(MaxiSorp, Nunc, 丹麦)上进行。将在100 μL 50 mM Hepes (pH 7.4,含有0.1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$和1 mg/ml牛血清白蛋白)中的因子VIIa (10 nM)和因子X (0.8微摩尔)温育15 min。然后通过加入50 μL 50 mM Hepes (pH 7.4,含有0.1 M NaCl, 20 mM EDTA和1 mg/ml 牛血清白蛋白)而终止因子X的裂解。通过加入终浓度0.5 mM的显色底物Z-D-Arg-Gly-Arg-*p*-硝基苯胺(S-2765, Chromogenix, 瑞典),测定所产生的因子Xa的量。在SpectraMax™ 340读板器(Molecular Devices, USA)中在405 nm处连续测量吸光度。在10分钟期间显示的吸光度,在减去不含FVIIa的空白孔的吸光度之后,用于计算变体和野生型因子VIIa的蛋白水解活性的比率:

[0974] 比率= ($A_{405\ nm}$因子VIIa变体)/($A_{405\ nm}$因子VIIa野生型)。

[0975] 实施例28:因子VIIIa活性测定: 显色测定。

[0976] 在显色FVIII测定中,使用Coatest SP试剂(Chromogenix),对rFVIII化合物的FVIII活性(FVIII:C)评价如下:将rFVIII样品和FVIII 标准品(例如,针对NIBSC的第7届国际FVIII标准而标定的纯化的野生型rFVIII)在Coatest测定缓冲液(50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% BSA, pH 7.3, 含防腐剂)中稀释。将50 μl样品、标准品和缓冲液阴性对照加入到96-孔微量滴定板(Nunc)中,一式两份。将来自Coatest SP试剂盒的因子IXa/因子X试剂、磷脂试剂和$CaCl_2$以5:1:3 (体积:体积:体积)混合并将其75 μl加入到各孔中。在室温温育15分钟之后,加入50 μl因子Xa底物S-2765/凝血酶抑制剂I-2581混合物并将试剂在室温温育10分钟,然后加入25 μl 1 M 柠檬酸, pH 3。在Spectramax microtiter读板器(Molecular Devices)上测量415 nm处的吸光度,使用620 nm处的吸光度作为参考波长。从所有样品中减去阴性对照的值并通过吸光度值相对于FVIII浓度作图的线性回归而制备标定曲线。通过将样品活性除以经HPLC测定的蛋白浓度而计算比活。通过对应于轻链的色谱图的峰下面积的积分而确定样品浓度并与野生型的未经修饰的rFVIII的平行分析中的同样的峰面积进行比较,其中浓度通过氨基酸分析而测定。

[0977] 实施例29:因子VIIIa活性测定: 一步法凝血测定。

[0978] 如下在一步法FVIII凝血测定中进一步评价rFVIII化合物的FVIII活性(FVIII:C):将rFVIII样品和FVIII标准品(例如,针对NIBSC的第7届国际FVIII 标准而标定的纯化的野生型rFVIII)在HBS/BSA缓冲液(20 mM hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4,含1% BSA)中稀释至大约 10 U/ml,然后在含VWF的FVIII-缺陷型血浆(Dade Behring)中进行10倍稀释。随后样品在HBS/BSA缓冲液中稀释。使用ACL300R或ACL5000仪器(Instrumentation

Laboratory)，使用单因子程序测定APTT凝血时间。含VWF的FVIII-缺陷型血浆(Dade Behring)用作测定血浆，SynthASil (HemosIL™, Instrumentation Laboratory)用作aPTT试剂。在凝血仪器中，将稀释的样品或标准品与FVIII-缺陷型血浆和aPTT试剂在37℃混合。加入氯化钙并通过测量浊度而确定直到血块形成的时间。根据FVIII标准品的稀释液的血块形成时间的标准曲线而计算样品中的FVIII:C。

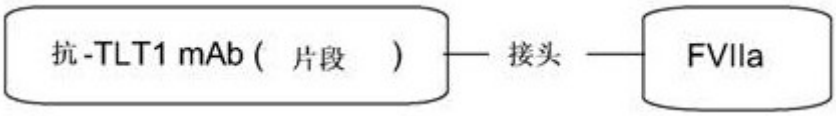
[0979] 实施例30:因子Xa多肽体外蛋白水解测定。

[0980] 平行测定预活化的天然(野生型)因子Xa和预活化的因子Xa变体(在下文中都称为“因子Xa”)，以直接比较它们的比活。测定在微量滴定板(MaxiSorp, Nunc, 丹麦)上进行。将在100 μL 50 mM Hepes (pH 7.4,含有0.1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$和1 mg/ml牛血清白蛋白)中的因子Xa (10 nM)和凝血酶原 (0.8微摩尔)温育15 min。然后通过加入50 μL 50 mM Hepes (pH 7.4,含有0.1 M NaCl, 20 mM EDTA和1 mg/ml牛血清白蛋白)而终止凝血酶原的裂解。通过加入终浓度0.5 mM的显色底物H-D-苯丙氨酰-L-pipecolyl-L-Arg-*p*-硝基苯胺(S-2738, Chromogenix, 瑞典)，测定所产生的凝血酶的量。在SpectraMax™ 340读板器(Molecular Devices, USA)中在405 nm处连续测量吸光度。在10分钟期间显示的吸光度，在减去不含FXa的空白孔的吸光度之后，用于计算变体和野生型因子FXa的蛋白水解活性的比率。

[0981] 比率= ($A_{405\ nm}$因子Xa变体)/($A_{405\ nm}$因子Xa野生型)。

[0982] 实施例31:抗TLT-1抗体(片段)与凝血因子的化学缀合。

[0983] 以下通式的化合物

[0984] 

，

[0985] 其中“抗TLT-1 mAb (片段)”可以是针对TLT-1的全长mAb或其片段或在知识上源自它的类似物例如但不限于FAB-片段或sc-FAB，其具有0个、1个或多个点突变；所述接头可以是水溶性聚合物，例如但不限于例如PEG、多唾液酸或羟乙基淀粉；而FVIIa是与天然FVIIa相比具有>50%序列相似性并具有FVIIa的任何保留的活性的任何分子，其可以是例如在两步骤程序中制备的。

[0986] 在第一步骤期间，可将具有2个不同反应性基团RS1和RS2的接头连接到抗TLT-1 mAb (片段)上。该反应可以以低位点选择性或以选择性方式来进行，从而使RS1仅在抗TLT-1 mAb (片段)的一个或很少位置上反应。作为非排他性实例，RS1可以是醛并通过还原性胺化而反应，通过还原性胺化仅与抗TLT-1 mAb (片段)的N-末端反应，这是本领域技术人员已知的。另一个非排他性实例RS1可以是马来酰亚胺基团，其可与抗TLT-1 mAb (片段)上的游离硫醇基反应。

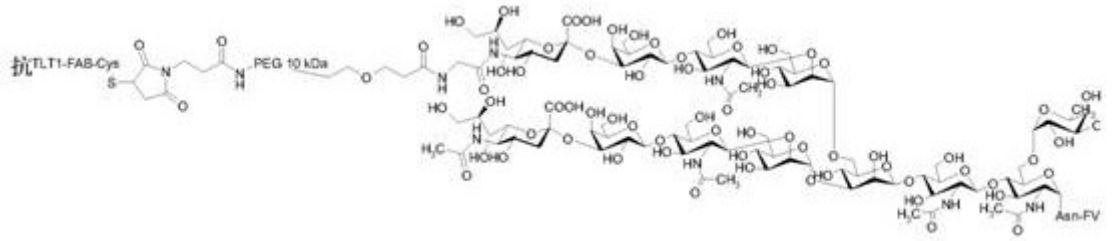
[0987]

[0988] 在第二步骤期间，反应性基团RS2可以以低位点选择性或以位点选择性方式与FVIIa分子反应。作为非排他性实例，可获得在FVIIa的位点选择性反应，当RS2是唾液酸衍生物时，其可在合适的酶例如但不限于ST3Gal-III存在下与N-连接的聚糖反应，其不排他性地以唾液酸为末端。

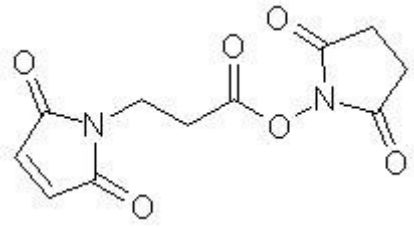
[0989]

[0990] 接头与这2种蛋白(即抗TLT-1 mAb (片段)和所述FVIIa分子)的连接顺序可被转换,从而将RS1-接头-RS2分子先连接到所述FVIIa分子上,再连接到抗TLT-1 mAb (片段)上。

[0991] 实施例32:抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)与FVIIa的缀合,用于产生FVIIa-Fab1029。

[0992] 

[0993] *步骤1:* 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸2,5-二氧代吡咯烷基-1-基酯。

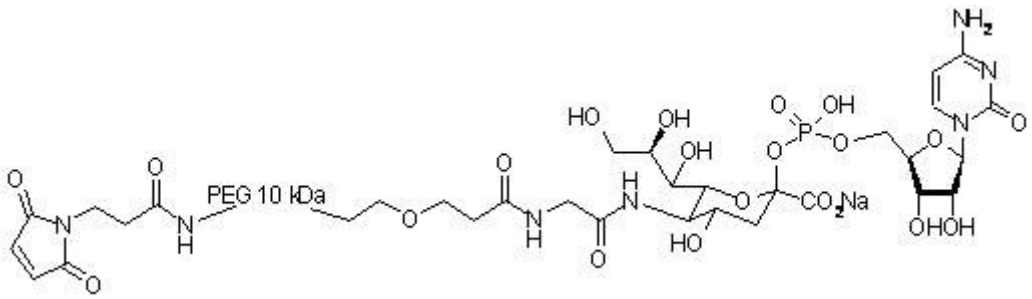
[0994] 

[0995] 将3-马来酰亚胺基丙酸(1.0 g, 5.9 mmol)溶解于四氢呋喃(20 ml)中。随后加入2-琥珀酰亚胺基-1,1,3,3-四甲基脲 鎓四氟硼酸盐(TSTU, 2.14 g, 7.1 mmol)和乙基二异丙胺(1.24 ml, 7.1 mmol)。加入*N*,*N*-二甲基甲酰胺(5 ml)。在室温搅拌反应混合物,同时它缓慢转动。将混合物搅拌2 min。加入*N*,*N*-二甲基甲酰胺(5 ml)。将混合物在室温搅拌2.5 h。用二氯甲烷(150 ml)稀释它,随后用10%硫酸氢钠水溶液(150 ml)、饱和碳酸氢钠水溶液(150 ml)和水(150 ml)洗涤。其经硫酸镁干燥。在真空中去除溶剂。使粗产物从乙酸乙酯重结晶,得到1.20 g 3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸2,5-二氧代吡咯烷-1-基酯。

[0996] MS: m/z = 289, 要求$[M+Na]^+$: 289

[0997] ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ 2.82 (m, 4 H);3.02 (t, 2 H);3.94 (t, 2 H), 6.73 (s, 2 H)。

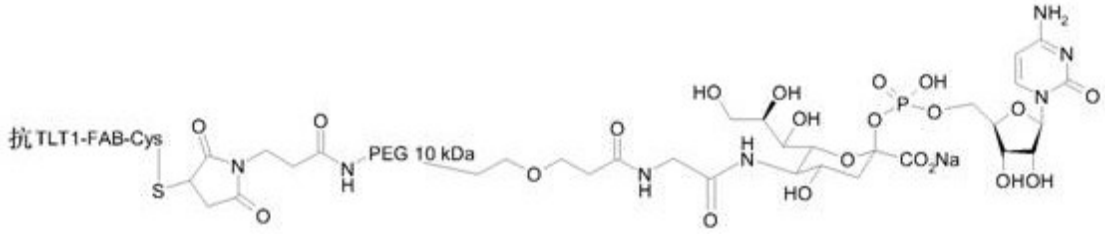
[0998] *步骤2:* N-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸(NNC 0129-0000-3259)。

[0999] 

[1000] 将*N*-((3-(ω-氨基10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-

ξ-神经氨酸(100 mg, 0.009 mmol)溶解于四氢呋喃(2 ml)和二氯甲烷(10 ml)的混合物中。加入3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸2,5-二氧代吡咯烷基-1-基酯(50 mg, 0.18 mmol)在二氯甲烷(3 ml)中的溶液。加入乙基二异丙胺(0.005 ml, 0.028 mmol)。将反应混合物在室温搅拌16 h。加入二氯甲烷(2 ml)和乙基二异丙胺(0.5 ml)。加入氨基甲基化的聚苯乙烯树脂(例如可从Novabiochem市售得到,装载0.85 mmol/g, 438 mg, 0.372 mmol)。将混合物在室温缓慢地搅拌1 h。过滤去除树脂。在25℃的浴温,在真空中去除溶剂。将残余物溶解于二氯甲烷(4 ml)中。加入乙醚(200 ml)。将混合物在室温放置2 h,以便让形成的沉淀物变老。通过过滤,分离沉淀物,并在真空中干燥,得到38 mg标题化合物。在DMSO-d_6中的^{1}H-NMR谱证实马来酰亚胺基团的存在。

[1001] *步骤3:* 将N-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸连接到抗TLT-1 FAB上。

[1002] 

[1003] 对具有部分铰链区(其中掺入未配对Cys)的抗TLT-1 FAB片段进行LC-MS分析表明,未配对的Cys带上了半胱氨酸"帽子"。因此,在与*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸反应之前,通过与三(羧乙基)膦氢氯化物反应,对未配对的Cys进行脱帽。

[1004] 将在20 mM HEPES, 5.0 mM EDTA, 100 mM NaCl的缓冲液(其已调节至pH 7.5)中的具有部分铰链区(其中掺入未配对Cys (1 mg))的抗TLT-1 FAB片段溶液,放入amicon超速离心装置中,截止为10 kDa。通过在4000 rpm的重复超速离心,将缓冲液更换为由20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1 M 甘油组成的缓冲液(其已调节至pH 7.35)。更换了缓冲液之后,得到了在由20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1 M 甘油组成的缓冲液(其已调节至pH 7.35)中的蛋白溶液(4 ml)。加入1 mg/ml三(羧乙基)膦氢氯化物的溶液(0.40 ml)。将反应混合物在300 rpm在20℃振摇1 h。将反应混合物放入超速离心装置中,截止为10 kDa并通过在4000 rpm超速离心7 min而浓缩,然后得到0.700 ml溶液。将其施加到PD-10柱(Amersham Bioscience)上,该柱已经用25 mM HEPES缓冲液(已调节至pH 7.00)平衡。用25 mM HEPES缓冲液(已调节至pH 7.00)(3.2 ml)从柱子上洗脱下蛋白。该溶液通过在Amicon超速离心装置中在4000 rpm超速离心7 min而浓缩,截止为10 kDa,得到0.750 ml溶液。将该溶液放入小管中,并加入25 mM HEPES缓冲液(已调节至pH 7.00)(0.360 ml)。加入1 mg/ml *N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸溶液(0.89 ml)。将反应混合物在300 rpm在20℃温和振摇3.5 h。将其放入Amicon超速离心装置中,截止为10 kDa,并通过在4000 rpm超速离心10 min,浓缩至0.120 ml体积。将该溶液在Superose 75 10/300 GL柱(GE Healthcare)上进行大小排阻色谱,流速0.50 ml/min,使用由25 mM TRIS, 150 mM NaCl所组成的缓冲液(已调节至pH 8.00)作为洗脱液。根据对280 nm处的色谱图的紫外迹线而合并流分。经SDS-PAGE判定的含有所需化合物的、并经使用PEG特异性染

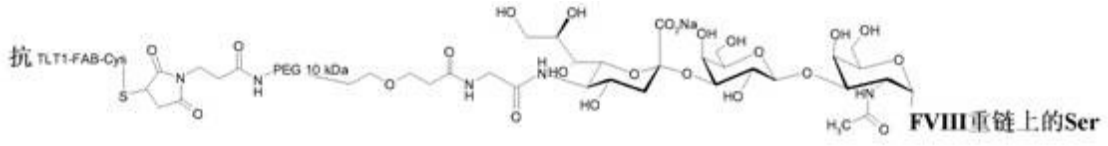
色方法 (描述于Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, *200*, 244-248.)的SDS-PAGE判定的缺乏游离PEG试剂的合并物(0.148 mg, 1.4 ml),用于以下步骤。

[1005] *步骤4*: 固定化的唾液酸酶(固定在琼脂糖上的产气荚膜梭菌(*C. perfringens*) VI-A 型, Sigma: N-5254, 0.6-1.8 U/ml凝胶, 0.180 ml)用水(2 x 0.50 ml)洗涤,再用25 mM MES, 20 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl的缓冲液(已调节至pH 6.1) (3 x 0.50 ml)洗涤。将在由25 mM Gly-Gly, 10 mM $CaCl_2$组成的缓冲液(其已经调节至pH 6.0)中的FVIIa (0.50 mg)溶液加入到固定化的唾液酸酶中。反应混合物在室温放置,同时每20 min将其小心地混合。3 h之后,通过Pierce离心柱,经2000 rpm离心2 min,过滤去除固定化的树脂。

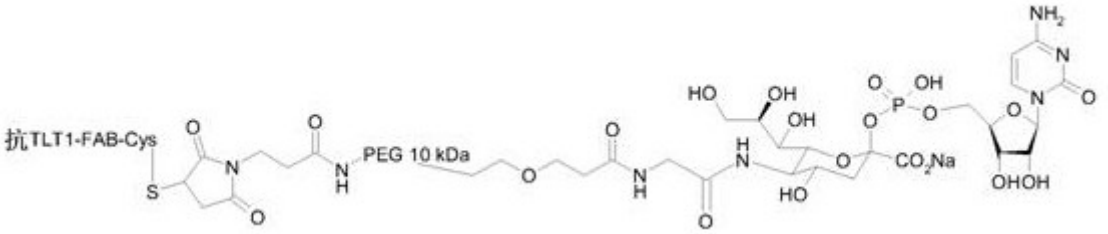
[1006] 按照先前的步骤所述,将*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸与抗TLT-1 FAB的连接的产物混合物放入Amicon超速离心装置中,截止为10 kDa。通过重复超速离心,将缓冲液更换为由25 mM MES, 20 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 6.1)。

[1007] 向该溶液中,加入一部分FVIIa衍生物的溶液(0.092 ml)。将缓冲液更换为由25 mM MES, 20 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 6.1且总体积为(0.20 ml))。加入ST3-Gal-III溶液(0.015 ml)。将反应混合物在32℃温和振摇25 min,然后在32℃放置16 h。加入在25 mM MES, 20 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6.1)中的10 mg/ml CMP-*N*-乙酰基神经氨酸(CMP NeuNAc, 0.70 mg, 0.070 ml)溶液。将反应混合物在32℃温和振摇15 min,然后在32℃放置1 h。反应混合物经过在Superdex 200 10/300 GL柱(GE Healthcare)上的大小排阻色谱,流速0.5 ml/min,使用10 mM组氨酸、20 mM $CaCl_2$、150 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6.1)作为洗脱液。将含有所需产物(通过在TRIS-乙酸盐凝胶上的SDS-PAGE判定)的流分合并。使用在Nanodrop®仪器上在280 nm处的摩尔吸收11.22,发现收率为0.022。SDS-PAGE分析结果与所需产物的预期是一致的。所述产物称为FVIIa-Fab1029。

[1008] 实施例33:抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)与FVIII、FVIII-Fab3002的缀合。

[1009] 

[1010] 步骤1: *N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸与抗TLT-1 FAB片段的连接

[1011] 

[1012] 对具有部分铰链区(其中掺入未配对Cys)的抗TLT-1 FAB片段进行LC-MS分析表明,未配对的Cys可带上半胱氨酸"帽子"。因此,在与*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神

经氨酸反应之前，通过与三(羧乙基)膦氢氯化物(TCEP)反应，对未配对的Cys进行脱帽。

[1013] 将在由20 mM HEPES, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.5)中的所述TLT-1-FAB-片段(1.35 mg, 27.4 nmol)的0.27 mg/ml溶液，放入Amicon超速离心装置中，截止为10 kDa。将其在4000 rpm在20℃超速离心10 min。加入由20 mM咪唑、10 mM $CaCl_2$、0.02%吐温80、1 M 甘油组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.35) (4 ml)。将混合物在4000 rpm在20℃超速离心8 min。加入由20 mM咪唑、10 mM $CaCl_2$、0.02%吐温80、1 M甘油组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.35) (4 ml)。将混合物在4000 rpm在20℃超速离心8 min。加入由20 mM咪唑、10 mM $CaCl_2$、0.02%吐温80、1 M 甘油组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.35) (3 ml)。将混合物在4000 rpm在20℃超速离心10 min。将混合物放入反应小管中。加入由20 mM咪唑、10 mM $CaCl_2$、0.02%吐温80、1 M 甘油组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.35) (4 ml)，使得此时反应混合物的总体积为4.7 ml。加入在咪唑、10 mM $CaCl_2$、0.02%吐温80、1 M甘油的缓冲液(其已经调节至pH 7.35)中的1 M TCEP溶液(0.54 ml)。反应混合物在300 rpm振摇1 h。将混合物分为2份，各自施用在已经用25 mM HEPES的缓冲液(pH 7.0)平衡的PD-10柱(GE Healthtech)上。合并洗出液(共7 ml)并通过在截止为10 kDa的Amicon超速离心装置中，在4000 rpm在20℃超速离心6-8 min，浓缩到1 ml。

[1014] 将该溶液放入反应小管中。加入25 mM HEPES缓冲液(其已经调节至pH 7.0) (0.50 ml)，得到总体积1.5 ml。加入在25 mM HEPES缓冲液(其已经调节至pH 7.0)中的新鲜制备的1 mg/ml *N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸溶液(1.2 ml, 1.2 mg, 109 nmol)。将反应混合物在300 rpm在20℃温和振摇3.2 h。通过在截止为10 kDa的Amicon超速离心装置中，在4000 rpm在19℃超速离心11 min，将其浓缩至0.30 ml体积。将其施用到Superdex 75 10/300 GL柱(GE Healthtech)上的大小排阻色谱上，流速0.50 ml/min，使用25 mM TRIS, 150 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 8.0)作为洗出液。在N-甲基马来酰亚胺(NEM)存在下经SDS-PAGE分析判定的含有可接受纯度的所需产物、并经SDS-PAGE以及PEG-敏感性染色((描述于Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, *200*, 244-248.))判定的缺乏未反应的*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸的流分，用于以下步骤。在还原性条件下的SDS-PAGE分析与所需产物的预期结果一致。在非还原性条件下的SDS-PAGE分析显示出某些物质，其中抗TLT-1-FAB片段的一条链已经丧失。然而，该发现是否是因为分析中的问题或者链是否在所述反应期间或甚至更早就已经丧失，仍然尚未解决。使用在Nanodrop®仪器上在280 nm处的摩尔吸收10.44，发现0.1 mg/ml浓度得到收率0.287 mg。

[1015] *步骤2:* 按照，将以下溶液混合并放入Amicon超速离心装置中，截止为10 kDa：先前实施例中所述的*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)10 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸与抗TLT-1 FAB片段的连接产物的溶液，和在由20 mM咪唑、10 mM $CaCl_2$、150 mM NaCl、0.02%吐温80和1 M甘油组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.35)(0.018 ml)中的在重链*C*-末端具有SFSQNSRHPSQNPPVLKRHQR的残余B-结构域序列的B-结构域缺失的FVIII的溶液(0.780 mg, 5.64 mmol)。将该溶液通过重复超速离心和添加缓冲液而进行缓冲液更换，更换为20 mM组

氨酸、10 mM $CaCl_2$、20%甘油、0.02%吐温80、500 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6.05)。得到总体积0.40 ml。随后加入来自产脲节杆菌(*A. urifaciens*)的唾液酸酶的0.4 mg/ml (242 U/mg, 98 U/ml, 0.0055 ml)溶液和ST3Gal-III (0.033 ml)的2.5 mg/ml溶液。反应混合物在300 rpm在32 °C温和振荡15 min,在32°C放置2 h,在此期间不时小心地振摇它,最后在32 °C放置18 h。反应混合物用水 (0.030 ml)稀释。对其进行大小排阻色谱,使用Superose 6 10/300 GL柱(GE Healthcare)并使用10 mM组氨酸, 1.7 mM $CaCl_2$, 0.01%吐温80, 0.3 M NaCl, 8.8 mM 蔗糖的缓冲液(其已经调节至pH 7),流速0.50 ml/min。将经SDS-PAGE分析判定的含有所需产物的流分合并。使用截止为10 kDa的Amicon超速离心装置,对合并物进行缓冲液更换,更换为由20 mM组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 1 M 甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 6.07)。得到总体积0.250 ml。使用在Nanodrop® 仪器上在280 nm处的摩尔吸收14.6,发现0.59 mg/ml浓度,对应于收率0.148 mg。加入在20 mM 组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 20%甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6.05)中的CMP-*N*-乙酰基神经氨酸(CMP Neu*N*Ac, 0.26 mg, 0.026 ml)的10 mg/ml溶液和ST3Gal-III (0.015 ml)溶液。反应混合物在300 rpm在32 °C温和振摇15 min,然后在32℃再放置45 min。反应混合物用水(0.10 ml)稀释。对其进行大小排阻色谱,使用Superose 6 10/300 GL柱(GE Healthcare)和使用10 mM组氨酸, 1.7 mM $CaCl_2$, 0.01%吐温80, 0.3 M NaCl, 8.8 mM蔗糖的缓冲液(其已经调节至pH 7),流速0.50 ml/min。合并经SDS-PAGE分析判定的含有所需产物的流分并通过在Amicon超速离心装置中超速离心而浓缩至总体积大约0.275 ml。使用在Nanodrop® 仪器上在280 nm处的摩尔吸收14.6,发现0.180 ml/ml浓度,对应于收率0.0495 mg。在还原性条件下产物的SDS-PAGE分析与所需产物的预期是一致的。在非还原性条件下的SDS-PAGE分析显示出变化的条带量,其对应于其中FAB-片段已经丧失一条链的产物。相应条带的出现可能是因为产物中存在这样的化合物或者可能是因为在SDS-PAGE分析之前的变性过程中的分解作用。

[1016] 实施例34:结合到TLT-1。

[1017] *表16: 试剂*

[1018]

试剂	来源
TLT-1	实施例2
FVIIa-Fab1029	实施例32
FIX-Fab0135	实施例16
所有其它试剂	Biacore

[1019] 方法:

[1020] 使用供应商推荐的标准程序和表16中提供的试剂,将TLT-1直接固定到CM5芯片上,达到约2000 RU水平(50 ug/ml稀释在乙酸钠中,pH 4.0)。测定FVIIa-Fab1029和FIX-Fab0135的2倍稀释液(从20 nM到0.3 nM)与TLT-1的结合。运行和稀释缓冲液: 10 mM HEPES, 150 mM, 0.005% p20, pH 7.4。通过10 mM甘氨酸pH 1.7,获得再生。使用Biacore T100评价软件,假定TLT1和FVIIa-Fab1029或FIX-Fab0135的1:1相互作用,测定动力学常数和结合常数(k_{on}、k_{off}、K_D)。

[1021] 结果:

[1022] *表17*

[1023]

TLT-1 结合	ka (1/M)	kd (1/s)	K_D (M) TLT-1
FVIIa-Fab1029	3.97E+05	0.007259	1.83E-08
FIX-Fab0135	4.28E+05	8.71E-04	2.04E-09

[1024] 结论：

[1025] 通过biacore分析评估FVIIa-Fab1029和FIX-Fab0135结合到TLT-1上的结合常数并证实结合到TLT-1上(表17)。

[1026] 实施例35: FVIIa-Fab1029在血友病样全血中促进纤维蛋白血块形成。

[1027] 用正常HWB (NWB)、“血友病”血和补充有(0;0.25;0.5;1.0;nM) FVIIa-Fab1029或rFVIIa的“血友病”血所得到的TEG迹线如图11A所示。图11B所示的是对于所描绘的TEG迹线而得到的R时间值。图11B,除了对于FVIIa-Fab1029或rFVIIa蛋白的R时间值之外,还包括对于相当浓度的rFVIIa的R时间值。所有数据都得自一个代表性的供体。观察到FVIIa-Fab1029能有效地使血友病样HWB的凝血正常化。另外结果显示rFVIIa的已知促凝血效果被rFVIIa与针对TLT-1的抗体的FAb片段的缀合而进一步增强。因此,FVIIa-Fab1029蛋白的实例证明将rFVIIa靶向血小板上的TLT-1进一步增强了rFVIIa的FVIII旁通活性。

[1028] 实施例36: FIX-Fab0135具有FVIII-旁通活性和在A型血友病-样全血中促进纤维蛋白血块形成.

[1029] 从正常供体中取出柠檬酸盐化-稳定的人全血(HWB)。通过血栓弹力描记术(5000系列TEG分析仪, Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA),测量血块形成。通过将正常的柠檬酸盐-稳定的人全血(HWB)与10 μg/ml抗FVIII抗体(绵羊抗人因子VIII; Hematologic Technologies Inc)在室温温育30 min,获得A型血友病样条件。将不同浓度(0.1;0.2;1.0;5.0;10 nM)的FIX-Fab0135加入A型血友病-样柠檬酸盐化的HWB中。当将340 μl正常的或预混的HWB转移至装有20 μl 0.2 M $CaCl_2$和0.03 pM 脂质化的TF (Innovin®, Dade Behring GmbH (Marburg, 德国)的血栓弹性描记器杯中时,开始凝血。连续跟踪TEG迹线多达120 min。用正常HWB (NWB)、“血友病”血和补充有(0.1;0.2;1.0;5.0;10 nM) FIX-Fab0135的“血友病”血所得到的TEG迹线如图12所示。为了比较,也显示了当FIX-Fab0135被置换为1 nM rFVIIa或10 nM rFIX时所得到的TEG迹线。所有数据都得自一个代表性的供体。

[1030] 令人吃惊的是,结果显示FIX与针对TLT-1的抗体的FAb片段的融合,产生了具有FVIII旁路活性的蛋白。观察到FIX-Fab0135有效地使A型血友病样HWB的凝血正常化。凝血的FIX依赖性传播需要FIXa/FVIIIa复合物在活化的血小板的表面上的装配,而且所得FX活化(tenase)活性被抑制性FVIII抗体阻止。本实施例用FIX-Fab0135证明,将FIX靶向血小板表面上的TLT-1产生了具有促凝血活性的含FIX复合物,甚至当FVIII被抑制性抗体封闭时。

[1031] 实施例37: FIX-Fab0135融合蛋白靶向富含TLT-1的磷脂囊泡,明显地促进了在FVIII不存在时由FVIIa诱导的FX活化。

[1032] 方法: 按照实施例20所述制备的富含TLT-1的磷脂囊泡用于图13所示的实验,以模拟活化的血小板的表面上的TLT-1。将不同浓度(0.05 - 100 nM) rFVIIa在室温温育15 min i)在Hepes缓冲液(50 mM Hepes, 0.1 M NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 1 mg/ml BSA pH 7.4)中或在Hepes缓冲液中,含有ii) 10 nM FIX, iii) 10 nM FIXa或iv) 10 nM FIX-Fab0135。然后在5 nM FVIII存在或不存在时,将其与100 nM FX (Enzyme Research

Laboratories, UK)和富含TLT-1的磷脂囊泡(1:4,000稀释)混合,并温育3 min。通过加入等体积的终止缓冲液(50 mM Hepes, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 1 mg/ml BSA pH 7.5)终止反应。然后在显色测定中测定样品中所产生的FXa的量,即通过将50 μl混合物转移至微量滴定板孔并向孔中加入25 μl Chromozyme X (最终0.42 mg/ml)。在微量板Spectramax光度计(Molecular Devices, Sunnyvale CA, USA)中在405 nm处连续测量吸光度。

[1033] FVIIa能够活化FIX (Østerud和Rappaport, 1977),然后将所得FIXa指定为与FVIIIa合并并形成所谓的tenase复合物的蛋白水解组分。该复合物的形成发生在活化的血小板的表面上。Tenase复合物负责大规模FX活化,该活化在凝血过程的传播阶段起到关键作用。不能形成活性tenase复合物是A型血友病和B型血友病患者的重要因素。

[1034] 在本实施例中,富含TLT-1的磷脂囊泡用于模拟活化的血小板的表面。该系统用于测试借助FIX-Fab0135,将FIX靶向所述囊泡上的TLT-1是否可类似于活化的血小板上的tenase复合物而促进FX活化。而且,有兴趣检查FVIII的存在对该活性而言是否是必须的。

[1035] 图13显示: 1) 在所测试的所有FVIIa浓度中,在5 nM FVIII存在和不存在时,在未添加FIX衍生物的实验条件下(o),产生极少量的FXa;2)当反应混合物中存在10 nM FIX时也是这种情况(□);3) 当10 nM FIX被置换为10 nM FIXa时,观察到明显的FX活化,然而,仅在FVIII存在时(■);4) 借助FIX-Fab0135,将FIX靶向富含TLT-1的磷脂囊泡,提供了复合物,其以浓度依赖性方式被FVIIa活化;5) 在FVIII存在和不存在两种情况下,所得活化的tenase-样复合物明显地促进了FX活化。

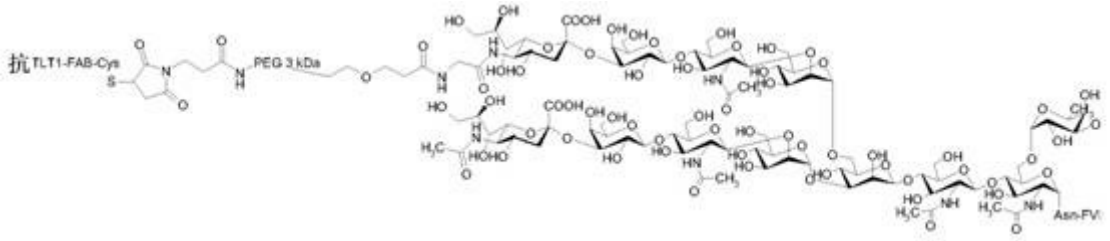
[1036] 这些结果,以及实施例36的那些,表明FIX-Fab0135 FIX融合蛋白提供了FVIII旁路剂(bypassing agent),其通过包括FIX靶向TLT-1的FVIIa活化和形成具有相当的FVIII-非依赖性tenase-样活性的复合物的机制,明显地促进了FVIIa-介导的FXa活化。

[1037] 实施例38: TLT-1在人血小板上的表达。

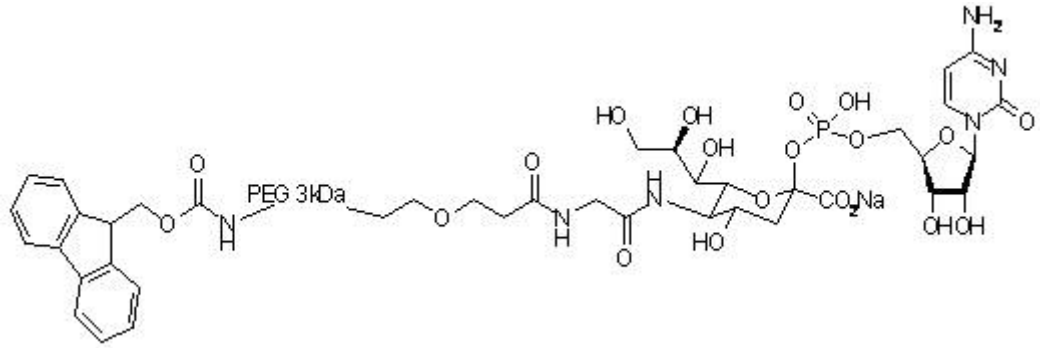
[1038] 据报道TLT-1仅表达在活化的血小板上(Washington等人 (2004) Blood. 2004月8月15日;104(4):1042-7)。为了证实这一点并估计血小板表面上的TLT-1的具体拷贝数,我们使用来自Biocytex (Marseille, France)的"血小板标定试剂盒",其中通过无洗涤的间接免疫荧光,使用特异性单克隆抗体对血小板染色,并通过定量流式细胞术来分析。使用对检测抗体具有确定数量的结合位点的标定珠,测定所测试抗原的表达水平。按照制造商说明书,柠檬酸盐化的人全血中的血小板被不同浓度(0.3-30 μM)的具有氨基酸序列SFLLRN的蛋白酶活化受体(PAR) -1活化的肽活化。将样品在试剂盒中提供的盐水缓冲液中稀释1:4,然后用TLT-1结合抗体标记。所用的TLT-1结合抗体是mAb0123 (mAb0023抗体的IgG1亚类)或mAb0136 (mAb0012抗体的IgG1亚类)。与TLT-1抗体(10 μg/ml)温育15 min,再与FITC标记的检测抗体(由制造商提供)温育15 min之后,将样品稀释1:50,然后立即进行流式细胞术分析。通过使用得自珠的标准曲线,得到血小板表面上的TLT-1的绝对数量。

[1039] 在不使用这两种抗体时,未活化的血小板不显示TLT-1表达。然而,当血小板用SFLLRN活化时,观察到增加的TLT-1表达,最大表达为9685±1696和12981±2083表面分子,分别通过mAb0123和mAb0136检测(图14)。通过SFLLRN (30 μM)和Convulxin (100 ng/ml)的双重刺激,达到最大的血小板TLT-1表达。

[1040] 实施例39: 将抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)缀合到FVIIa上,通过3 kDa PEG接头,FVIIa-Fab1001。

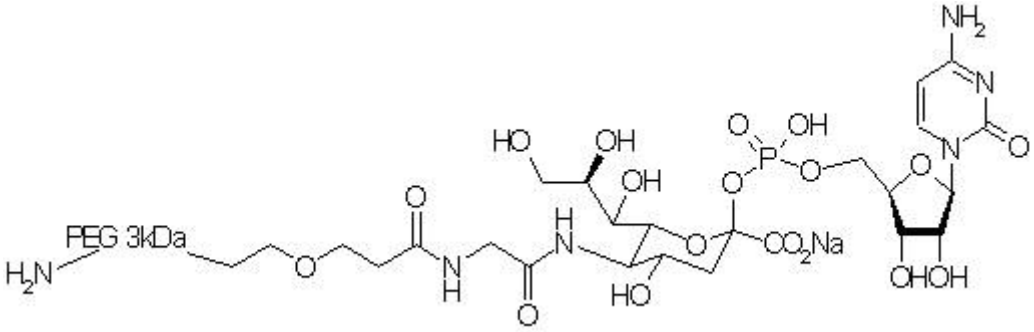
[1041] 

[1042] 步骤1：*N*-((3-(ω-(芴基甲氧基羰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸

[1043] 

将(3-(ω-(芴基甲氧基羰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酸吡咯烷-2,5-二酮-1-基酯 (购自Rapp Polymere GmbH, 1 g, 0.292 mmol)溶解于四氢呋喃(80 ml)中。加入在由50 mM TRIS组成的缓冲液(20 ml) (其已经调节至pH 8.9)中的胞苷-5'-单磷酸(monophospho)-N-甘氨酰神经氨酸二钠盐(0.276 g, 0.438 mmol)的溶液。在室温搅拌反应混合物16 h。在25℃的浴温,在真空中去除THF。剩余混合物用水稀释至60 ml并通过0.45 μm滤器过滤。将所得溶液分为3份,将每份在C4柱上进行HPLC色谱,使用流速20 ml/min,用50 mM碳酸氢铵水性缓冲液洗涤10 min,然后使用在50 mM碳酸氢铵水性缓冲液中的0-60%乙腈的梯度(在50 min内)。合并流分,其不含有胞苷-5'-单磷酸-N-甘氨酰神经氨酸,和在214 nm处的吸收大于15-20%最大吸收。将合并的流分冻干,得到532 mg *N*-((3-(ω-(芴基甲氧基羰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸。^{1}H-NMR谱与预期一致。

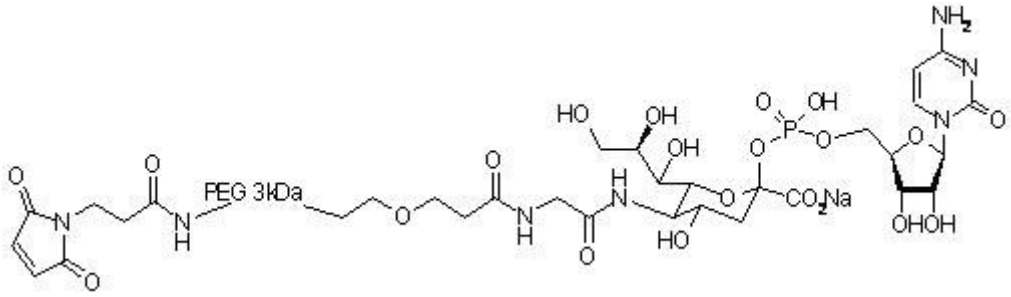
[1044] 步骤2：*N*-((3-(ω-氨基3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸

[1045] 

[1046] 将*N*-((3-(ω-(芴基甲氧基羰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸(532 mg, 0.135 mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(9 ml)中。加入哌啶 (2.25 ml)。在室温搅拌反应混合物20 min。加入乙醚(150 ml)。将混合物在室温

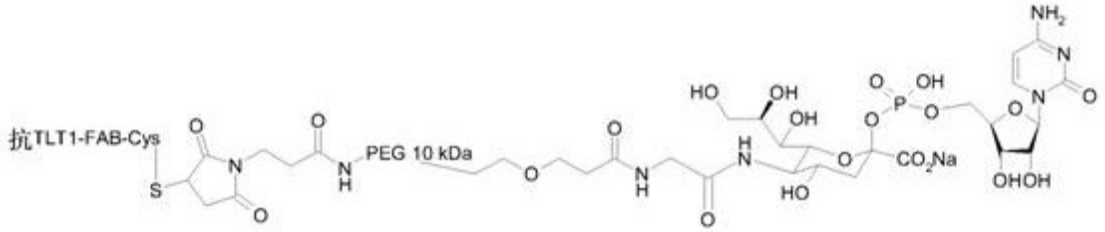
放置1 h。所形成的沉淀物通过倾析和离心而分离。将其溶解于二氯甲烷(10 ml)中。加入乙基二异丙胺(2.4 ml)。将混合物搅拌2 min。加入乙醚(150 ml)。将混合物放置1.5 h,以便让沉淀物变老。沉淀物通过倾析和过滤而分离。在25℃的浴温,在真空中干燥它,得到343 mg *N*-((3-(ω-氨基3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸。^{1}H-NMR与预期一致。

[1047] 步骤3: *N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸(NNC 0129-0000-3259)

[1048] 

[1049] 将*N*-((3-(ω-氨基3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸(343 mg, 0.009 mmol)溶解于二氯甲烷(15 ml)的混合物中。加入乙基二异丙胺(0.05 ml, 0.028 mmol)。加入固体的3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酸2,5-二氧代吡咯烷基-1-基酯 (492 mg, 1.85 mmol)。在室温搅拌反应混合物16 h。加入二氯甲烷(140 ml)。加入氨基甲基化的聚苯乙烯树脂(例如可从Novabiochem市售得到,装载0.85 mmol/g, 4.3 g, 3.69 mmol)。将混合物在室温缓慢地搅拌1 h。通过过滤,去除树脂。在25℃的浴温,在真空中去除溶剂。加入Amberlyst 15树脂(2 g)。将反应混合物缓慢地搅拌20 min。过滤除去树脂。在25℃的浴温,在真空中去除溶剂。将残余物溶解于二氯甲烷(10 ml)中。加入乙醚(200 ml)。将混合物在室温放置6 h,以便让形成的沉淀物变老。通过倾析和离心分离沉淀。将其在真空中干燥,得到180 mg标题化合物。在DMSO-d_6中的^{1}H-NMR谱证实马来酰亚胺基团的存在。

[1050] 步骤4: 将*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸连接到抗TLT-1 FAB上。

[1051] 

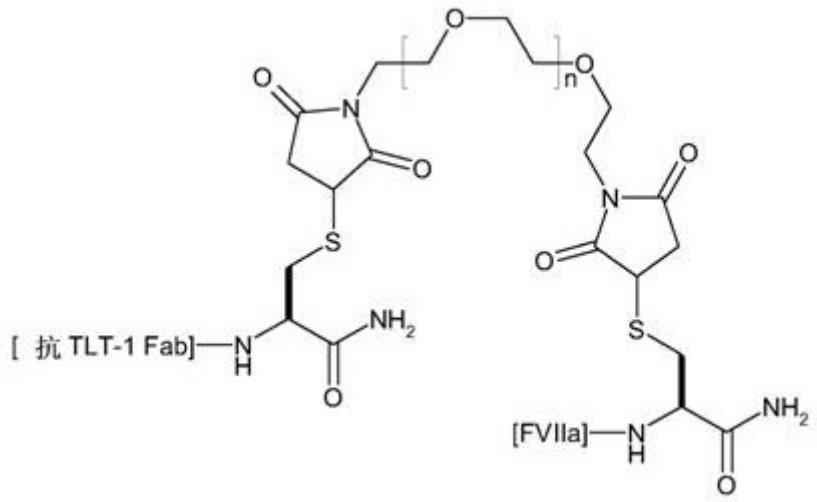
[1052] 将在磷酸缓冲液中的具有部分铰链区(其中将未配对Cys掺入(10 mg))的抗TLT-1 FAB片段的溶液,放入amicon超速离心装置中,截止为10 kDa。通过在4000 rpm重复超速离心,将缓冲液更换为由100 mM HEPES组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.3)中。缓冲液更换之后,得到在由100 mM HEPES组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.3)中的蛋白溶液(36 ml)。加入1 mg/ml三(2-羧乙基)膦氢氯化物溶液(4 ml)。将反应混合物在300 rpm在20℃振摇15 min并在20℃放置45 min。将反应混合物放入超速离心装置中,截止为10 kDa。通过在4000 rpm重复超速离心,将缓冲液更换为由25 mM HEPES组成的缓冲液(其已经调节至pH 7.0)

中，得到13.2 ml溶液。加入1 mg/ml *N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸溶液(6.4 ml)。反应混合物在300 rpm在20 °C温和振摇15 min并在20℃放置16 h。将其放入Amicon超速离心装置中，截止为10 kDa并通过在4000 rpm超速离心10 min，浓缩至体积< 5 ml。将该溶液在Superose 75 16/60 GL柱(GE Healthcare)上进行大小排阻色谱，流速为1ml/min，使用由25 mM TRIS, 150 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 8.00)作为洗脱液。根据对280 nm处的色谱图的紫外迹线而合并流分。经SDS-PAGE判定的含有所需化合物的、并经使用PEG特异性染色方法 (描述于Kurfürst, M. M. *Analyt. Biochem.* 1992, *200*, 244-248.)的SDS-PAGE判定的缺乏游离PEG试剂的合并物(9.9 mg, 13.7 ml)，用于以下步骤。

[1053] 步骤5: 固定化的唾液酸酶(固定在琼脂糖上的产气荚膜梭菌(*C. perfringens*) VI-A型, Sigma: N-5254, 0.6-1.8 U/ml凝胶, 1.52 ml)用水(3 x 9 ml)洗涤，随后用20 mM HEPES, 10 mM $CaCl_2$, 0.005%吐温80, 100 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 7.5) (3 x 9 ml)洗涤。将在由25 mM Gly-Gly, 10 mM $CaCl_2$组成的缓冲液(6.59 ml)(其已经调节至pH 6.0)中的FVIIa (8.9 mg)溶液放入Amicon超速离心装置中，截止为10 kDa。通过在4000 rpm重复离心，将缓冲液更换为20 mM HEPES, 10 mM $CaCl_2$, 0.005%吐温80, 100 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 7.5)，得到终体积6.5 ml。将该溶液加入到固定化的唾液酸酶中。将反应混合物在室温转动3.5 h。

[1054] 将在由25 mM TRIS, 150 mM NaCl组成的缓冲液(13.5 ml)(其已经调节至pH 8.00)中的、按照先前的步骤所述而得到的*N*-((3-(ω-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢吡咯-1-基)丙酰基氨基)3 kDa聚乙二醇基)丙酰基氨基)乙酰基)-O^2-[5']胞苷酰基-ξ-神经氨酸与抗TLT-1 FAB (10 mg)连接的产物，放入Amicon超速离心装置中，截止为10 kDa。加入由20 mM组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 20%甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl组成的缓冲液(其已经调节至pH 6.0)。在4000 rpm超速离心2 min。加入由20 mM组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 20%甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl组成的另一部分缓冲液(其已经调节至pH 6.0)。在4000 rpm超速离心10 min。加入与固定化的唾液酸酶反应的反应产物，通过过滤去除固定化的唾液酸酶。加入由20 mM组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 20%甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl组成的另一部分缓冲液(其已经调节至pH 6.0)。在4000 rpm超速离心10 min，得到总体积9 ml。加入ST3Gal-III (500 ul)溶液。反应混合物在32℃温和振摇15 min，然后在32℃放置16 h。加入在20 mM组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 20%甘油, 0.02%吐温80, 500 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6.0)中的10 mg/ml CMP-*N*-乙酰基神经氨酸(CMP NeuNAc, 0.70 mg, 0.89 ml)溶液。反应混合物在32℃温和振摇15 min，然后在32℃放置1 h。将反应混合物在Superdex 200 26/60 GL柱(GE Healthcare)上进行大小排阻色谱，流速2 ml/min，使用10 mM 组氨酸, 10 mM $CaCl_2$, 0.01%吐温80, 200 mM NaCl的缓冲液(其已经调节至pH 6)作为洗脱液。将经在TRIS-乙酸盐凝胶上的SDS-PAGE判定的含有所需产物的流分合并。使用在Nanodrop ® 仪器上在280 nm处的摩尔吸收12.86，发现收率为3.2 mg。SDS-PAGE分析结果与所需产物的预期是一致的。

[1055] 实施例40:抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)与FVIIa 407C的缀合，通过3 kDa PEG接头, FVIIa-Fab9015。

[1056] 

[1057] 将在20mM HEPES，100mM NaCl，10mM CaCl2，pH 7.0中的FVIIa 407C (5 mg，0.55 mg/ml，9 ml)与谷胱甘肽(还原型，40 mM，125微升，在HEPES缓冲液中)，谷胱甘肽(氧化型，1.6 mM，125微升，在HEPES缓冲液中)，对氨基苯甲脒(0.5 M，500微升，在HEPES缓冲液中)和谷氧还蛋白(Grx2，EC 1.20.4.1，96微摩尔，200微升)的溶液混合。将体积调整到10.0 ml，pH为7.0。

[1058] 所得混合物在32摄氏度温育5 h。

[1059] 加入在水中的EDTA (800微升，0.25 M，pH 7.0)。将溶液用脱盐水稀释，直到电导率降至8.3 mS/cm (20 ml)。

[1060] 将该溶液注射到预调节的HiTrap Q FF柱(在缓冲液A中预调节，5 ml柱体积)。

[1061] 缓冲液A: 50 mM HEPES，100 mM NaCl，1 mM EDTA，0.01%吐温-80，pH 7.0

[1062] 缓冲液B: 50 mM HEPES，100 mM NaCl，10 mM CaCl2，0.01%吐温-80，pH 7.0

[1063] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤，使用Äkta净化器100色谱站(chromatography station)。蛋白用缓冲液B (10 CV)以2 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1064] 合并7个流分。合并物中的蛋白浓度估计为0.49 mg/ml (abs. 280 nm)，体积7.5 ml，3.8 mg FVIIa (77.6 nmol)。

[1065] 加入在20mM HEPES，100mM NaCl，10mM $CaCl_2$，pH 7.0 (3.5 ml)中的双-马来酰亚胺聚乙二醇接头的溶液(3 kDa，Rapp Polymere Gmbh，Tübingen，德国，产品号11300-45，批号1210.764，70 mg，23微摩尔)。所得混合物在室温温育1 h。

[1066] 将在水中的EDTA溶液(250 mM，900微升)加入到所得混合物中。pH调整到7.0。所得混合物用水稀释，直到电导率为8.3 mS/cm，达到体积17 ml。

[1067] 将该溶液注射到预调节的HiTrap Q FF柱(在缓冲液A中预调节，5 ml柱体积)。

[1068] 缓冲液A: 50 mM HEPES，100 mM NaCl，1 mM EDTA，0.01%吐温-80，pH 7.0

[1069] 缓冲液B: 50 mM HEPES，100 mM NaCl，10 mM CaCl2，0.01%吐温-80，pH 7.0

[1070] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤，使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (10 CV)以2 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1071] 合并目标流分，得到总体积12 ml。测定蛋白浓度(Abs. 在280 nm) 为0.30 mg/ml，3.6 mg总蛋白。

[1072] 将在HEPES缓冲液(20 mM HEPES, 1.0 mM CaCl2, 100 mM NaCl, 0.005% (v/v)吐温-80, pH 7.5)中的抗体片段, Fab蛋白ID 0084的溶液(6.7 mg, 3.21 mg/ml)与三(3-磺酸基苯基(sulfonatepheny1))膦水合物钠盐溶液(工业级85%纯度, 10 mg/ml, 5 ml, 相同的缓冲液)混合。将所得混合物在室温温育2 h。将混合物放入Amicon超速离心滤器装置(Millipore corp., MWCO 10 kDa)并在离心后通过重复添加缓冲液(20 mM HEPES, 1.0 mM CaCl2, 100 mM NaCl, 0.005% (v/v)吐温-80, pH 7.5)而更换其缓冲液。

[1073] 将更换过缓冲液的抗体片段样品与接头缀合的FVIIa样品混合,所得溶液经缓冲液更换为缓冲液(50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 35 mM $CaCl_2$, 50 mM苯甲脒, 0.01%吐温-80, pH 7.5),然后浓缩至7 ml。将混合物在室温温育过夜。用SDS-PAGE凝胶电泳分析所得混合物。

[1074] 将水(8.5 ml), EDTA溶液 (5.5 ml, 0.25 M)和氢氧化钠 (1 M)加入到该混合物中,直到pH为7.2且测得电导率为11.0 mS/cm, 总体积: 21ml。

[1075] 将该溶液注射到预调节的HiTrap Q FF柱(在缓冲液A中预调节, 5 ml柱体积)。

[1076] 缓冲液A: 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.01%吐温-80, pH 7.0

[1077] 缓冲液B: 50 mM HEPES, 100 mM NaCl, 10 mM CaCl2, 0.01%吐温-80, pH 7.0

[1078] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (10 CV)以2 ml/min洗脱。将所选流分在Amicon超速离心滤器装置(Millipore corp., MWCO 10 kDa)中浓缩,并在离心后通过重复添加缓冲液(20 mM HEPES, 1.0 mM CaCl2, 100 mM NaCl, 0.005% (v/v)吐温-80, pH 7.5)而更换其缓冲液。将浓缩的样品(5 ml)注射到预调节的Superdex Hiload 16/60柱(GE Healthcare, 在所用缓冲液中预调节)。

[1079] 缓冲液: 10 mM L-组氨酸, 10 mM CaCl2, 100mM NaCl, 0.01%吐温80, pH 6.0

[1080] 通过洗脱而纯化蛋白,流速0.8 ml/min,经过2 CV。

[1081] 根据SDS PAGE凝胶电泳分析(4-12% Bis-Tris乙酸盐, MES运行缓冲液)选择流分。

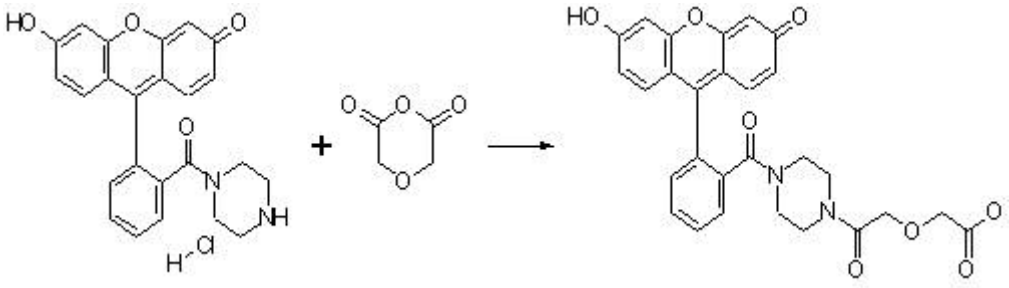
[1082] 使用Amicon超速离心滤器装置(Millipore corp., MWCO 10 kDa)将所选流分合并物浓缩至总体积: 2.25ml。测定蛋白量(abs. 280 nm)为1.2 mg (蛋白缀合物)。

[1083] 通过针对以下的SDS PAGE凝胶电泳 (4-12% Bis-Tris乙酸盐)和(HPC4)蛋白质印迹的分析:

[1084] 1. 第一 - 蛋白C-tag抗体(HPC4) pAb, 兔, 目录号A00637 (40 ug)溶解于80 ul milliQ水中至浓度0.5mg/ml。在印迹期间稀释1:1000。

[1085] 2. 第二 - 山羊抗兔IgG抗体(H&L) (HRP), pAb, 目录号A00098, 批号11B000259。在印迹期间稀释1:1000。

[1086] 实施例41: 2-[2-[4-[2-(3-羟基-6-氧代-呫吨-9-基)苯甲酰基]哌嗪-1-基]-2-氧代-乙氧基]乙酸的合成。

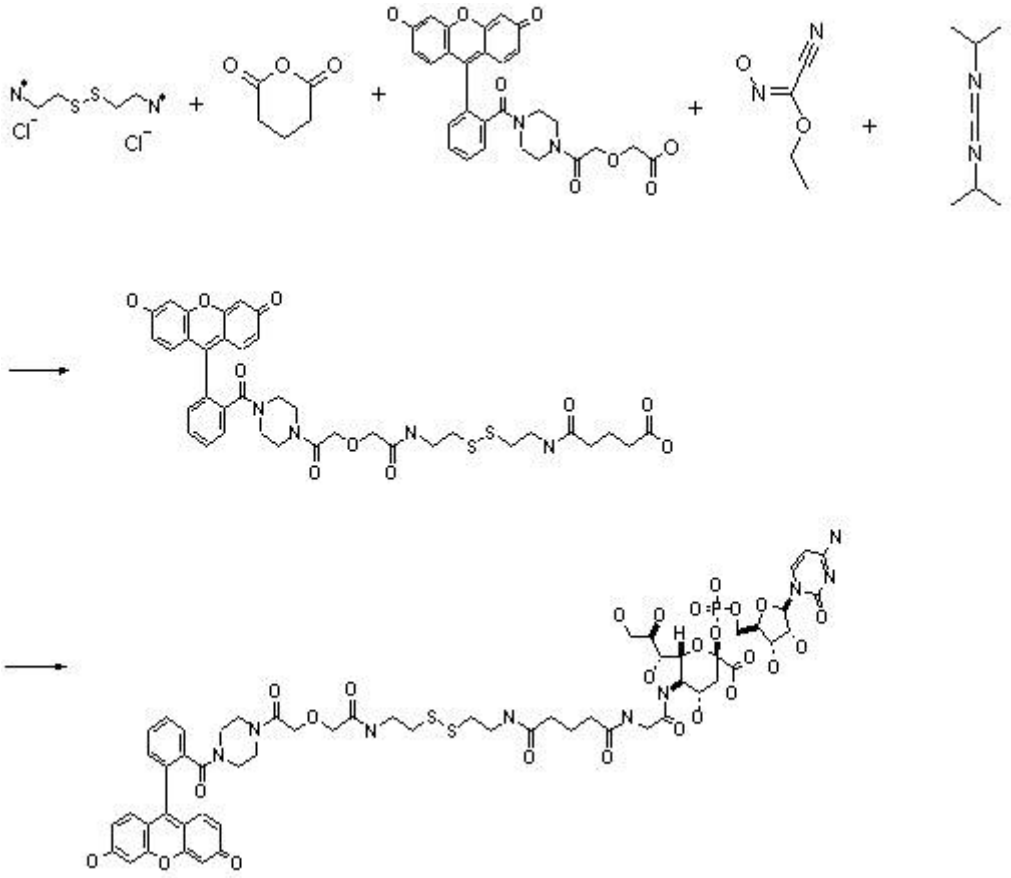
[1087] 

[1088]

名称	密度	Mw	摩尔	N	W	V
	[g/ml]	[g/mol]	比率	[mmol]	[g]	[ml]
1		436.899	1	121.31	53	
2		116.074	1	121.31	14.081	
产物: C28H24N2O8		516.512				

[1089] 将6-羟基-9-[2-(哌嗪-4-鎓-1-羰基)苯基]呫吨-3-酮 (按照以下文献所述来制备:Chang等人, *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, *129*, 8400)悬浮于碳酸氢钠饱和水溶液(50 ml)和四氢呋喃(50 ml)的混合物中。将混合物搅拌10分钟。加入二甘醇酐。3 h之后,加入额外的二甘醇酐(500 mg)。将混合物搅拌20 h。用发烟盐酸酸化混合物至pH 1。加入二氯甲烷(100 ml)和盐酸(1 M, 100 ml)。加入盐水(100 ml)和固体氯化钠。观察到大量固体。所述固体经过滤分离,用水洗涤并在真空下干燥数天。LC-MS: 517.1641 $[M+H]^+$。

[1090] 实施例42: 荧光胞苷基单磷酸神经氨酸衍生物, (2R, 5R, 6R)-2-[[(2R, 3S, 4R, 5R)-5-(4-氨基-2-氧代-嘧啶-1-基)-3, 4-二羟基-四氢呋喃-2-基]甲氧基-羟基-磷酰基]氧基-4-羟基-5-[[2-[[5-[2-[2-[[2-[2-[4-[2-(3-羟基-6-氧代-呫吨-9-基)苯甲酰基]哌嗪-1-基]-2-氧代-乙氧基]乙酰基]氨基]乙基二硫基(disulfanyl)]乙氨基]-5-氧代-戊酰基]氨基]乙酰基]氨基]-6-[(2R)-1,2,3-三羟基丙基]四氢吡喃-2-甲酸的合成。

[1091] 

[1092]

名称	密度	Mw	摩尔	n	W	V
	[g/ml]	[g/mol]	Ratio	[mmol]	[g]	[ml]
二盐酸半胱胺		225,204	1	8,881	2	
戊二酸酐		114,102	1	8,881	1,013	
荧光		516,512	0,218	1,936	1	
Oxyma Pure		114,105	0,3	2,664	0,304	
二异丙基碳二亚胺	0,815	126,203	0,5	4,44	0,56	0,688
产物:C37H40N4O10S2		764,88				
产物:C57H70N9O25PS2		1376,341				

[1093] 将二盐酸半胱胺溶解于1 M NaOH (aq.), 50 ml中。将溶液用DCM (5x30 ml)萃取。将合并的有机相干燥(Na_2SO_4)、过滤和真空浓缩。

[1094] 将所得二胺溶解于乙腈(30 ml)中。将乙腈中的酐溶液(30 ml)滴加到该溶液中。将所得混合物搅拌15分钟。让所形成的固体静置1 h。倾掉溶剂。

[1095] 将2-[2-[4-[2-(3-羟基-6-氧代-呫吨-9-基)苯甲酰基]哌嗪-1-基]-2-氧代-乙氧基]乙酸、Oxyma和DIC在DMF (25 ml)中混合。将混合物搅拌1 h。

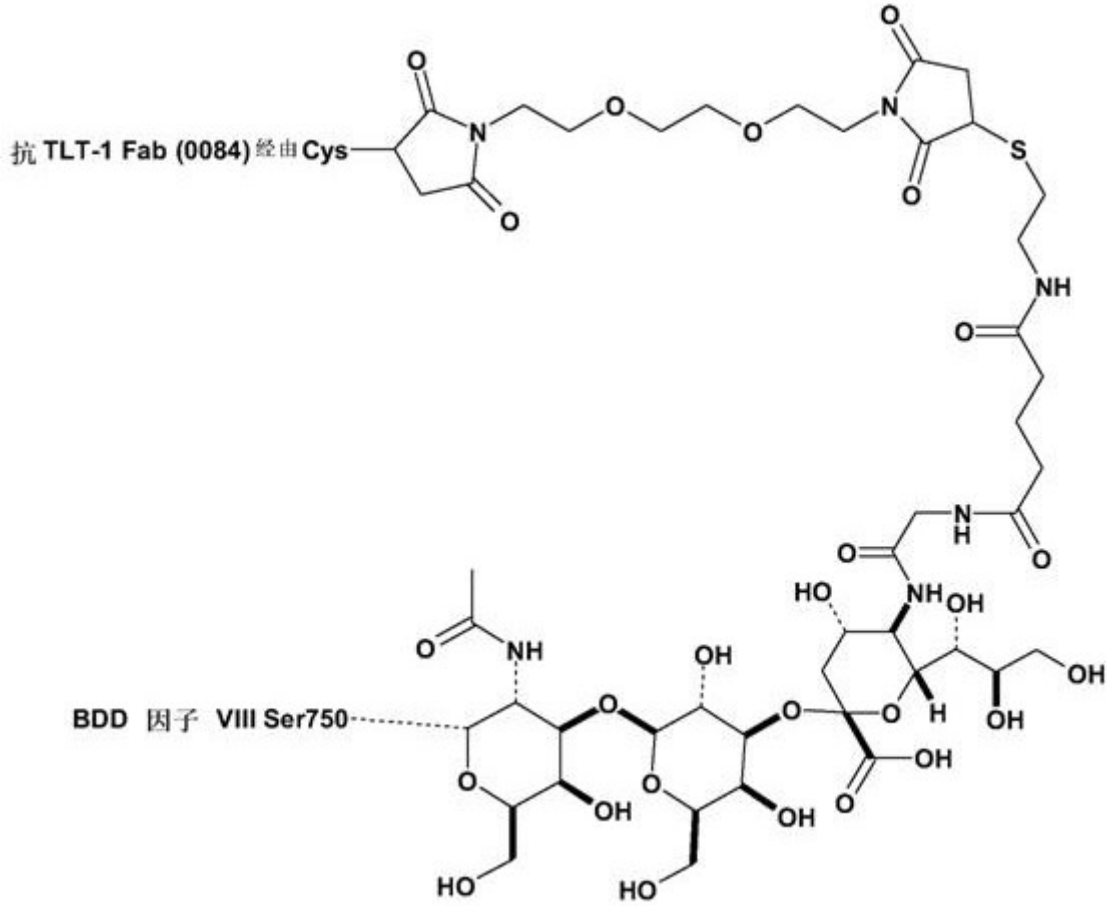
[1096] 将所形成的氨基酸溶解于碳酸氢钠饱和水溶液 (25 ml)中。将所得混合物搅拌过夜。加入DCM (50 ml)和氢氧化钠水溶液 (50 ml)。分离各相。有机相用氢氧化钠水溶液(3x50 ml)萃取。合并的水性萃取液通过加入盐酸(发烟)而酸化,引起大量沉淀。将混合物过滤。将分离的浆液重新溶解于DMF中并真空浓缩。

[1097] 将粗分离的化合物和Oxyma溶解于DMF (20 ml)中。加入DIC (1.5 ml)。将混合物

搅拌2 h。加入在碳酸氢钠饱和水溶液 (10 ml)中的GSC溶液。将混合物搅拌过夜。加入DCM (50 ml)。分离各相。有机相用碳酸氢钠饱和水溶液(2x5 ml)萃取。合并的水相用反相HPLC纯化(在水中的0-50% MeCN, 50 mM NH4HCO3, 5 cm柱)。LC-MS: 688.6752 $[M+H]^{2+}$。分析型HPLC和LC-MS表明化合物不纯。然而,就这样使用它。

[1098] 实施例43:抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)与FVIII, FVIII-Fab0247 (0084)的缀合

[1099]



[1100] 将在咪唑缓冲液(20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0,02%吐温80, 150 mM NaCl, 1 M甘油, pH 7,3)中的B-结构域缺失的因子VIII (turoctocog alpha, Novo Nordisk A/S, 1.92 ml, 4.2 mg/ml)和唾液酸酶(重组, 产脲节杆菌(*Arthrobactor Ureafaciens*)唾液酸酶, 3.2 U)混合并在环境温度放置1小时。样品用缓冲液稀释至25 ml。

[1101] 将溶液注射到预调节的monoQ柱(在缓冲液A中预调节, 5 ml柱体积)。

[1102] 缓冲液A: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7,3

[1103] 缓冲液B: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1M NaCl, 1 M 甘油, pH7, 3.

[1104] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (2 CV eq + 5 洗出的未结合样品 + 2 CV 0-20% B + 10 CV 20% B + 10 CV 100% B)梯度以1 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1105] 将分离的N,O-脱唾液酸BDD-FVIII (0.98mg/ml, 5 mg)与荧光胞苷基单磷酸神经氨酸衍生物和重组唾液酸转移酶 (His-ST3Gal1)混合。所得混合物在室温在黑暗处温育过

夜。

[1106] 样品用缓冲液A (20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3)稀释至40ml。

[1107] 将所得溶液注射到预调节的monoQ柱(在缓冲液A中预调节, 5 ml柱体积)。

[1108] 缓冲液A: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3。

[1109] 缓冲液B: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1M NaCl, 1 M 甘油, pH 7.3。

[1110] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (2 CV eq + 5 洗出的未结合样品 + 2 CV 0-20% B + 10 CV 20% B + 10 CV 100% B)梯度以1 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1111] 合并所选流分并与胞苷基单磷酸N-乙酰基神经氨酸和唾液酸转移酶(ST3GalIII)一起温育30分钟。将混合物用缓冲液A稀释至35 ml。

[1112] 将所得溶液注射到预调节的monoQ柱(在缓冲液A中预调节, 5 ml柱体积)。

[1113] 缓冲液A: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3。

[1114] 缓冲液B: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1M NaCl, 1 M 甘油, pH 7.3。

[1115] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (2 CV eq + 5 洗出的未结合样品 + 2 CV 0-20% B + 10 CV 20% B + 10 CV 100% B)梯度以1 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1116] 合并所选流分并通过SDS PAGE凝胶电泳 (4-12% Bis-Tris乙酸盐, 还原型和非还原型)评价。

[1117] 将分离的流分与含有三*(羧乙基)膦*, TCEP (20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25 mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3, 0.7 mM TCEP)的缓冲液(15 ml)混合。所得混合物温育20分钟。将所得溶液注射到预调节的monoQ柱(5/50 GL, 在含有TCEP的缓冲液A中预调节)。

[1118] 缓冲液A1: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3, 0.7 mM TCEP)。

[1119] 缓冲液A2: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 25mM NaCl, 1M 甘油, pH 7.3)。

[1120] 缓冲液B1: 20 mM咪唑, 10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80, 1 M NaCl, 1M 甘油, pH 7.3)。

[1121] 10 CV eq i A1, 5洗出的未结合样品i A1, 30CV在100% A1中, 10 CV在100% A2中, 15 CV 100% B1

[1122] 固定化的蛋白用缓冲液A1 (45 CV)洗涤,然后用缓冲液A2 (10 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (15 CV 100% B)以1 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1123] 合并所选流分并通过SDS-PAGE (Tris-乙酸盐)来分析。

[1124] 分离的因子VIII化合物用缓冲液A稀释并注射到预调节的monoQ柱(5/50 GL，在缓冲液A中预调节)。

[1125] 将含有4.8mM BM(PEG)2 (1,8-双马来酰亚胺基二甘醇，Pierce/Thermo scientific)的缓冲液A流维持100分钟。用以下方案洗涤和洗脱蛋白:10 CV A1，25CV在缓冲液A2 (双马来酰亚胺)中,以0.25ml/min(100min)，10CV缓冲液A1，10CV 100% B1。

[1126] 使用Amicon超速离心滤器装置MWCO 30kDa,对抗TLT-1抗体片段，0084进行缓冲液更换,更换为HEPES缓冲液(20mM HEPES + 1mM $CaCl_2$，100mM NaCl + 0.005%吐温80，pH: 7.50)。浓度测定为: 3.44mg/ml，2mg)：加入三(3-磺酸基苯基)膦水合物钠盐(Alfa Aesar，工业级85%)至所得浓度为12.5 mM。所得混合物在室温温育2 h。使用Amicon超速离心滤器装置MWCO 30kDa,对抗体片段进行缓冲液更换,更换为咪唑缓冲液(20 mM咪唑，10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80，25mM NaCl，1M 甘油，pH 7.3)。

[1127] 将因子VIII和抗体片段的溶液混合在一起并浓缩至2 ml. 所得溶液在室温温育过夜。

[1128] 将所得溶液注射到预调节的monoQ柱(在缓冲液A中预调节，5 ml柱体积)。

[1129] 缓冲液A: 20 mM咪唑，10 mM $CaCl_2$, 0.02%吐温80，25mM NaCl，1M 甘油，pH 7.3。

[1130] 缓冲液B: 20 mM咪唑，10 mM $CaCl_2$，0.02%吐温80，1M NaCl，1 M 甘油，pH 7.3。

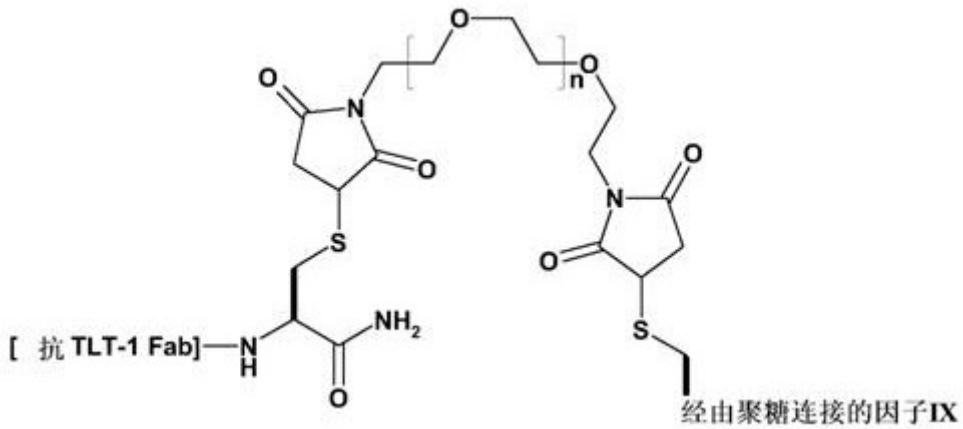
[1131] 固定化的蛋白用缓冲液A (5 CV)洗涤,使用Äkta净化器100色谱站。蛋白用缓冲液B (2 CV eq + 5 洗出的未结合样品 + 2 CV 0-20% B + 10 CV 20% B + 10 CV 100% B)梯度以1 ml/min洗脱。通过监测在280 nm处的吸光度对目标蛋白进行洗脱。

[1132] 合并所选流分并浓缩。将蛋白注射到预调节的Superdex 200 16/60 PG柱(在缓冲液A中预调节)。

[1133] 缓冲液A: 组氨酸(1.5g ，1.5 mg/ml)，CaCl2 * H2O (376 mg，0.37mg/ml)，NaCl (18g，18 mg/ml)，蔗糖(3g，3 mg/ml)，吐温80 (100mg，0.1mg/ml),用MQ稀释至1000 ml,调节至pH 7.0。

[1134] 根据SDS-PAGE和抗HPC4蛋白质印迹的分析,选择流分。

[1135] 实施例44:抗TLT-1-FAB片段(Fab0084)与FIX的缀合。

[1136] 

[1137] 将因子IX (50微升)、唾液酸转移酶3 (10微升)、荧光胞苷基单磷酸神经氨酸衍生

物(刮勺尖端)混合。将混合物在32摄氏度温育24小时。

[1138] 终浓度为:因子IX: 0.33 mg/ml, ST3Gal3: 0.08 mg/ml

[1139] 通过SDS-PAGE (荧光反应和考马斯蓝染色)来分析。

[1140] 将因子IX和抗体片段缀合在一起,使用本文所述的方法,即通过膦或谷胱甘肽介导的还原,偶联到接头实体上,并缀合,然后纯化和分析。

[1141] 实施例45: 在暂时血友病小鼠中,FVIIa-Fab9015在减少尾-出血中优于rFVIIa。

[1142] 通过给予单克隆FVIII-抗体,使人源化TLT-1敲出/敲入(KOKI)小鼠患上暂时血友病。在诱导尾-出血之前5分钟,小鼠用20、5或0.8 nmol/kg FVIIa-Fab9015 (3.625 ml/kg)、20 nmol/kg rFVIIa或溶媒进行预处理。通过从尾尖横切4 mm而诱导尾-出血,观察所导致的出血达30分钟。在尾-出血诱导之后的开始和30, 60和120分钟获取血小板计数。

[1143] 为了能够显示FVIIa-Fab9015的优越性,我们使用一剂rFVIIa (20 nmol/kg ~ 1 mg/kg),其预计对出血没有明显效应。

[1144] TLT-1-FAb-FVIIa在20和5 nmol/kg剂量-依赖性地减少了血损失并降低出血时间,达到统计显著性。而且20 nmol/kg FVIIa-Fab9015与20 nmol/kg rFVIIa相比明显更有效(图15)。

[1145] 在任何处理组中,在2小时处理之内,在血小板计数方面没有观察到明显变化(图16)。

[1146] 总之,在TLT-1 KOKI小鼠中,FVIIa-Fab9015在减少血友病的尾-出血方面优于rFVIIa。未观察到不良作用的迹象,例如血小板计数下降。

[1147] 实施例46: 在A型血友病样条件下,通过结合到表面表达的TLT-1而将rFVIIa定位到活化的血小板的表面,增加了凝血酶的产生。

[1148] 在凝血酶的产生测定中测试了 FVIIa-Fab9015。简而言之,通过将柠檬酸盐化的人全血在220*g*离心20 min,得到富含人血小板的血浆(PRP)。收集含有血小板的上面相,其余样品在2500*g*离心10 min,得到贫血小板的血浆(PPP),用于将所用的血小板浓度调节至终浓度150000 plts/μl。通过与绵羊抗人FVIII多克隆抗体(0.1 mg/ml) (HTI #Z0429)一起温育30 min,使PRP具有血友病。用蛋白酶活化的受体-1活化肽(SFLLRN;Bachem #H-2936)或者所述肽和GPVI活化的蛇毒Convulxin (Pentapharm #119-02)的组合,活化血小板。使用来自Thrombinooscope ® 的荧光方法测定所产生的凝血酶。将PRP、FluCa 试剂和化合物混合并加入到96-孔Nunc微孔圆底孔板中。通过加入血小板活化剂开始反应,并在ThermoFisher Fluoroskan读板器(Fisher Scientific)中测定来自底物的荧光信号。使用Thrombinoscope提供的凝血酶校准物,按照其说明书,计算凝血酶浓度。

[1149] 结果显示出与rFVIIa相比,FVIIa-Fab9015的增加的效能(图17A)。而且结果还揭示出这种效能的增加依赖于血小板的活化期。图18 显示了当用SFLLRN (10μM)活化血小板时的增加的凝血酶产生能力和当用SFLLRN (30μM)和Convulxin (100ng/ml)的组合来活化血小板时达到完全的潜力。当用活化剂FVIIa-Fab9015的这种组合来活化血小板时,显示出大约4倍的增加的效能,测定为峰凝血酶的产生,与用2个测试浓度(5和25 nM)的rFVIIa相比(分别在图17A和17B)。在凝血酶产生能力上的这种增加完全取决于FVIIa-Fab9015结合到活化的血小板的表面上的TLT-1,因为与可溶性TLT-1的预先温育完全逆转这种增加(图19)。

[1150] 实施例47: 在B型血友病样条件下,通过结合到表面表达的TLT-1而将rFIX定位到活化的血小板的表面,增加了凝血酶的产生。

[1151] 在凝血酶的产生测定中测试了FIX-Fab0155并与rFIX (Benefix®)相比。人血小板分离自新鲜的柠檬酸盐稳定的全血。将1份ACD-溶液(2.5%柠檬酸三钠, 1.5%柠檬酸和2% D-葡萄糖)加入到5份血中,然后在220*g*离心20 min,得到富含血小板的血浆。收集上面相并转移至新的锥形管中并在500*g*离心15 min。去除血浆,将沉淀物溶解于补充有前列腺素E1 (5 μg/ml)的Hepes-缓冲液(10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.7 mM MgCl2, 5 mM D-葡萄糖, 0.4 mM NaH_2PO_4;pH 6.5)中。在500*g*第二次离心15 min之后,弃去上清液并将洗涤的血小板溶于因子IX缺陷型血浆(Geroge King Bio-medical, Inc.)中并将血小板浓度调整到300000 plts/μl。在凝血酶的产生测定中,当将激动剂,因子IX变体和FluCa 试剂(Thrombinoscope®)加入到96-孔Nunc微孔圆底孔板中,连同含有血小板的因子IX缺陷型血浆一起时,最终血小板浓度为150000 plts/μl。用蛋白酶活化的受体-1活化肽(SFLLRN;Bachem #H-2936)和GPVI活化的蛇毒Convulxin (Pentapharm #119-02)的组合,活化血小板。通过来自Thrombinooscope®的荧光方法测定所产生的凝血酶,其中在ThermoFisher Fluoroskan 读板器(Fisher Scientific)中检测来自凝血酶裂解的底物的荧光信号。使用Thrombinoscope®提供的凝血酶校准物,按照其说明书,计算凝血酶浓度。

[1152] 结果显示出与rFIX相比,1 nM FIX-Fab0155的增加的效能(图20),当用SFLLRN (30μM)和Convulxin (100ng/ml)的组合活化血小板时。而且结果还揭示出这种效能的增加依赖于血小板上TLT-1的表达,因为可溶性TLT-1 (100 nM)拮抗了这种增加效应。

[1153] 实施例48:野生型FVIIa (SEQ ID NO: 156)、FVIIa 407C (SEQ ID NO: 181)和FVIIa-Fab5001 (SEQ ID NO: 180)的纯化和表征。

[1154] 使用基于抗FVIIa F1A2-琼脂糖4B树脂的捕获亲和色谱方法,进行FVIIa蛋白的纯化,所述树脂是Novo Nordisk开发的具有偶联抗体的树脂(基础亲和凝胶,来自GE Healthcare)),其特异性结合到FVIIa Gla结构域(有关细节详见参考文献Jurlander B, Thim L, Klausen NK, Persson E, Kjalke M, Rexen P, Jørgensen TB, Østergaard PB, Erhardtsen E, Bjørn SE (2001) Recombinant activated factor VII (rFVIIa): characterization, manufacturing, and clinical development. Semin Thromb Hemost. 27:373-84)。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare, 目录号18-1112-41)进行纯化。纯化步骤所用的缓冲液系统是:由10 mM 组氨酸, pH 6.0, 5 mM $CaCl_2$, 25 mM NaCl和0.01% (v/v)吐温-80组成的平衡缓冲液,由10 mM 组氨酸, pH 6.0, 5 mM $CaCl_2$, 1.0 M NaCl和0.01% (v/v)吐温-80组成的洗涤缓冲液,和由50 mM 组氨酸, pH 6.0, 15 mM EDTA组成的洗脱缓冲液。将细胞上清液用5 mM $CaCl_2$ 终浓度调整并施用到预先平衡的抗HPC4柱上。该柱用5-10柱体积的平衡缓冲液、5-10柱体积的洗涤缓冲液和最后用5-10柱体积的平衡缓冲液洗涤。FVIIa蛋白在大约 5柱体积的洗脱缓冲液中等度洗脱。

[1155] 对具有低纯度FVIIa变体(< 90%,根据在Agilent 1100/2100系统上建立的SEC-HPLC 方法和使用TSK G3000SW_{XL}柱(来自Tosho)和PBS运行缓冲液)的捕获洗出液进行进一步纯化,使用1) 基于Poros HQ50 树脂(来自Applied Biosystems)的阴离子交换色谱(AIEC)和2) 制备型凝胶过滤,使用预装的Superdex200柱(来自GE Healthcare)。

[1156] 用于AIEC 纯化步骤的缓冲液系统是:由10 mM Hepes, pH 5.9和150 mM NaCl组

成的平衡缓冲液，由10 mM Hepes, pH 5.9和50 mM NaCl组成的洗涤缓冲液，和由10 mM Hepes, pH 5.9, 50 NaCl和30 mM $CaCl_2$组成的洗脱缓冲液。将捕获洗出液1:6 (v:v)稀释，然后将其施用到预平衡的Poros HQ50柱上。该柱用5-10柱体积的平衡缓冲液和5-10柱体积的洗涤缓冲液洗涤，然后在大约 2-5柱体积的洗脱缓冲液中等度洗脱FVIIa蛋白。

[1157] 用于凝胶过滤步骤的缓冲液系统是由10 mM 组氨酸, pH 6.0, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl和0.01%吐温80组成的运行缓冲液。收集FVIIa蛋白，为不对称峰，在大约0.02-0.08柱体积中。

[1158] 使用由偶联到活化的CNBr-琼脂糖4 FF珠(来自GE Healthcare)上的血浆衍生的FXa (来自酶 Research Lab.)组成的树脂，对纯化的FVIIa制备物进行活化。

[1159] 使用SDS-PAGE/考马斯分析FVIIa蛋白并使用在Agilent 6210仪器和脱盐柱MassPREP (来自Waters)上建立的液相色谱电喷雾电离飞行时间质谱方法进行完整分子量测定，使用由在LC-MS级的H2O中的0.1%甲酸组成的平衡缓冲液和由在LC-MS级的ACN中的0.1%甲酸组成的洗脱缓冲液。所有所纯化的FVIIa变体和野生型展示出完整分子量~50 kDa。根据完整质量SDS-PAGE/考马斯和LC-MS分析，使用还原性条件，对FVIIa-Fab5001融合物进行链鉴定。

[1160] 根据SEC-HPLC分析，所有FVIIa制备物都展示纯度为>90-99%并显示出高度均质性。

[1161] 实施例49: FVII-Fab5001的自活化，在可溶性组织因子存在下使用蛋白水解测定。

[1162] 自活化被测定为在可溶性组织因子(sTF)存在下，活化FX的能力。将所述蛋白稀释在50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 10 mM $CaCl_2$, 1 mg/mL BSA和0.1% (w/v) PEG8000中。通过将5 pM FVII-Fab5001 (n=2)与 100 nM sTF和25 μM PC:PS磷脂(Haematologic technologies)预温育10 min，测定FX活化的动力学参数。然后在96孔板中加入30 nM FX，总反应体积100 μL，让反应物在室温温育20 min。温育之后，通过加入50 μL终止缓冲液(50 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 80 mM EDTA)，然后加入50 μL 2 mM S-2765，猝灭反应。最终，在Spectramax 190微量板读板器上，在405 nM处，测量吸光度的增加。通过将数据拟合到米氏方程的修改形式($[S] < K_m$)，使用线性回归，测定k_{cat}/K_m值。根据FXa 标准曲线估计所产生的FXa的量。

[1163] 与wtFVIIa的相比，酶原融合蛋白FVII-Fab5001显示出38%蛋白水解活性，这是该蛋白在sTF存在下自活化的结果，参见图21)。

[1164] 实施例50:抗TLT-1抗体mAb0023、mAb0051、mAb0061和mAb0062的抗聚集效应的缺乏。

[1165] 在富含人血小板的血浆(PRP)中测定抗TLT-1抗体的抗聚集效应。通过肝素稳定的人全血的在200*g* 离心15 min，得到PRP。收集含有血小板的上面相，其余样品在1500*g*离心10 min，得到贫血小板的血浆(PPP)，其在聚集测定中用作参考样品。在血小板聚集分析器(Platelet Aggregation Profiler) (PAP-8)仪器(Bio/Data Corporation, Horsham, PA)中将PRP在37°C温育 3 min。记录稳定的基线，然后向PRP中加入抗TLT-1抗体(10 nM)或无关对照抗体(10 nM)。加入所述抗体与蛋白酶活化的受体-1 (PAR-1)活化的肽SFLLRN (1或10 μM) (Bachem)之后，将血小板活化3 min。

[1166] 结果显示所述抗体(10 nM) (mAb0023、mAb0051、mAb0061和mAb0062)与无关对照抗体相比,没有抑制效应。使用高(10 μM)或中(1 μM) 浓度的SFLLRN都可引发血小板聚集。数据显示所述抗体在两种SFLLRN浓度时都不抑制聚集。总之,这些数据表明所述抗体既不诱导、也不抑制测定为聚集的血小板功能。

[1167] 实施例51. 在来自正常供体的人全血(HWB)中,经血栓弹力描记术(TEG)测定的FIX-mAb0145对TF-诱导的纤维蛋白血块形成的效应。

[1168] 从正常供体中取出柠檬酸盐化-稳定的人全血(HWB)。通过将HWB与10 μg/ml抗FVIII抗体(绵羊抗人因子VIII;Hematologic Technologies Inc)在室温温育30 min,得到血友病样条件。通过血栓弹力描记术(5000系列TEG分析仪, Haemoscope Corporation, Niles, IL, USA),测定血块形成。将不同浓度(0;0.2;1.0;5.0和10 nM) FIX-mAb0145或(0;0.2;5.0和10 nM) rFIX (Novo Nordisk A/S)加入"血友病-样"柠檬酸盐化的HWB中。当将340 μl正常的或"血友病样"的HWB转移至装有20 μl 0.2 M $CaCl_2$和0.03 pM脂质化的TF (Innovin®, Dade Behring GmbH (Marburg, 德国)的血栓弹性描记器杯中时,开始凝血。连续跟踪TEG迹线多达120 min。记录下述TEG变量:R时间(凝血时间,即从开始凝血直到得到2 mm振幅的时间)、α-角(测量为R值和TEG迹线的拐点之间的角的血块发展)、K (达到某一水平的血块强度的凝血动力学速度,振幅= 20 mm)和MA (TEG迹线的最大振幅,其反映了血块的最大机械强度)。图23显示出从各TEG迹线而测定的R时间值。

[1169] 图23中显示了得自补充有不同浓度FIX-mAb0145或rFIX的正常HWB和"血友病"血的TEG迹线的R时间。来自正常供体的HWB显示R时间为980秒,当通过加入FVIII中和抗体而使血液变为"血友病样"时,其延长至5475秒。FIX-mAb0145以浓度依赖性方式缩短R时间凝血,相比之下,rFIX当以等同浓度加入作为对照时没有明显效应。所有数据都得自一个代表性的供体。

[1170] 观察到FIX-mAb0145以浓度依赖性方式使"血友病样 HWB"的凝血标准化。因此,令人吃惊的是,结果显示rFIX与针对TLT-1的抗体(其将rFIX靶向活化的血小板的表面)的缀合,使它具有FVIII-非依赖性旁路活性,导致改进的促凝血活性。

[1171] 实施例52. 在A型血友病样条件下,通过结合到表面表达的TLT-1而将rFVIIa定位到活化的血小板的表面,增加了凝血酶的产生

[1172] 在凝血酶的产生测定中测试了25 nM的FVIIa-Fab9015、FVIIa-Fab1029和FVIIa-Fab1001。简而言之,通过将柠檬酸盐化的人全血在220*g*离心20 min,得到富含人血小板的血浆(PRP)。收集含有血小板的上面相,其余样品在2500*g*离心10 min,得到贫血小板的血浆(PPP),用于将血小板浓度调节至终浓度150000 plts/μl。通过与绵羊抗人FVIII多克隆抗体(0.1 mg/ml) (HTI #Z0429)一起温育30 min,使PRP具有血友病。用蛋白酶活化的受体-1 (PAR-1)活化肽(30 μM) (SFLLRN;Bachem #H-2936)和GPVI活化的蛇毒Convulxin (100 ng/ml) (Pentapharm #119-02)的组合,活化血小板。使用来自Thrombinooscope® 的荧光方法测定所产生的凝血酶,其中将PRP、FluCa 试剂和试验化合物混合并加入到96-孔Nunc微孔圆底孔板(Nunc #268152)中。通过加入血小板活化剂开始反应,并在ThermoFisher Fluoroskan 读板器(Fisher Scientific)中检测来自底物的荧光信号。使用Thrombinoscope® 提供的凝血酶校准物,按照其说明书,计算凝血酶浓度。

[1173] 结果显示出与rFVIIa相比,所有3种蛋白FVIIa-Fab9015、FVIIa-Fab1029和FVIIa-

Fab1001的增加的效能。与rFVIIa (25 nM)相比，FVIIa-Fab9015和FVIIa-Fab1001 (25 nM)显示大约4倍的增加的效能，而FVIIa-Fab1029 (25 nM)具有大约2倍的增加的效能(测定为峰凝血酶的产生) (图24)。

[1174] 实施例53.重组表达的FIX (SEQ ID 161)、FIX-抗TLT-1 Fab和Mab融合蛋白(FIX-Fab0155和FIX-Mab0145)的纯化和表征。

[1175] 使用基于抗FIX A3B6-琼脂糖4 FF树脂的捕获亲和色谱方法，进行所述FIX蛋白的纯化，所述树脂是Novo Nordisk开发的具有偶联抗体的树脂(基础亲和凝胶，来自GE Healthcare))，其特异性结合到FIX Gla结构域(参见参考文献Østergaard等人(2011), Blood 118: 2333-41)。使用ÄktaExplorer色谱系统(GE Healthcare, 目录号18-1112-41)进行纯化。纯化步骤所用的缓冲液系统是：由20 mM Tris, 1 mM $CaCl_2$, 100 mM NaCl, 0.01% (v/v)吐温80 (pH 7.5)组成的平衡缓冲液，由20 mM Tris, 1 mM $CaCl_2$, 2.0 M NaCl, 0.01% (v/v)吐温80 (pH 7.5)组成的洗涤缓冲液，和由20 mM Tris, 20 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0.01% (v/v)吐温80 (pH 7.5)组成的洗脱缓冲液。将细胞上清液用5 mM $CaCl_2$ 终浓度调整并施用到预先平衡的A3B6-Seph 4 FF柱上。该柱用5-10柱体积的平衡缓冲液、5-10柱体积的洗涤缓冲液和最后用5-10柱体积的平衡缓冲液洗涤。FIX融合蛋白在大约 5柱体积的洗脱缓冲液中等度洗脱。

[1176] 使用SDS-PAGE/考马斯分析FIX蛋白并使用在Agilent 6210仪器和脱盐柱MassPREP (来自Waters)上建立的液相色谱电喷雾电离飞行时间质谱方法进行完整分子量测定，使用由在LC-MS级的H2O中的0.1%甲酸组成的平衡缓冲液和由在LC-MS级的ACN中的0.1%甲酸组成的洗脱缓冲液。根据完整质量SDS-PAGE/考马斯和LC-MS分析，使用还原性条件，对FIX蛋白进行链鉴定。根据SEC-HPLC分析，所有FIX融合蛋白制备物都展示纯度为>85-99%并显示出高度均质性。

[1177] 实施例54. FVIIa 野生型(SEQ ID NO: 157)和FVIIa-407C (SEQ ID NO:181)的重组表达产生。

[1178] 按照专利02/077218和Jurlander等人(2001), Semin Thromb Hemost. 27:373-84所述，产生所述变体和野生型FVIIa。更具体地讲，FVIIa分子表达在贴壁BHK细胞系中。所用的生长培养基是DMEM/F12培养基变体，其含有5 mg/L 维生素K1和10%胎牛血清(在生产期间为2%)。简而言之，细胞在通风的T-175瓶中繁殖，2-层和10-层细胞工厂在37°C和5% CO2中温育。在汇合时，使用TrypLE™ Express (GIBCO 目录号12604-013)离解细胞，然后传给下一步骤。在具有微载体的15 L生物反应器(5 g/L, Cytodex 3, GE Life Sciences)中以重复分批培养完成生长阶段。通过加入CO2控制pH上限为7.2并通过加入Na_2CO_3控制下限为6.8。通过氧气鼓泡，将溶解氧浓度保持在大于50%空气饱和度。温度维持在36.5°C。在50-70 rpm搅拌。进行收获/培养基更换，以维持谷氨酰胺浓度大于1 mM。在培养基更换之前1小时，停止搅拌，让微载体(粘附有细胞)沉降到反应器底部。然后，收获大约80%的体积，再用新鲜培养基填充至100%工作体积。取出细胞收获物并通过由2个一次性胶囊滤器组成的滤器系列(filter train) (3 μm Clarigard, Opticap XL10, Millipore, 目录号K030A10HH1;0.22 μm Durapore, Opticap XL10, Millipore, 目录号KVGLS10HH1)将其澄清，然后纯化。

[1179] 实施例55.在A型血友病样条件下，通过结合到表面表达的TLT-1而将rFVIIa定位

到活化的血小板的表面，增加了凝血酶的产生。

[1180] 在凝血酶的产生测定中测试了FVIIa-Fab5001并与含有洗涤的人血小板的因子VIII缺陷型血浆中的rFVIIa比较。为了分离人血小板，将1份ACD-溶液(2.5%柠檬酸三钠，1.5%柠檬酸和2%D-葡萄糖)加入到5份血中，然后在220*g*离心20 min，得到富含血小板的血浆。收集上面相并转移至新的锥形管中并在500*g*离心15 min。去除血浆，将沉淀物溶解于补充有前列腺素E1 (5 μg/ml)的Hepes-缓冲液(10 mM Hepes, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.7 mM MgCl2, 5 mM D-葡萄糖, 0.4 mM NaH_2PO_4;pH 6.5)中。在500*g*第二次离心15 min之后，弃去上清液并将洗涤的血小板溶入因子VIII缺陷型血浆(Geroge King Bio-medical, Inc.)中并将血小板浓度调整到300000 plts/μl。在凝血酶的产生测定中，当将激动剂、因子IX变体和FluCa 试剂(Thrombinoscope®)加入到96-孔Nunc微孔圆底孔板中，连同含有血小板的因子IX缺陷型血浆一起时，最终血小板浓度为150000 plts/μl。用蛋白酶活化的受体-1活化肽(SFLLRN;Bachem #H-2936)和GPVI活化的蛇毒Convulxin (Pentapharm #119-02)的组合，活化血小板。通过来自Thrombinooscope®的荧光方法测定所产生的凝血酶，其中在ThermoFisher Fluoroskan读板器(Fisher Scientific)中检测来自凝血酶裂解的底物的荧光信号。使用Thrombinoscope®提供的凝血酶校准物，按照其说明书，计算凝血酶浓度。

[1181] 结果显示出与野生型rFVIIa相比，FVIIa-Fab5001的增加的效能(图25)。而且结果还揭示出这种效能的增加依赖于血小板活化。用SFLLRN (30μM)和Convulxin (100ng/ml)组合来活化血小板，FVIIa-Fab5001 (25 nM)显示出与野生型rFVIIa (25 nM)相比大约4倍的增加的效能(测定为峰凝血酶的产生)。

[1182] 实施例56. FVIIa-Fab1001和FVIIa-Fab5001结合到TLT1上的SPR-分析。

[1183] FVIIa-Fab1001结合到TLT1上的SPR-分析。通过SPR分析，在Biacore T200仪器中，测定FVIIa-Fab1001结合TLT-1。

[1184] 使用的材料如表18所示。

[1185] *表18*

[1186]

试剂	来源
His标记的人TLT1	实施例1
FVIIa-Fab1001	实施例39
抗6X his mAb	R&D #MAB050 0.5 mg/ml在PBS中
所有其它试剂	Biacore GE Healthcare

[1187] 方法: 使用供应商推荐的标准程序，将抗6Xhis抗体以约9000 RU的水平固定化在CM5芯片上(0.5 mg/ml，在乙酸钠中稀释，pH 5.0)。浓度为100 ng/ml的人his-标记的TLT-1用作配体。FVIIa-Fab1001的2倍稀释液(从29.29 nM至0.45 nM)用作分析物。运行和稀释缓冲液由以下制备:10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% p20, pH 7.4。通过3 M $MgCl_2$，获得再生。实验在25摄氏度进行。使用Biacore T200评价软件，假定TLT1和FVIIa-Fab1001的1:1相互作用，得到动力学常数和结合常数(k_{on}、k_{off}、K_D)的测定(表19)。

[1188] *表19:FVIIa-Fab1001结合到TLT-1上*

[1189]

	Ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FVIIa-Fab1001结合到TLT-1上	8.01E+05	3.19E-03	3.99E-09

[1190] 结论: 通过SPR-分析估计FVIIa-Fab1001结合到TLT-1上的结合常数并证实结合到TLT-1上。

[1191] FVIIa-Fab5001结合到TLT1上的SPR-分析。通过SPR分析,在Biacore T200仪器中,测定FVIIa-Fab5001结合TLT-1。

[1192] 所用材料见下表20。

[1193] *表20*

[1194]

试剂	来源
His标记的人TLT1	实施例1
FVIIa-Fab5001	实施例48
抗6X his mAb	R&D #MAB050 0.5 mg/ml在PBS中
所有其它试剂	Biacore GE Healthcare

[1195] 方法: 使用供应商推荐的标准程序,将抗6Xhis抗体以约9000 RU的水平固定化在CM5芯片上(0.5 mg/ml,在乙酸钠中稀释,pH 5.0)。浓度为100 ng/ml的人his-标记的TLT-1用作配体。FVIIa-Fab5001的2倍稀释液(从15.77 nM至0.49 nM)用作分析物。运行和稀释缓冲液由以下制备:10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% p20, pH 7.4。通过3 M $MgCl_2$,获得再生。实验在25摄氏度进行。使用Biacore T200评价软件,假定TLT1和FVII-fab的1:1 相互作用,得到动力学常数和结合常数(k_{on}、k_{off}、K_D)的测定(表21)。

[1196] 表21: FVIIa-Fab5001结合到TLT-1上

[1197]

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
FVIIa-Fab5001结合到TLT-1上	2.384E+05	0.001696	7.11E-09

[1198] 结论: 通过SPR-分析估计FVIIa-Fab5001结合到TLT-1上的结合常数并证实结合到TLT-1上。

[1199] 实施例57:人FVIII的重组产生。

[1200] 本文所用的人因子VIII变体的产生已经描述于专利号WO2009108806,实施例1。

CPCH1362253P 序 列 表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 凝血因子向活化的血小板的靶向

<130> 8314.204-WO

<160> 182

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 933
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1

[0001]

atgggcctca ccctgctctt gctgctgctc ctgggactag aaggtcaggg catagttggc 60

agcctccctg aggtgctgca ggcacccgtg ggaagctcca ttctggtgca gtgccactac 120

aggctccagg atgtcaaagc tcagaaggtg tggtgccggt tcttgccgga ggggtgccag 180

cccctggtgt cctcagctgt ggatcgcaga gctccagcgg gcaggcgtac gtttctcaca 240

gacctgggtg ggggcctgct gcaggtggaa atggttaccc tgcaggaaga ggatgctggc 300

gagtatggct gcatggtgga tggggccagg gggccccaga ttttgcacag agtctctctg 360

aacatactgc ccccagagga agaagaagag acccataaga ttggcagtct ggctgagaac 420

gcattctcag accctgcagg cagtgccaac cctttggaac ccagccagga tgagaagagc 480

atccccttga tctggggtgc tgtgctcctg gtaggtctgc tggtggcagc ggtggtgctg 540

tttgctgtga tggccaagag gaaacaaggg aacaggcttg gtgtctgtgg ccgattcctg 600

agcagcagag tttcaggcat gaatccctcc tcagtggtcc accacgtcag tgactctgga 660

ccggctgctg aattgccttt ggatgtacca cacattaggc ttgactcacc accttcattt 720

gacaatacca cctacaccag cctacctctt gattccccat caggaaaacc ttcactccca 780

gctccatcct cattgccccc tctacctcct aaggtcctgg tctgctccaa gcctgtgaca 840

tatgccacag taatcttccc gggagggaac aagggtggag ggacctcgtg tgggccagcc 900

cagaatccac ctaacaatca gactccatcc agc 933

<210> 2
<211> 311
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15

[0002]

Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser
20 25 30

Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln
35 40 45

Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser
50 55 60

Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr
65 70 75 80

Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu
85 90 95

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro
100 105 110

Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu
115 120 125

Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp
130 135 140

Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser
145 150 155 160

Ile Pro Leu Ile Trp Gly Ala Val Leu Leu Val Gly Leu Leu Val Ala
165 170 175

Ala Val Val Leu Phe Ala Val Met Ala Lys Arg Lys Gln Gly Asn Arg
180 185 190

[0003] Leu Gly Val Cys Gly Arg Phe Leu Ser Ser Arg Val Ser Gly Met Asn
195 200 205

Pro Ser Ser Val Val His His Val Ser Asp Ser Gly Pro Ala Ala Glu
210 215 220

Leu Pro Leu Asp Val Pro His Ile Arg Leu Asp Ser Pro Pro Ser Phe
225 230 235 240

Asp Asn Thr Thr Tyr Thr Ser Leu Pro Leu Asp Ser Pro Ser Gly Lys
245 250 255

Pro Ser Leu Pro Ala Pro Ser Ser Leu Pro Pro Leu Pro Pro Lys Val
260 265 270

Leu Val Cys Ser Lys Pro Val Thr Tyr Ala Thr Val Ile Phe Pro Gly
275 280 285

Gly Asn Lys Gly Gly Gly Thr Ser Cys Gly Pro Ala Gln Asn Pro Pro
290 295 300

Asn Asn Gln Thr Pro Ser Ser
305 310

<210> 3
<211> 528
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1-His6 的胞外域"

<400> 3
aagcttgccg ccaccatggg cctcaccctg ctcttgctgc tgctcctggg actagaaggt 60

cagggcatag ttggcagcct ccctgaggtg ctgcaggcac ccgtgggaag ctccattctg 120

[0004] gtgcagtgcc actacaggct ccaggatgtc aaagctcaga aggtgtggtg ccggttcttg 180

ccggaggggt gccagcccct ggtgtcctca gctgtggatc gcagagctcc ggcgggcagg 240

cgtacgtttc tcacagacct gggtgggggc ctgctgcagg tggaaatggt taccctgcag 300

gaagaggatg ctggcgagta tggctgcatg gtggatgggg ccaggggccc ccagattttg 360

cacagagtct ctctgaacat actgccccca gaggaagaag aagagaccca taagattggc 420

agtctggctg agaacgcatt ctcagaccct gcaggcagtg ccaacccttt ggaacccagc 480

caggatgaga agagcatccc ccaccatcac catcaccatt aagaattc 528

<210> 4
<211> 168
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1-His6 的胞外域"

<400> 4

Met Gly Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Leu Glu Gly Gln
1 5 10 15

Gly Ile Val Gly Ser Leu Pro Glu Val Leu Gln Ala Pro Val Gly Ser
20 25 30

Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln
35 40 45

Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser
50 55 60

Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr
65 70 75 80

[0005]

Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu
85 90 95

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro
100 105 110

Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu
115 120 125

Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp
130 135 140

Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser
145 150 155 160

Ile Pro His His His His His His
165

<210> 5
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1.20-125"

<400> 5

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

Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln Lys Val Trp
20 25 30

Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser Ser Ala Val
35 40 45

[0006]

Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr Asp Leu Gly
50 55 60

Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu Glu Asp Ala
65 70 75 80

Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro Gln Ile Leu
85 90 95

His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro
100 105

<210> 6
<211> 147
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1.16-162"

<400> 6

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

Ser Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala
20 25 30

Gln Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val
35 40 45

Ser Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu
50 55 60

[0007] Thr Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln
65 70 75 80

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

Pro Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu
100 105 110

Glu Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser
115 120 125

Asp Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys
130 135 140

Ser Ile Pro
145

<210> 7
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1.126-162"

<400> 7

Glu Glu Glu Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala
1 5 10 15

Phe Ser Asp Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp
20 25 30

Glu Lys Ser Ile Pro
35

[0008]

<210> 8
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1.129-142"

<400> 8

Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe
1 5 10

<210> 9
<211> 396
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9

atgaagttgc ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattggtgc 180

ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgt 396

<210> 10
<211> 132
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

[0009]

Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg
130

<210> 11
<211> 396
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11

[0010]

atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 396

<210> 12
<211> 132
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

[0011]

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

Thr Val Ser Ala
130

<210> 13
<211> 1377
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0012 HC"

<400> 13
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc atgcccacca 720

[0012]

tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 780

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 840

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 900

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 1020

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1080

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1260

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1377

<210> 14
<211> 714
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0012 LC, Fab 0012 LC"

<400> 14
atgaagttgc ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattggtgc 180

ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360

[0013]

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 714

<210> 15
<211> 1401
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0023 HC"

<400> 15

[0014]

atgaacttgg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60

gtgaggctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac tatttcatgt attggattcg ccagactcca 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtaatggtg gtgatagcag ctcttatcca 240

gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt attgtgcaac aaataaaaac 360

tgggacgatt actatgatat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 420

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720

aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380

ctctccctgt ctctgggtaa a 1401

<210> 16
<211> 717
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0023 LC"

<400> 16
atggattcac aggcccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg ttcctgtggg 60

gacattgtgg tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 120

atgagttgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct 180

tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 240

[0015]

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360

ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacgta cggtggctgc accatctgtc 420

ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480

ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa 540

tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600

agcagcaccc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgcctgcgaa 660

gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt 717

<210> 17
<211> 1401
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0051 HC"

<400> 17

atgggttgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag 60

gtccagctgg agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggtctcagt gaagatttcc 120

tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tattctatgc actgggtgaa gcagagtcat 180

gcaaagagtc tagagtggat tggagttatt agtacttact atggtgatgt taggtacaac 240

cagaagttca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg 300

gcacttgcca gactgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag agcccctatg 360

attacgacag gggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

[0016]

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720

aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 780

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 840

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 900

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 960

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 1020

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 1140

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 1200

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 1320

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 1380

ctctccctgt ctctgggtaa a 1401

<210> 18
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0051 LC"

<400> 18
atgaagtcac agacccaggt cttcgtattt ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60

[0017] agtattgtga tgacccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagggttacc 120

ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 180

gggcagtctc ctaaactgct gataaactat gcatccagtc gctacactgg aatccctgat 240

cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagcac tgtgcaggct 300

gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtacac gttcggaggg 360

gggaccaagc tggaaataga acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 19
<211> 1404
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0052 HC"

<400> 19

[0018]

atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccattcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct 180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat 240

gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt gctgtgcaag agggtactac 360

ggtcttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 420

tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 660

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

tccaaatatg gtcccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 780

gtcttcctgt tcccccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acgtgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 900

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttcct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1320

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1380

agcctctccc tgtctctggg taaa 1404

<210> 20
<211> 1404
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0062 HC"

[0019] <400> 20
atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccattcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct 180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat 240

gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag agggtactac 360

ggtcttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 420

tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 660

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

tccaaatatg gtcccccatg cccaccatgc ccagcacctg agttcctggg gggaccatca 780

gtcttcctgt tccccccaaa acccaaggac actctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acgtgcgtgg tggtggacgt gagccaggaa gaccccgagg tccagttcaa ctggtacgtg 900

gatggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagtt caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa aggcctcccg tcctccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagagcc acaggtgtac accctgcccc catcccagga ggagatgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct accccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttcct ctacagcagg ctaaccgtgg acaagagcag gtggcaggag 1320

[0020]

gggaatgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacacagaag 1380

agcctctccc tgtctctggg taaa 1404

<210> 21
<211> 702
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0052 LC, mAb 0062 LC"

<400> 21
atgatgtcct ctgctcagtt ccttggtctc ctgttgctct gttttcaagg taccagatgt 60

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc 120

attagttgca gggcaagtca ggacattagc aattatttaa actggtatca gcagaaacca 180

gatggaactg ttaaactcct tatcttctac acatcaagat tacactcagg agtcccgtca 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagat tattctctca ccattagcaa cctggaaccg 300

gaagatattg ccacttacta ttgccaacag gatactaagc ttccgtacac gttcggaggg 360

gggaccaaac tggagatgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt 702

<210> 22
<211> 1377
<212> DNA
<213> 人工序列

[0021]

<220>
<223> /注释= "mAb 0061 HC"

<400> 22
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataaccca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc atgcccacca 720

tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 780

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 840

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 900

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 1020

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1080

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200

[0022]

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1260

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1377

<210> 23
<211> 1377
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0082 HC"

<400> 23
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatgcgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc atgcccacca 720

tgcccagcac ctgagttcct gggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaacccaag 780

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tggtggtgga cgtgagccag 840

[0023]

gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaag 900

acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 960

ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 1020

ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga gccacaggtg 1080

tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1140

gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1200

aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 1260

aggctaaccg tggacaagag caggtggcag gaggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1320

catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1377

<210> 24
<211> 714

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0061 LC, Fab 0061 LC, mAb 0082 LC, Fab 0082 LC"

<400> 24
atgaagttgc ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattgggcc 180

ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420

[0024] atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgt 714

<210> 25
<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0012 VH-CH1"

<400> 25
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa 699

[0025] <210> 26
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0023 VH-CH1"

<400> 26
atgaacttgg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60

gtgaggctgg tggagtctgg gggaggctta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120

tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac tatttcatgt attggattcg ccagactcca 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcatacatt agtaatggtg gtgatagcag ctcttatcca 240

gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt attgtgcaac aaataaaaac 360

tgggacgatt actatgatat ggactactgg ggtcaaggaa cctcagtcac cgtctcctca 420

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720

aaa 723

<210> 27
<211> 723
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0051 VH-CH1"

[0026] <400> 27
atgggttgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag 60

gtccagctgg agcagtctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggtctcagt gaagatttcc 120

tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tattctatgc actgggtgaa gcagagtcat 180

gcaaagagtc tagagtggat tggagttatt agtacttact atggtgatgt taggtacaac 240

cagaagttca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg 300

gcacttgcca gactgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag agcccctatg 360

attacgacag gggcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420

gctagcacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 480

agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 540

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 600

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 660

tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 720

aaa 723

<210> 28
<211> 726
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0052 VH-CH1"

<400> 28
atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccattcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg agctgagccg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggcta ctggctacac atttagtagt cactggatag agtggataaa acagaggcct 180

ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggaaatac taattacaat 240

[0027]

gagaaattca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt gctgtgcaag agggtactac 360

ggtcttaact acgactggta tttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc 420

tcagctagca ccaagggccc atccgtcttc cccctggcgc cctgctccag gagcacctcc 480

gagagcacag ccgccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 540

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc 600

tcaggactct actccctcag cagcgtggtg accgtgccct ccagcagctt gggcacgaag 660

acctacacct gcaacgtaga tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gagagttgag 720

tccaaa 726

<210> 29
<211> 699

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0061 VH-CH1"

<400> 29
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataaccca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

[0028] ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa 699

<210> 30
<211> 699
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0082 VH-CH1"

<400> 30
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatgcgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaa 699

[0029] <210> 31
<211> 741
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hIgG4 铰链-CH2-CH3"

<400> 31
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgagtcc 60

aaatatggtc ccccatgccc accatgccca gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 120

ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 180

tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 240

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 300

cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 360

tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 420

gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 480

aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 540

tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 600

gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 660

aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 720

ctctccctgt ctctgggtaa a 741

<210> 32
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0012, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

[0030]

<400> 32

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

[0031]

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

[0032] Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

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

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

<210> 33
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0012, LC (小鼠 VL - 人K CL); Fab 0012, LC (小鼠 VL - 人K CL)"

<400> 33

Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

[0033]

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys

100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

[0034]

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 34
<211> 467
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0023, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 34

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro
65 70 75 80

[0035] Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
245 250 255

[0036]

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
420 425 430

[0037] Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Gly Lys
465

<210> 35
<211> 239
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0023, LC (小鼠 VL - 人 K CL); Fab 0023, LC (小鼠 VL - 人 K CL)"

<400> 35

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ser Cys Gly Asp Ile Val Val Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

[0038]

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 36
<211> 467
<212> PRT
<213> 人工序列

[0039]
<220>
<223> /注释= "mAb 0051, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 36

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

[0040]

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
325 330 335

[0041] Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile
340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Leu Gly Lys
465

<210> 37
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0051, LC (小鼠 VL - 人 K CL); Fab 0051, LC (小鼠 VL - 人 K CL)"

[0042]

<400> 37

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
20 25 30

Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Glu Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
[0043] 165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 38
<211> 468
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0052, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 38

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

[0044]

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Cys Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser

145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

[0045]

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

[0046]

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 39
<211> 234
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0052, LC (小鼠 VL - 人K CL); mAb 0062, LC (小鼠 VL - 人K CL); Fab 0052, LC (小鼠 VL - 人K CL)"

<400> 39

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val
50 55 60

[0047]

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Thr
100 105 110

Lys Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

[0048]

<210> 40
<211> 459
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0061, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 40

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

[0049]

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

[0050]

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

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

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

<210> 41
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

[0051]

<220>
<223> /注释= "mAb 0061, LC (小鼠 VL - 人 K CL); Fab 0061, LC (小鼠 VL - 人 K CL); mAb 0082, LC (小鼠 VL - 人 K CL); Fab 0082, LC (小鼠 VL - 人 K CL)"

<400> 41

Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

[0052]

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 42
<211> 468
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0062, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 42

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

[0053]

Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr

130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

[0054]

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr

305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

[0055]

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Leu Gly Lys
465

<210> 43

<211> 459
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "mAb 0082, HC (小鼠 VH-人 IgG4 CH1-CH2-CH3)"

<400> 43

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

[0056] Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

[0057]

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
245 250 255

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

Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
275 280 285

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
290 295 300

Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
305 310 315 320

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
325 330 335

Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
340 345 350

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu
355 360 365

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
370 375 380

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
385 390 395 400

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
[0058] 405 410 415

Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly
420 425 430

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
435 440 445

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
450 455

<210> 44
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0012, 小鼠 VH - 人 IgG4 CH1"

<400> 44

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
65 70 75 80

[0059]

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230

<210> 45
<211> 241
[0060] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0023, 小鼠 VH - 人 IgG4 CH1"

<400> 45

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

[0061]

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys

<210> 46
<211> 241
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0051, 小鼠 VH - 人 IgG4 CH1"

<400> 46

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

[0062]

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala

115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

[0063]

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys

<210> 47
<211> 242
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0052, 小鼠 VH - 人 IgG4 CH1"

<400> 47

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

[0064]

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Cys Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Ser Lys

<210> 48
[0065] <211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0082, 小鼠 VH - 人 IgG4 CH1"

<400> 48

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu

50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

[0066]

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys

225 230

<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L2"

<400> 49

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

[0067]

<220>
<223> /注释= "接头, L3"

<400> 50

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L4a"

<400> 51

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L4b"

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser

[0068]

<210> 53
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L5"

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20

<210> 54
<211> 27
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L6"

<400> 54

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 55
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L7"

[0069]

<400> 55

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 56
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L8"

<400> 56

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser
35

<210> 57
<211> 42
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L9"

<400> 57

[0070] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40

<210> 58
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "接头, L10"

<400> 58

Tyr Gly Pro Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly

1 5 10 15

<210> 59
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "纯化标签, HPC4 标签"

<400> 59

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

<210> 60
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

[0071]

<220>
<223> /注释= "引物编号. 50"

<400> 60
caacacttac ttgtcctggt tcctgcag 28

<210> 61
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 51"

<400> 61
ctgcaggaac caggacaagt aagtgttg 28

<210> 62
<211> 36
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 69"

<400> 62
gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

<210> 63
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 98"

<400> 63
tttaaagaat tcctaacact ctcccctgtt gaagctctt 39

[0072] <210> 64
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 100"

<400> 64
tttaaagaat tctcatttac ccagagacag ggagaggct 39

<210> 65
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 312"

<400> 65
gtctaccaca acacacgtga c 21

<210> 66
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 339"

<400> 66
actggatggt gggaagatgg atacagt 27

<210> 67
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 341"

<400> 67
[0073] agatccaggg gctagcggat agacaga 27

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 348"

<400> 68
ggagctggtg gtggcatctc aggacctttg 30

<210> 69
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 347"

<400> 69
cctgtaggac cagagggctc caaggacact 30

<210> 70
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 448"

<400> 70
tttaaaaagc ttgccgccac catggagacc cctgcctggc cccgggtc 48

<210> 71
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

[0074] <220>
<223> /注释= "引物编号. 449"

<400> 71
tttaaagaat tcctattctc taaattcccc tttctcctgg cccataca 48

<210> 72
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 466"

<400> 72
ggaggtggcg ggtctggtgg cgggggatca ggcgggggag gttcctcagg cactacaaat 60

actgtggcag catat 75

<210> 73

<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 467"

<400> 73
ggaacctccc ccgcctgatc ccccgccacc agacccgcca cctccttctc taaattcccc 60

tttctcctgg cccat 75

<210> 74
<211> 65
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 483"

[0075] <400> 74
aaatttaagc ttactagtcc tgcaggttta aacgaatttg gatccggagg tggcgggtct 60

ggtgg 65

<210> 75
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 484"

<400> 75
gaatttagcg gccgcgaatt cggatccgga acctcccccg cctgatcc 48

<210> 76
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 485"

<400> 76
aaatttgaat tcttacttgc cgtcgatcag tctggggtcc acctggtcct cacactctcc 60

cctgttgaag ctctttgtga c 81

<210> 77
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 486"

<400> 77
acggatctct agcaagcttc gtacggtggc 30

[0076]

<210> 78
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 487"

<400> 78
aaatttgaat tcttacttgc cgtcgatcag tctggggtcc acctggtcct ctttggactc 60

aactctcttg tccaccttgg t 81

<210> 79
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 488"

<400> 79

aaatttgaat tcttatttgg actcaactct cttgtccacc ttggt 45

<210> 80
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 489"

<400> 80
acggatctct agcaagcttg ctagcaccaa 30

<210> 81
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0077] <223> /注释= "引物编号. 490"

<400> 81
aaatttaagc ttgccgccac catggatttt gggctgattt tttttattgt tgct 54

<210> 82
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 491"

<400> 82
aaatttgcta gctgcagaga cagtgaccag agtcccttgg cccca 45

<210> 83
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 492"

<400> 83
aaatttaagc ttgccgccac catgaagtca cagacccagg tcttcgtatt t 51

<210> 84
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 493"

<400> 84
aaatttaagc ttgccgccac catgaagttg cctgttgggc tgttggtgct g 51

[0078]

<210> 85
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 494"

<400> 85
aaatttcgta cgttctattt ccagcttggt cccccctc 38

<210> 86
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 495"

<400> 86
aaatttcgta cgttttattt ccagcttggt ccccccctccg aa 42

<210> 87

<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 512"

<400> 87
aaatttggat ccgaggtgaa acttctcgag tctggaggtg gcctggtgca gcctggaggt 60

tccctgaaa 69

<210> 88
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 513"

[0079] <400> 88
tttaaaggat tctttaccca gagacaggga gaggct 36

<210> 89
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 514"

<400> 89
aaatttggat cctttggact caactctctt gtccaccttg gt 42

<210> 90
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 546"

<400> 90
aaatttaagc ttgccgccac catgaacttg gggctcagct tgattttcct tgtc 54

<210> 91
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 547"

<400> 91
aaatttgcta gctgaggaga cggtgactga ggttccttga cc 42

<210> 92
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

[0080] <220>
<223> /注释= "引物编号. 548"

<400> 92
aaatttaagc ttgccgccac catggattca caggcccagg ttcttatatt gctg 54

<210> 93
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 549"

<400> 93
aaatttcgta cgtttcagct ccagcttggt cccagcaccg aa 42

<210> 94
<211> 48
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 551"

<400> 94
aaatttaaat ttggatccga tgttgtgatg acccaaactc cactctcc 48

<210> 95
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 552"

<400> 95
aaatttaaat ttggatccac actctcccct gttgaagctc tt 42

[0081] <210> 96
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 572"

<400> 96
aaatttaagc ttgccgccac catggatttt gggctgattt tttttattgt tgct 54

<210> 97
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 574"

<400> 97
aaatttaagc ttgccgccac catgaagttg cctgttgggc tgttggtgc 49

<210> 98
<211> 84
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 583"

<400> 98
aaatttggat ccggaacctc ccccgcctga tcccccgcca ccagacccgc cacctccaca 60

ctctcccctg ttgaagctct ttgt 84

<210> 99
<211> 99
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 584"

[0082]

<400> 99
aaatttggat ccagacccgc cacctccgga acctcccccg cctgatcccc cgccaccaga 60

cccgccacct ccacactctc ccctgttgaa gctctttgt 99

<210> 100
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 585"

<400> 100
aaatttggat cctgatcccc cgccaccaga cccgccacct ccacactctc ccctgttgaa 60

gctctttgt 69

<210> 101

<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 586"

<400> 101
aaatttggat ccggtggcgg gggatcaggc gggggaggtt cctcaggcac tacaaatact 60

gtggcagca 69

<210> 102
<211> 87
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 587"

[0083]

<400> 102
aaatttggat ccggaacctc ccccgcctga tccccccgcca ccagacccgc cacctccttt 60

acccagagac agggagaggc tcttctg 87

<210> 103
<211> 102
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 588"

<400> 103
aaatttggat ccagacccgc cacctccgga acctcccccg cctgatcccc cgccaccaga 60

cccgccacct cctttaccca gagacaggga gaggctcttc tg 102

<210> 104
<211> 72
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 589"

<400> 104
aaatttggat cctgatcccc cgccaccaga cccgccacct cctttaccca gagacaggga 60

gaggctcttc tg 72

<210> 105
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 590"

<400> 105
aaatttggat ccagacccgc cacctccaca ctctcccctg ttgaagctct ttgt 54

[0084]

<210> 106
<211> 114
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 591"

<400> 106
aaatttggat ccagacccgc cacctccaga cccgccacct ccggaacctc ccccgcctga 60

tcccccgcca ccagacccgc cacctccaca ctctcccctg ttgaagctct ttgt 114

<210> 107
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 592"

<400> 107
aaatttggat cctgatcccc cgccaccttt acccagagac agggagaggc tcttctg 57

<210> 108
<211> 117
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 593"

<400> 108
aaatttggat ccagacccgc cacctccaga cccgccacct ccggaacctc ccccgcctga 60

tcccccgcca ccagacccgc cacctccttt acccagagac agggagaggc tcttctg 117

<210> 109
<211> 45
<212> DNA
[0085] <213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 598"

<400> 109
ggaaacacct attttcattg ggccctgcag aaaccaggcc agtct 45

<210> 110
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 599"

<400> 110
agactggcct ggtttctgca gggcccaatg aaaataggtg tttcc 45

<210> 111

<210> 36
<211> DNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> /注释= "引物编号. 610"

<400> 111
gctctagact aacactcatt cctgttgaag ctcttg 36

<210> 112
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 613"

<400> 112
aaaaatctag aatagacaga tgggggtgtc gttttggc 38

[0086]

<210> 113
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 614"

<400> 113
aaaaatctag acttgaccag gcatcctaga gtca 34

<210> 114
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 615"

<400> 114

aaaaatctag aaggggccag tggatagact gatgg 35

<210> 115
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 616"

<400> 115
aaaaatctag aagggaccaa gggatagaca gatgg 35

<210> 116
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0087] <223> /注释= "引物编号. 617"

<400> 116
aaatttaagc ttgccgccac catggaatgg acctgggtct ttctcttcct 50

<210> 117
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 618"

<400> 117
aaatttgcta gctgaggaga cggtgaccgt ggtccctgc 39

<210> 118
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 619"

<400> 118
aaatttaagc ttgccgccac catgatgtcc tctgctcagt tccttggt 48

<210> 119
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 620"

<400> 119
aaatttcgta cgtttcatct ccagtttggt ccccccctcc 39

[0088]

<210> 120
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 627"

<400> 120
aaatttaagc ttgccgccac catgggttgg agctgtatca tcttctttct 50

<210> 121
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 628"

<400> 121
aaatttgcta gctgcagaga cagtgaccag agtcccttg 39

<210> 122

<210> 45
<211> DNA
<212> 人工序列
<213>

<220>
<223> /注释= "引物编号. 682"

<400> 122
gatagcagta cgataaacta taacccatct ctaaaggata aattc 45

<210> 123
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 683"

<400> 123
gaatttatcc tttagagatg ggttatagtt tatcgtactg ctatc 45

[0089]

<210> 124
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 684"

<400> 124
tctgaggact ctgccgtcta ttactgtgca agagggtact acggt 45

<210> 125
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 685"

<400> 125

accgtagtac cctcttgcac agtaatagac ggcagagtcc tcaga 45

<210> 126
<211> 81
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 686"

<400> 126
tgctgccaca gtatttgtag tgcctgatcc ccccaggaac tcaggtgctg gggatgatgg 60

ggatggggga ccatatttgg a 81

<210> 127
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列

[0090]

<220>
<223> /注释= "引物编号. 687"

<400> 127
ccagcacctg agttcctggg gggatcaggc actacaaata ctgtggcagc a 51

<210> 128
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 688"

<400> 128
gatagcagta cgataaacta tgcgccatct ctaaaggata aattc 45

<210> 129
<211> 45
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 689"

<400> 129
gaatttatcc tttagagatg gcgcatagtt tatcgtactg ctatc 45

<210> 130
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 699"

<400> 130
aaatttggat ccggcggggg aggttcctca ggcactacaa atactgtggc agca 54

[0091] <210> 131
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 700"

<400> 131
aaatttggat cctcaggcac tacaaatact gtggcagca 39

<210> 132
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 701"

<400> 132
accaaggtgg acaagagagt tgagtccaaa tcaggcacta caaatactgt ggcagca 57

<210> 133
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 702"

<400> 133
tgctgccaca gtatttgtag tgcctgattt ggactcaact ctcttgtcca ccttggtgtt 60

<210> 134
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 703"

<400> 134
[0092] gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tcaggcacta caaatactgt ggcagca 57

<210> 135
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 704"

<400> 135
tgctgccaca gtatttgtag tgcctgaaca ctctcccctg ttgaagctct ttgtgac 57

<210> 136
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 800"

<400> 136
cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa tcaggcacta caaatactgt ggcagcatat 60

<210> 137
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 801"

<400> 137
atatgctgcc acagtatttg tagtgcctga tttacccaga gacagggaga ggctcttctg 60

<210> 138
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列

[0093] <220>
<223> /注释= "引物编号. 842"

<400> 138
aaatttaagc ttgccgccac catgaggtgc ctagctgagt tcctggggc 49

<210> 139
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 843"

<400> 139
aaatttcgta cgttttattt ccaactttgt ccccgagccg aacgt 45

<210> 140
<211> 49
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 844"

<400> 140
aaatttaagc ttgccgccac catggaatgg agcggggtct ttatctttc 49

<210> 141
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 845"

<400> 141
aaatttgcta gctgaggaga cggtgactga ggttccttg 39

[0094] <210> 142
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物 1000"

<400> 142
ctgtctctgg gtaaacacca tcaccaccac cactgagaat tccccgacct cgacc 55

<210> 143
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 1001"

<400> 143
gaggtcgggg aattctcagt ggtggtggtg atggtgttta cccagagaca gggag 55

<210> 144
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 1002"

<400> 144
ctcttttaaa aggggtccag tgtgagtcca aatatggtcc cccatgcc 48

<210> 145
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 1003"

<400> 145
[0095] catgggggac catatttgga ctcacactgg acccctttta aaagagcaac 50

<210> 146
<211> 233
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "0061VH-CH1"

<400> 146

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser

35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

[0096]

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr

210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
225 230

<210> 147
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hIgG4-铰链-CH2-CH3"

<400> 147

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

[0097] Gln Cys Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20 25 30

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35 40 45

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
115 120 125

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0098] 195 200 205

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
245

<210> 148
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "His6 tag"

<400> 148

His His His His His His
1 5

<210> 149
<211> 172
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "hTLT-1.18-188"

<400> 149

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

[0099]

Ser Ile Leu Val Gln Cys His Tyr Arg Leu Gln Asp Val Lys Ala Gln
20 25 30

Lys Val Trp Cys Arg Phe Leu Pro Glu Gly Cys Gln Pro Leu Val Ser
35 40 45

Ser Ala Val Asp Arg Arg Ala Pro Ala Gly Arg Arg Thr Phe Leu Thr
50 55 60

Asp Leu Gly Gly Gly Leu Leu Gln Val Glu Met Val Thr Leu Gln Glu
65 70 75 80

Glu Asp Ala Gly Glu Tyr Gly Cys Met Val Asp Gly Ala Arg Gly Pro
85 90 95

Gln Ile Leu His Arg Val Ser Leu Asn Ile Leu Pro Pro Glu Glu Glu
100 105 110

Glu Glu Thr His Lys Ile Gly Ser Leu Ala Glu Asn Ala Phe Ser Asp
115 120 125

Pro Ala Gly Ser Ala Asn Pro Leu Glu Pro Ser Gln Asp Glu Lys Ser
130 135 140

Ile Pro Leu Ile Trp Gly Ala Val Leu Leu Val Gly Leu Leu Val Ala
145 150 155 160

Ala Val Val Leu Phe Ala Val Met Ala Lys Arg Lys
165 170

<210> 150
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

[0100] <220>
<223> /注释= "引物编号. 1004"

<400> 150
ggaattccat atgatagttg gcagcctccc tg 32

<210> 151
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "引物编号. 1005"

<400> 151
ataagaatgc ggccgcctat ttcctcttgg ccatcacag 39

<210> 152
<211> 215
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0100 HC"

<400> 152

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

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

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

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

[0101]

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

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

Ala Ser Gly Val Phe Thr Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

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

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

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

145 150 155 160

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
165 170 175

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
180 185 190

Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
195 200 205

Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys
210 215

<210> 153
<211> 219
[0102] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> /注释= "Fab 0100 LC"

<400> 153

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
[0103] 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 154
<211> 6588
<212> DNA

<213> 智人

<400> 154

gcgcagctgc gccagtttta tgtggcggcg cagggcatta gctggagcta tcgcccggaa 60

ccgaccaaca gcagcctgaa cctgagcgtg accagcttta aaaaaattgt gtatcgcgaa 120

tatgaaccgt attttaaaaa agaaaaaccg cagagcacca ttagcggcct gctgggcccg 180

accctgtatg cggaagtggg cgatattatt aaagtgcatt ttaaaaacaa agcggataaa 240

ccgctgagca ttcatccgca gggcattcgc tatagcaaac tgagcgaagg cgcgagctat 300

ctggatcata cctttccggc ggaaaaaatg gatgatgcgg tggcgccggg ccgcgaatat 360

acctatgaat ggagcattag cgaagatagc ggcccgaccc atgatgatcc gccgtgcctg 420

acccatattt attatagcca tgaaaacctg attgaagatt ttaacagcgg cctgattggc 480

ccgctgctga tttgcaaaaa aggcaccctg accgaaggcg gcacccagaa aacctttgat 540

[0104] aaacagattg tgctgctgtt tgcggtgttt gatgaaagca aaagctggag ccagagcagc 600

agcctgatgt ataccgtgaa cggctatgtg aacggcacca tgccggatat taccgtgtgc 660

gcgcatgatc atattagctg gcatctgctg ggcatgagca gcggcccgga actgtttagc 720

attcatttta acggccaggt gctggaacag aaccatcata aagtgagcgc gattaccctg 780

gtgagcgcga ccagcaccac cgcgaacatg accgtgggcc cggaaggcaa atggattatt 840

agcagcctga ccccgaaaca tctgcaggcg ggcatgcagg cgtatattga tattaaaaac 900

tgcccgaaaa aaacccgcaa cctgaaaaaa attacccgcg aacagcgccg ccatatgaaa 960

cgctgggaat attttattgc ggcggaagaa gtgatttggg attatgcgcc ggtgattccg 1020

gcgaacatgg ataaaaaata tcgcagccag catctggata actttagcaa ccagattggc 1080

aaacattata aaaaagtgat gtatacccag tatgaagatg aaagctttac caaacatacc 1140

gtgaacccga acatgaaaga agatggcatt ctgggcccga ttattcgcgc gcaggtgcgc 1200

gataccctga aaattgtgtt taaaaacatg gcgagccgcc cgtatagcat ttatccgcat 1260

ggcgtgacct ttagcccgta tgaagatgaa gtgaacagca gctttaccag cggccgcaac 1320

aacaccatga ttcgcgcggt gcagccgggc gaaacctata cctataaatg gaacattctg 1380

gaatttgatg aaccgaccga aaacgatgcg cagtgcctga cccgcccgta ttatagcgat 1440

gtggatatta tgcgcgatat tgcgagcggc ctgattggcc tgctgctgat ttgcaaaagc 1500

cgcagcctgg atcgccgcgg cattcagcgc gcggcggata ttgaacagca ggcggtgttt 1560

gcggtgtttg atgaaaacaa aagctggtat ctggaagata acattaacaa attttgcgaa 1620

aacccggatg aagtgaaacg cgatgatccg aaattttatg aaagcaacat tatgagcacc 1680

attaacggct atgtgccgga aagcattacc accctgggct tttgctttga tgataccgtg 1740

cagtggcatt tttgcagcgt gggcacccag aacgaaattc tgaccattca ttttaccggc 1800

catagcttta tttatggcaa acgccatgaa gataccctga ccctgtttcc gatgcgcggc 1860

gaaagcgtga ccgtgaccat ggataacgtg ggcacctgga tgctgaccag catgaacagc 1920

[0105]

agcccgcgca gcaaaaaact gcgcctgaaa tttcgcgatg tgaaatgcat tccggatgat 1980

gatgaagata gctatgaaat ttttgaaccg ccggaaagca ccgtgatggc gacccgcaaa 2040

atgcatgatc gcctggaacc ggaagatgaa gaaagcgatg cggattatga ttatcagaac 2100

cgcctggcgg cggcgctggg cattcgcagc tttcgcaaca gcagcctgaa ccaggaagaa 2160

gaagaattta acctgaccgc gctggcgctg gaaaacggca ccgaatttgt gagcagcaac 2220

accgatatta ttgtgggcag caactatagc agcccgagca acattagcaa atttaccgtg 2280

aacaacctgg cggaaccgca gaaagcgccg agccatcagc aggcgaccac cgcgggcagc 2340

ccgctgcgcc atctgattgg caaaaacagc gtgctgaaca gcagcaccgc ggaacatagc 2400

agcccgtata gcgaagatcc gattgaagat ccgctgcagc cggatgtgac cggcattcgc 2460

ctgctgagcc tgggcgcggg cgaatttaaa agccaggaac atgcgaaaca taaaggcccg 2520

aaagtggaac gcgatcaggc ggcgaaacat cgctttagct ggatgaaact gctggcgcat 2580

aaagtgggcc gccatctgag ccaggatacc ggcagcccga gcggcatgcg cccgtgggaa 2640

gatctgccga gccaggatac cggcagcccg agccgcatgc gcccgtggaa agatccgccg 2700

agcgatctgc tgctgctgaa acagagcaac agcagcaaaa ttctggtggg ccgctggcat 2760

ctggcgagcg aaaaaggcag ctatgaaatt attcaggata ccgatgaaga taccgcggtg 2820

aacaactggc tgattagccc gcagaacgcg agccgcgcgt ggggcgaaag caccccgctg 2880

gcgaacaaac cgggcaaaca gagcggccat ccgaaatttc cgcgcgtgcg ccataaaagc 2940

ctgcaggtgc gccaggatgg cggcaaaagc cgcctgaaaa aaagccagtt tctgattaaa 3000

acccgcaaaa aaaaaaaaga aaaacatacc catcatgcgc cgctgagccc gcgcaccttt 3060

catccgctgc gcagcgaagc gtataacacc tttagcgaac gccgcctgaa acatagcctg 3120

gtgctgcata aaagcaacga aaccagcctg ccgaccgatc tgaaccagac cctgccgagc 3180

atggattttg gctggattgc gagcctgccg gatcataacc agaacagcag caacgatacc 3240

[0106]

ggccaggcga gctgcccgcc gggcctgtat cagaccgtgc cgccggaaga acattatcag 3300

acctttccga ttcaggatcc ggatcagatg catagcacca gcgatccgag ccatcgcagc 3360

agcagcccgg aactgagcga aatgctggaa tatgatcgca gccataaaag ctttccgacc 3420

gatattagcc agatgagccc gagcagcgaa catgaagtgt ggcagaccgt gattagcccg 3480

gatctgagcc aggtgaccct gagcccggaa ctgagccaga ccaacctgag cccggatctg 3540

agccatacca ccctgagccc ggaactgatt cagcgcaacc tgagcccggc gctgggccag 3600

atgccgatta gcccggatct gagccatacc accctgagcc cggatctgag ccataccacc 3660

ctgagcctgg atctgagcca gaccaacctg agcccggaac tgagccagac caacctgagc 3720

ccggcgctgg gccagatgcc gctgagcccg gatctgagcc ataccaccct gagcctggat 3780

tttagccaga ccaacctgag cccggaactg agccatatga ccctgagccc ggaactgagc 3840

cagaccaacc tgagcccggc gctgggccag atgccgatta gcccggatct gagccatacc 3900

accctgagcc tggattttag ccagaccaac ctgagcccgg aactgagcca gaccaacctg 3960

agcccggcgc tgggccagat gccgctgagc ccggatccga gccataccac cctgagcctg 4020

gatctgagcc agaccaacct gagcccggaa ctgagccaga ccaacctgag cccggatctg 4080

agcgaaatgc cgctgtttgc ggatctgagc cagattccgc tgaccccgga tctggatcag 4140

atgaccctga gcccggatct gggcgaaacc gatctgagcc cgaactttgg ccagatgagc 4200

ctgagcccgg atctgagcca ggtgaccctg agcccggata ttagcgatac caccctgctg 4260

ccggatctga gccagattag cccgccgccg gatctggatc agatttttta tccgagcgaa 4320

agcagccaga gcctgctgct gcaggaattt aacgaaagct ttccgtatcc ggatctgggc 4380

cagatgccga gcccgagcag cccgaccctg aacgatacct ttctgagcaa agaatttaac 4440

ccgctggtga ttgtgggcct gagcaaagat ggcaccgatt atattgaaat tattccgaaa 4500

gaagaagtgc agagcagcga agatgattat gcggaaattg attatgtgcc gtatgatgat 4560

[0107]

ccgtataaaa ccgatgtgcg caccaacatt aacagcagcc gcgatccgga taacattgcg 4620

gcgtggtatc tgcgcagcaa caacggcaac cgccgcaact attatattgc ggcggaagaa 4680

attagctggg attatagcga atttgtgcag cgcgaaaccg atattgaaga tagcgatgat 4740

attccggaag ataccaccta taaaaaagtg gtgtttcgca aatatctgga tagcaccttt 4800

accaaacgcg atccgcgcgg cgaatatgaa gaacatctgg gcattctggg cccgattatt 4860

cgcgcggaag tggatgatgt gattcaggtg cgctttaaaa acctggcgag ccgcccgtat 4920

agcctgcatg cgcatggcct gagctatgaa aaaagcagcg aaggcaaaac ctatgaagat 4980

gatagcccgg aatggtttaa agaagataac gcggtgcagc cgaacagcag ctatacctat 5040

gtgtggcatg cgaccgaacg cagcggcccg gaaagcccgg gcagcgcgtg ccgcgcgtgg 5100

gcgtattata gcgcggtgaa cccggaaaaa gatattcata gcggcctgat tggcccgctg 5160

ctgatttgcc agaaaggcat tctgcataaa gatagcaaca tgccgatgga tatgcgcgaa 5220

tttgtgctgc tgtttatgac ctttgatgaa aaaaaaagct ggtattatga aaaaaaaagc 5280

cgcagcagct ggcgcctgac cagcagcgaa atgaaaaaaa gccatgaatt tcatgcgatt 5340

aacggcatga tttatagcct gccgggcctg aaaatgtatg aacaggaatg ggtgcgcctg 5400

catctgctga acattggcgg cagccaggat attcatgtgg tgcattttca tggccagacc 5460

ctgctggaaa acggcaacaa acagcatcag ctgggcgtgt ggccgctgct gccgggcagc 5520

tttaaaaccc tggaaatgaa agcgagcaaa ccgggctggt ggctgctgaa caccgaagtg 5580

ggcgaaaacc agcgcgcggg catgcagacc ccgtttctga ttatggatcg cgattgccgc 5640

atgccgatgg gcctgagcac cggcattatt agcgatagcc agattaaagc gagcgaattt 5700

ctgggctatt gggaaccgcg cctggcgcgc ctgaacaacg gcggcagcta taacgcgtgg 5760

agcgtggaaa aactggcggc ggaatttgcg agcaaaccgt ggattcaggt ggatatgcag 5820

aaagaagtga ttattaccgg cattcagacc cagggcgcga aacattatct gaaaagctgc 5880

[0108]

tataccaccg aattttatgt ggcgtatagc agcaaccaga ttaactggca gatttttaaa 5940

ggcaacagca cccgcaacgt gatgtatttt aacggcaaca gcgatgcgag caccattaaa 6000

gaaaaccagt ttgatccgcc gattgtggcg cgctatattc gcattagccc gacccgcgcg 6060

tataaccgcc cgaccctgcg cctggaactg cagggctgcg aagtgaacgg ctgcagcacc 6120

ccgctgggca tggaaaacgg caaaattgaa aacaaacaga ttaccgcgag cagctttaaa 6180

aaaagctggt ggggcgatta ttgggaaccg tttcgcgcgc gcctgaacgc gcagggccgc 6240

gtgaacgcgt ggcaggcgaa agcgaacaac aacaaacagt ggctggaaat tgatctgctg 6300

aaaattaaaa aaattaccgc gattattacc cagggctgca aaagcctgag cagcgaaatg 6360

tatgtgaaaa gctataccat tcattatagc gaacagggcg tggaatggaa accgtatcgc 6420

ctgaaaagca gcatggtgga taaaattttt gaaggcaaca ccaacaccaa aggccatgtg 6480

aaaaactttt ttaacccgcc gattattagc cgctttattc gcgtgattcc gaaaacctgg 6540

aaccagagca ttgcgctgcg cctggaactg tttggctgcg atatttat 6588

<210> 155
<211> 2196
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155

Ala Gln Leu Arg Gln Phe Tyr Val Ala Ala Gln Gly Ile Ser Trp Ser
1 5 10 15

Tyr Arg Pro Glu Pro Thr Asn Ser Ser Leu Asn Leu Ser Val Thr Ser
20 25 30

Phe Lys Lys Ile Val Tyr Arg Glu Tyr Glu Pro Tyr Phe Lys Lys Glu
35 40 45

[0109]

Lys Pro Gln Ser Thr Ile Ser Gly Leu Leu Gly Pro Thr Leu Tyr Ala
50 55 60

Glu Val Gly Asp Ile Ile Lys Val His Phe Lys Asn Lys Ala Asp Lys
65 70 75 80

Pro Leu Ser Ile His Pro Gln Gly Ile Arg Tyr Ser Lys Leu Ser Glu
85 90 95

Gly Ala Ser Tyr Leu Asp His Thr Phe Pro Ala Glu Lys Met Asp Asp
100 105 110

Ala Val Ala Pro Gly Arg Glu Tyr Thr Tyr Glu Trp Ser Ile Ser Glu
115 120 125

Asp Ser Gly Pro Thr His Asp Asp Pro Pro Cys Leu Thr His Ile Tyr

130 135 140

Tyr Ser His Glu Asn Leu Ile Glu Asp Phe Asn Ser Gly Leu Ile Gly
145 150 155 160

Pro Leu Leu Ile Cys Lys Lys Gly Thr Leu Thr Glu Gly Gly Thr Gln
165 170 175

Lys Thr Phe Asp Lys Gln Ile Val Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu
180 185 190

Ser Lys Ser Trp Ser Gln Ser Ser Ser Leu Met Tyr Thr Val Asn Gly
195 200 205

Tyr Val Asn Gly Thr Met Pro Asp Ile Thr Val Cys Ala His Asp His
210 215 220

[0110]

Ile Ser Trp His Leu Leu Gly Met Ser Ser Gly Pro Glu Leu Phe Ser
225 230 235 240

Ile His Phe Asn Gly Gln Val Leu Glu Gln Asn His His Lys Val Ser
245 250 255

Ala Ile Thr Leu Val Ser Ala Thr Ser Thr Thr Ala Asn Met Thr Val
260 265 270

Gly Pro Glu Gly Lys Trp Ile Ile Ser Ser Leu Thr Pro Lys His Leu
275 280 285

Gln Ala Gly Met Gln Ala Tyr Ile Asp Ile Lys Asn Cys Pro Lys Lys
290 295 300

Thr Arg Asn Leu Lys Lys Ile Thr Arg Glu Gln Arg Arg His Met Lys

305 310 315 320

Arg Trp Glu Tyr Phe Ile Ala Ala Glu Glu Val Ile Trp Asp Tyr Ala
325 330 335

Pro Val Ile Pro Ala Asn Met Asp Lys Lys Tyr Arg Ser Gln His Leu
340 345 350

Asp Asn Phe Ser Asn Gln Ile Gly Lys His Tyr Lys Lys Val Met Tyr
355 360 365

Thr Gln Tyr Glu Asp Glu Ser Phe Thr Lys His Thr Val Asn Pro Asn
370 375 380

Met Lys Glu Asp Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Gln Val Arg
385 390 395 400

[0111]

Asp Thr Leu Lys Ile Val Phe Lys Asn Met Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
405 410 415

Ile Tyr Pro His Gly Val Thr Phe Ser Pro Tyr Glu Asp Glu Val Asn
420 425 430

Ser Ser Phe Thr Ser Gly Arg Asn Asn Thr Met Ile Arg Ala Val Gln
435 440 445

Pro Gly Glu Thr Tyr Thr Tyr Lys Trp Asn Ile Leu Glu Phe Asp Glu
450 455 460

Pro Thr Glu Asn Asp Ala Gln Cys Leu Thr Arg Pro Tyr Tyr Ser Asp
465 470 475 480

Val Asp Ile Met Arg Asp Ile Ala Ser Gly Leu Ile Gly Leu Leu Leu

485 490 495

Ile Cys Lys Ser Arg Ser Leu Asp Arg Arg Gly Ile Gln Arg Ala Ala
500 505 510

Asp Ile Glu Gln Gln Ala Val Phe Ala Val Phe Asp Glu Asn Lys Ser
515 520 525

Trp Tyr Leu Glu Asp Asn Ile Asn Lys Phe Cys Glu Asn Pro Asp Glu
530 535 540

Val Lys Arg Asp Asp Pro Lys Phe Tyr Glu Ser Asn Ile Met Ser Thr
545 550 555 560

Ile Asn Gly Tyr Val Pro Glu Ser Ile Thr Thr Leu Gly Phe Cys Phe
565 570 575

[0112]

Asp Asp Thr Val Gln Trp His Phe Cys Ser Val Gly Thr Gln Asn Glu
580 585 590

Ile Leu Thr Ile His Phe Thr Gly His Ser Phe Ile Tyr Gly Lys Arg
595 600 605

His Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro Met Arg Gly Glu Ser Val Thr
610 615 620

Val Thr Met Asp Asn Val Gly Thr Trp Met Leu Thr Ser Met Asn Ser
625 630 635 640

Ser Pro Arg Ser Lys Lys Leu Arg Leu Lys Phe Arg Asp Val Lys Cys
645 650 655

Ile Pro Asp Asp Asp Glu Asp Ser Tyr Glu Ile Phe Glu Pro Pro Glu

660 665 670

Ser Thr Val Met Ala Thr Arg Lys Met His Asp Arg Leu Glu Pro Glu
675 680 685

Asp Glu Glu Ser Asp Ala Asp Tyr Asp Tyr Gln Asn Arg Leu Ala Ala
690 695 700

Ala Leu Gly Ile Arg Ser Phe Arg Asn Ser Ser Leu Asn Gln Glu Glu
705 710 715 720

Glu Glu Phe Asn Leu Thr Ala Leu Ala Leu Glu Asn Gly Thr Glu Phe
725 730 735

Val Ser Ser Asn Thr Asp Ile Ile Val Gly Ser Asn Tyr Ser Ser Pro
740 745 750

[0113]

Ser Asn Ile Ser Lys Phe Thr Val Asn Asn Leu Ala Glu Pro Gln Lys
755 760 765

Ala Pro Ser His Gln Gln Ala Thr Thr Ala Gly Ser Pro Leu Arg His
770 775 780

Leu Ile Gly Lys Asn Ser Val Leu Asn Ser Ser Thr Ala Glu His Ser
785 790 795 800

Ser Pro Tyr Ser Glu Asp Pro Ile Glu Asp Pro Leu Gln Pro Asp Val
805 810 815

Thr Gly Ile Arg Leu Leu Ser Leu Gly Ala Gly Glu Phe Lys Ser Gln
820 825 830

Glu His Ala Lys His Lys Gly Pro Lys Val Glu Arg Asp Gln Ala Ala

835 840 845

Lys His Arg Phe Ser Trp Met Lys Leu Leu Ala His Lys Val Gly Arg
850 855 860

His Leu Ser Gln Asp Thr Gly Ser Pro Ser Gly Met Arg Pro Trp Glu
865 870 875 880

Asp Leu Pro Ser Gln Asp Thr Gly Ser Pro Ser Arg Met Arg Pro Trp
885 890 895

Lys Asp Pro Pro Ser Asp Leu Leu Leu Leu Lys Gln Ser Asn Ser Ser
900 905 910

Lys Ile Leu Val Gly Arg Trp His Leu Ala Ser Glu Lys Gly Ser Tyr
915 920 925

[0114]

Glu Ile Ile Gln Asp Thr Asp Glu Asp Thr Ala Val Asn Asn Trp Leu
930 935 940

Ile Ser Pro Gln Asn Ala Ser Arg Ala Trp Gly Glu Ser Thr Pro Leu
945 950 955 960

Ala Asn Lys Pro Gly Lys Gln Ser Gly His Pro Lys Phe Pro Arg Val
965 970 975

Arg His Lys Ser Leu Gln Val Arg Gln Asp Gly Gly Lys Ser Arg Leu
980 985 990

Lys Lys Ser Gln Phe Leu Ile Lys Thr Arg Lys Lys Lys Lys Glu Lys
995 1000 1005

His Thr His His Ala Pro Leu Ser Pro Arg Thr Phe His Pro Leu

1010 1015 1020

Arg Ser Glu Ala Tyr Asn Thr Phe Ser Glu Arg Arg Leu Lys His
1025 1030 1035

Ser Leu Val Leu His Lys Ser Asn Glu Thr Ser Leu Pro Thr Asp
1040 1045 1050

Leu Asn Gln Thr Leu Pro Ser Met Asp Phe Gly Trp Ile Ala Ser
1055 1060 1065

Leu Pro Asp His Asn Gln Asn Ser Ser Asn Asp Thr Gly Gln Ala
1070 1075 1080

Ser Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Gln Thr Val Pro Pro Glu Glu His
1085 1090 1095

[0115]

Tyr Gln Thr Phe Pro Ile Gln Asp Pro Asp Gln Met His Ser Thr
1100 1105 1110

Ser Asp Pro Ser His Arg Ser Ser Ser Pro Glu Leu Ser Glu Met
1115 1120 1125

Leu Glu Tyr Asp Arg Ser His Lys Ser Phe Pro Thr Asp Ile Ser
1130 1135 1140

Gln Met Ser Pro Ser Ser Glu His Glu Val Trp Gln Thr Val Ile
1145 1150 1155

Ser Pro Asp Leu Ser Gln Val Thr Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln
1160 1165 1170

Thr Asn Leu Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Pro Glu

1175 1180 1185

Leu Ile Gln Arg Asn Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Ile
1190 1195 1200

Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Pro Asp Leu Ser His
1205 1210 1215

Thr Thr Leu Ser Leu Asp Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Glu
1220 1225 1230

Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Leu
1235 1240 1245

Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Leu Asp Phe Ser Gln
1250 1255 1260

[0116]

Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser His Met Thr Leu Ser Pro Glu
1265 1270 1275

Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala Leu Gly Gln Met Pro Ile
1280 1285 1290

Ser Pro Asp Leu Ser His Thr Thr Leu Ser Leu Asp Phe Ser Gln
1295 1300 1305

Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Ala
1310 1315 1320

Leu Gly Gln Met Pro Leu Ser Pro Asp Pro Ser His Thr Thr Leu
1325 1330 1335

Ser Leu Asp Leu Ser Gln Thr Asn Leu Ser Pro Glu Leu Ser Gln

1340 1345 1350

Thr Asn Leu Ser Pro Asp Leu Ser Glu Met Pro Leu Phe Ala Asp
1355 1360 1365

Leu Ser Gln Ile Pro Leu Thr Pro Asp Leu Asp Gln Met Thr Leu
1370 1375 1380

Ser Pro Asp Leu Gly Glu Thr Asp Leu Ser Pro Asn Phe Gly Gln
1385 1390 1395

Met Ser Leu Ser Pro Asp Leu Ser Gln Val Thr Leu Ser Pro Asp
1400 1405 1410

Ile Ser Asp Thr Thr Leu Leu Pro Asp Leu Ser Gln Ile Ser Pro
1415 1420 1425

[0117]

Pro Pro Asp Leu Asp Gln Ile Phe Tyr Pro Ser Glu Ser Ser Gln
1430 1435 1440

Ser Leu Leu Leu Gln Glu Phe Asn Glu Ser Phe Pro Tyr Pro Asp
1445 1450 1455

Leu Gly Gln Met Pro Ser Pro Ser Ser Pro Thr Leu Asn Asp Thr
1460 1465 1470

Phe Leu Ser Lys Glu Phe Asn Pro Leu Val Ile Val Gly Leu Ser
1475 1480 1485

Lys Asp Gly Thr Asp Tyr Ile Glu Ile Ile Pro Lys Glu Glu Val
1490 1495 1500

Gln Ser Ser Glu Asp Asp Tyr Ala Glu Ile Asp Tyr Val Pro Tyr

1505 1510 1515

Asp Asp Pro Tyr Lys Thr Asp Val Arg Thr Asn Ile Asn Ser Ser
1520 1525 1530

Arg Asp Pro Asp Asn Ile Ala Ala Trp Tyr Leu Arg Ser Asn Asn
1535 1540 1545

Gly Asn Arg Arg Asn Tyr Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Ile Ser Trp
1550 1555 1560

Asp Tyr Ser Glu Phe Val Gln Arg Glu Thr Asp Ile Glu Asp Ser
1565 1570 1575

Asp Asp Ile Pro Glu Asp Thr Thr Tyr Lys Lys Val Val Phe Arg
1580 1585 1590

[0118]

Lys Tyr Leu Asp Ser Thr Phe Thr Lys Arg Asp Pro Arg Gly Glu
1595 1600 1605

Tyr Glu Glu His Leu Gly Ile Leu Gly Pro Ile Ile Arg Ala Glu
1610 1615 1620

Val Asp Asp Val Ile Gln Val Arg Phe Lys Asn Leu Ala Ser Arg
1625 1630 1635

Pro Tyr Ser Leu His Ala His Gly Leu Ser Tyr Glu Lys Ser Ser
1640 1645 1650

Glu Gly Lys Thr Tyr Glu Asp Asp Ser Pro Glu Trp Phe Lys Glu
1655 1660 1665

Asp Asn Ala Val Gln Pro Asn Ser Ser Tyr Thr Tyr Val Trp His

1670 1675 1680

Ala Thr Glu Arg Ser Gly Pro Glu Ser Pro Gly Ser Ala Cys Arg
1685 1690 1695

Ala Trp Ala Tyr Tyr Ser Ala Val Asn Pro Glu Lys Asp Ile His
1700 1705 1710

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Gln Lys Gly Ile Leu
1715 1720 1725

His Lys Asp Ser Asn Met Pro Met Asp Met Arg Glu Phe Val Leu
1730 1735 1740

Leu Phe Met Thr Phe Asp Glu Lys Lys Ser Trp Tyr Tyr Glu Lys
1745 1750 1755

[0119]

Lys Ser Arg Ser Ser Trp Arg Leu Thr Ser Ser Glu Met Lys Lys
1760 1765 1770

Ser His Glu Phe His Ala Ile Asn Gly Met Ile Tyr Ser Leu Pro
1775 1780 1785

Gly Leu Lys Met Tyr Glu Gln Glu Trp Val Arg Leu His Leu Leu
1790 1795 1800

Asn Ile Gly Gly Ser Gln Asp Ile His Val Val His Phe His Gly
1805 1810 1815

Gln Thr Leu Leu Glu Asn Gly Asn Lys Gln His Gln Leu Gly Val
1820 1825 1830

Trp Pro Leu Leu Pro Gly Ser Phe Lys Thr Leu Glu Met Lys Ala

1835 1840 1845

Ser Lys Pro Gly Trp Trp Leu Leu Asn Thr Glu Val Gly Glu Asn
1850 1855 1860

Gln Arg Ala Gly Met Gln Thr Pro Phe Leu Ile Met Asp Arg Asp
1865 1870 1875

Cys Arg Met Pro Met Gly Leu Ser Thr Gly Ile Ile Ser Asp Ser
1880 1885 1890

Gln Ile Lys Ala Ser Glu Phe Leu Gly Tyr Trp Glu Pro Arg Leu
1895 1900 1905

Ala Arg Leu Asn Asn Gly Gly Ser Tyr Asn Ala Trp Ser Val Glu
1910 1915 1920

[0120]

Lys Leu Ala Ala Glu Phe Ala Ser Lys Pro Trp Ile Gln Val Asp
1925 1930 1935

Met Gln Lys Glu Val Ile Ile Thr Gly Ile Gln Thr Gln Gly Ala
1940 1945 1950

Lys His Tyr Leu Lys Ser Cys Tyr Thr Thr Glu Phe Tyr Val Ala
1955 1960 1965

Tyr Ser Ser Asn Gln Ile Asn Trp Gln Ile Phe Lys Gly Asn Ser
1970 1975 1980

Thr Arg Asn Val Met Tyr Phe Asn Gly Asn Ser Asp Ala Ser Thr
1985 1990 1995

Ile Lys Glu Asn Gln Phe Asp Pro Pro Ile Val Ala Arg Tyr Ile

2000 2005 2010

Arg Ile Ser Pro Thr Arg Ala Tyr Asn Arg Pro Thr Leu Arg Leu
2015 2020 2025

Glu Leu Gln Gly Cys Glu Val Asn Gly Cys Ser Thr Pro Leu Gly
2030 2035 2040

Met Glu Asn Gly Lys Ile Glu Asn Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser
2045 2050 2055

Phe Lys Lys Ser Trp Trp Gly Asp Tyr Trp Glu Pro Phe Arg Ala
2060 2065 2070

Arg Leu Asn Ala Gln Gly Arg Val Asn Ala Trp Gln Ala Lys Ala
2075 2080 2085

[0121]

Asn Asn Asn Lys Gln Trp Leu Glu Ile Asp Leu Leu Lys Ile Lys
2090 2095 2100

Lys Ile Thr Ala Ile Ile Thr Gln Gly Cys Lys Ser Leu Ser Ser
2105 2110 2115

Glu Met Tyr Val Lys Ser Tyr Thr Ile His Tyr Ser Glu Gln Gly
2120 2125 2130

Val Glu Trp Lys Pro Tyr Arg Leu Lys Ser Ser Met Val Asp Lys
2135 2140 2145

Ile Phe Glu Gly Asn Thr Asn Thr Lys Gly His Val Lys Asn Phe
2150 2155 2160

Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ser Arg Phe Ile Arg Val Ile Pro Lys

2165 2170 2175

Thr Trp Asn Gln Ser Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Phe Gly Cys
2180 2185 2190

Asp Ile Tyr
2195

<210> 156
<211> 1218
<212> DNA
<213> 智人

<400> 156

[0122]

gcgaacgcgt ttctggaaga actgcgcccg ggcagcctgg aacgcgaatg caaagaagaa 60

cagtgcagct ttgaagaagc gcgcgaaatt tttaaagatg cggaacgcac caaactgttt 120

tggattagct atagcgatgg cgatcagtgc gcgagcagcc cgtgccagaa cggcggcagc 180

tgcaaagatc agctgcagag ctatatttgc ttttgcctgc cggcgtttga aggccgcaac 240

tgcgaaaccc ataaagatga tcagctgatt tgcgtgaacg aaaacggcgg ctgcgaacag 300

tattgcagcg atcataccgg caccaaacgc agctgccgct gccatgaagg ctatagcctg 360

ctggcggatg gcgtgagctg caccccgacc gtggaatatc cgtgcggcaa aattccgatt 420

ctggaaaaac gcaacgcgag caaaccgcag ggccgcattg tgggcggcaa agtgtgcccg 480

aaaggcgaat gcccgtggca ggtgctgctg ctggtgaacg gcgcgcagct gtgcggcggc 540

accctgatta acaccatttg ggtggtgagc gcggcgcatt gctttgataa aattaaaaac 600

tggcgcaacc tgattgcggt gctgggcgaa catgatctga gcgaacatga tggcgatgaa 660

cagagccgcc gcgtggcgca ggtgattatt ccgagcacct atgtgccggg caccaccaac 720

catgatattg cgctgctgcg cctgcatcag ccggtggtgc tgaccgatca tgtggtgccg 780

ctgtgcctgc cggaacgcac ctttagcgaa cgcaccctgg cgtttgtgcg ctttagcctg 840

gtgagcggct ggggccagct gctggatcgc ggcgcgaccg cgctggaact gatggtgctg 900

aacgtgccgc gcctgatgac ccaggattgc ctgcagcaga gccgcaaagt gggcgatagc 960

ccgaacatta ccgaatatat gttttgcgcg ggctatagcg atggcagcaa agatagctgc 1020

aaaggcgata gcggcggccc gcatgcgacc cattatcgcg gcacctggta tctgaccggc 1080

attgtgagct ggggccaggg ctgcgcgacc gtgggccatt ttggcgtgta tacccgcgtg 1140

agccagtata ttgaatggct gcagaaactg atgcgcagcg aaccgcgccc gggcgtgctg 1200

ctgcgcgcgc cgtttccg 1218

<210> 157
<211> 406
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

[0123]

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly

85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

[0124]

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr

260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

[0125]

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro
405

<210> 158
<211> 6996
<212> DNA
<213> 智人

<400> 158

[0126]

gcgacccgcc gctattatct gggcgcggtg gaactgagct gggattatat gcagagcgat 60

ctgggcgaac tgccggtgga tgcgcgcttt ccgccgcgcg tgccgaaaag ctttccgttt 120

aacaccagcg tggtgtataa aaaaaccctg tttgtggaat ttaccgatca tctgtttaac 180

attgcgaaac cgcgcccgcc gtggatgggc ctgctgggcc cgaccattca ggcggaagtg 240

tatgataccg tggtgattac cctgaaaaac atggcgagcc atccggtgag cctgcatgcg 300

gtgggcgtga gctattggaa agcgagcgaa ggcgcggaat atgatgatca gaccagccag 360

cgcgaaaaag aagatgataa agtgtttccg ggcggcagcc atacctatgt gtggcaggtg 420

ctgaaagaaa acggcccgat ggcgagcgat ccgctgtgcc tgacctatag ctatctgagc 480

catgtggatc tggtgaaaga tctgaacagc ggcctgattg gcgcgctgct ggtgtgccgc 540

gaaggcagcc tggcgaaaga aaaaacccag accctgcata aatttattct gctgtttgcg 600

gtgtttgatg aaggcaaaag ctggcatagc gaaaccaaaa acagcctgat gcaggatcgc 660

gatgcggcga gcgcgcgcgc gtggccgaaa atgcataccg tgaacggcta tgtgaaccgc 720

agcctgccgg gcctgattgg ctgccatcgc aaaagcgtgt attggcatgt gattggcatg 780

ggcaccaccc cggaagtgca tagcattttt ctggaaggcc atacctttct ggtgcgcaac 840

catcgccagg cgagcctgga aattagcccg attacctttc tgaccgcgca gaccctgctg 900

atggatctgg gccagtttct gctgttttgc catattagca gccatcagca tgatggcatg 960

gaagcgtatg tgaaagtgga tagctgcccg gaagaaccgc agctgcgcat gaaaaacaac 1020

gaagaagcgg aagattatga tgatgatctg accgatagcg aaatggatgt ggtgcgcttt 1080

gatgatgata acagcccgag ctttattcag attcgcagcg tggcgaaaaa acatccgaaa 1140

acctgggtgc attatattgc ggcggaagaa gaagattggg attatgcgcc gctggtgctg 1200

gcgccggatg atcgcagcta taaaagccag tatctgaaca acggcccgca gcgcattggc 1260

cgcaaatata aaaaagtgcg ctttatggcg tataccgatg aaacctttaa aacccgcgaa 1320

gcgattcagc atgaaagcgg cattctgggc ccgctgctgt atggcgaagt gggcgatacc 1380

ctgctgatta tttttaaaaa ccaggcgagc cgcccgtata acatttatcc gcatggcatt 1440

accgatgtgc gcccgctgta tagccgccgc ctgccgaaag gcgtgaaaca tctgaaagat 1500

tttccgattc tgccgggcga aatttttaaa tataaatgga ccgtgaccgt ggaagatggc 1560

ccgaccaaaa gcgatccgcg ctgcctgacc cgctattata gcagctttgt gaacatggaa 1620

cgcgatctgg cgagcggcct gattggcccg ctgctgattt gctataaaga aagcgtggat 1680

cagcgcggca accagattat gagcgataaa cgcaacgtga ttctgtttag cgtgtttgat 1740

gaaaaccgca gctggtatct gaccgaaaac attcagcgct ttctgccgaa cccggcgggc 1800

gtgcagctgg aagatccgga atttcaggcg agcaacatta tgcatagcat taacggctat 1860

gtgtttgata gcctgcagct gagcgtgtgc ctgcatgaag tggcgtattg gtatattctg 1920

agcattggcg cgcagaccga ttttctgagc gtgtttttta gcggctatac ctttaaacat 1980

[0127]

aaaatggtgt atgaagatac cctgaccctg tttccgttta gcggcgaaac cgtgtttatg 2040

agcatggaaa acccgggcct gtggattctg ggctgccata acagcgattt tcgcaaccgc 2100

ggcatgaccg cgctgctgaa agtgagcagc tgcgataaaa acaccggcga ttattatgaa 2160

gatagctatg aagatattag cgcgtatctg ctgagcaaaa acaacgcgat tgaaccgcgc 2220

agctttagcc agaacagccg ccatccgagc acccgccaga aacagtttaa cgcgaccacc 2280

attccggaaa acgatattga aaaaaccgat ccgtggtttg cgcatcgcac cccgatgccg 2340

aaaattcaga acgtgagcag cagcgatctg ctgatgctgc tgcgccagag cccgaccccg 2400

catggcctga gcctgagcga tctgcaggaa gcgaaatatg aaacctttag cgatgatccg 2460

agcccgggcg cgattgatag caacaacagc ctgagcgaaa tgacccattt tcgcccgcag 2520

ctgcatcata gcggcgatat ggtgtttacc ccggaaagcg gcctgcagct gcgcctgaac 2580

gaaaaactgg gcaccaccgc ggcgaccgaa ctgaaaaaac tggattttaa agtgagcagc 2640

accagcaaca acctgattag caccattccg agcgataacc tggcggcggg caccgataac 2700

accagcagcc tgggcccgcc gagcatgccg gtgcattatg atagccagct ggataccacc 2760

ctgtttggca aaaaaagcag cccgctgacc gaaagcggcg gcccgctgag cctgagcgaa 2820

gaaaacaacg atagcaaact gctggaaagc ggcctgatga acagccagga aagcagctgg 2880

ggcaaaaacg tgagcagcac cgaaagcggc cgcctgttta aaggcaaacg cgcgcatggc 2940

ccggcgctgc tgaccaaaga taacgcgctg tttaaagtga gcattagcct gctgaaaacc 3000

aacaaaacca gcaacaacag cgcgaccaac cgcaaaaccc atattgatgg cccgagcctg 3060

ctgattgaaa acagcccgag cgtgtggcag aacattctgg aaagcgatac cgaatttaaa 3120

aaagtgaccc cgctgattca tgatcgcatg ctgatggata aaaacgcgac cgcgctgcgc 3180

ctgaaccata tgagcaacaa aaccaccagc agcaaaaaca tggaaatggt gcagcagaaa 3240

aaagaaggcc cgattccgcc ggatgcgcag aacccggata tgagcttttt taaaatgctg 3300

[0128]

tttctgccgg aaagcgcgcg ctggattcag cgcacccatg gcaaaaacag cctgaacagc 3360

ggccagggcc cgagcccgaa acagctggtg agcctgggcc cggaaaaaag cgtggaaggc 3420

cagaactttc tgagcgaaaa aaacaaagtg gtggtgggca aaggcgaatt taccaaagat 3480

gtgggcctga aagaaatggt gtttccgagc agccgcaacc tgtttctgac caacctggat 3540

aacctgcatg aaaacaacac ccataaccag gaaaaaaaaa ttcaggaaga aattgaaaaa 3600

aaagaaaccc tgattcagga aaacgtggtg ctgccgcaga ttcataccgt gaccggcacc 3660

aaaaacttta tgaaaaacct gtttctgctg agcacccgcc agaacgtgga aggcagctat 3720

gatggcgcgt atgcgccggt gctgcaggat tttcgcagcc tgaacgatag caccaaccgc 3780

accaaaaaac ataccgcgca ttttagcaaa aaaggcgaag aagaaaacct ggaaggcctg 3840

ggcaaccaga ccaaacagat tgtggaaaaa tatgcgtgca ccacccgcat tagcccgaac 3900

accagccagc agaactttgt gacccagcgc agcaaacgcg cgctgaaaca gtttcgcctg 3960

ccgctggaag aaaccgaact ggaaaaacgc attattgtgg atgataccag cacccagtgg 4020

agcaaaaaca tgaaacatct gaccccgagc accctgaccc agattgatta taacgaaaaa 4080

gaaaaaggcg cgattaccca gagcccgctg agcgattgcc tgacccgcag ccatagcatt 4140

ccgcaggcga accgcagccc gctgccgatt gcgaaagtga gcagctttcc gagcattcgc 4200

ccgatttatc tgacccgcgt gctgtttcag gataacagca gccatctgcc ggcggcgagc 4260

tatcgcaaaa aagatagcgg cgtgcaggaa agcagccatt ttctgcaggg cgcgaaaaaa 4320

aacaacctga gcctggcgat tctgaccctg gaaatgaccg gcgatcagcg cgaagtgggc 4380

agcctgggca ccagcgcgac caacagcgtg acctataaaa aagtggaaaa caccgtgctg 4440

ccgaaaccgg atctgccgaa aaccagcggc aaagtggaac tgctgccgaa agtgcatatt 4500

tatcagaaag atctgtttcc gaccgaaacc agcaacggca gcccgggcca tctggatctg 4560

gtggaaggca gcctgctgca gggcaccgaa ggcgcgatta aatggaacga agcgaaccgc 4620

[0129]

ccgggcaaag tgccgtttct gcgcgtggcg accgaaagca gcgcgaaaac cccgagcaaa 4680

ctgctggatc cgctggcgtg ggataaccat tatggcaccc agattccgaa agaagaatgg 4740

aaaagccagg aaaaaagccc ggaaaaaacc gcgtttaaaa aaaaagatac cattctgagc 4800

ctgaacgcgt gcgaaagcaa ccatgcgatt gcggcgatta acgaaggcca gaacaaaccg 4860

gaaattgaag tgacctgggc gaaacagggc cgcaccgaac gcctgtgcag ccagaacccg 4920

ccggtgctga aacgccatca gcgcgaaatt acccgcacca ccctgcagag cgatcaggaa 4980

gaaattgatt atgatgatac cattagcgtg gaaatgaaaa aagaagattt tgatatttat 5040

gatgaagatg aaaaccagag cccgcgcagc tttcagaaaa aaacccgcca ttattttatt 5100

gcggcggtgg aacgcctgtg ggattatggc atgagcagca gcccgcatgt gctgcgcaac 5160

cgcgcgcaga gcggcagcgt gccgcagttt aaaaaagtgg tgtttcagga atttaccgat 5220

ggcagcttta cccagccgct gtatcgcggc gaactgaacg aacatctggg cctgctgggc 5280

ccgtatattc gcgcggaagt ggaagataac attatggtga cctttcgcaa ccaggcgagc 5340

cgcccgtata gcttttatag cagcctgatt agctatgaag aagatcagcg ccagggcgcg 5400

gaaccgcgca aaaactttgt gaaaccgaac gaaaccaaaa cctatttttg gaaagtgcag 5460

catcatatgg cgccgaccaa agatgaattt gattgcaaag cgtgggcgta ttttagcgat 5520

gtggatctgg aaaaagatgt gcatagcggc ctgattggcc cgctgctggt gtgccatacc 5580

aacaccctga acccggcgca tggccgccag gtgaccgtgc aggaatttgc gctgtttttt 5640

accatttttg atgaaaccaa aagctggtat tttaccgaaa acatggaacg caactgccgc 5700

gcgccgtgca acattcagat ggaagatccg acctttaaag aaaactatcg ctttcatgcg 5760

attaacggct atattatgga taccctgccg ggcctggtga tggcgcagga tcagcgcatt 5820

cgctggtatc tgctgagcat gggcagcaac gaaaacattc atagcattca ttttagcggc 5880

catgtgttta ccgtgcgcaa aaaagaagaa tataaaatgg cgctgtataa cctgtatccg 5940

[0130]

ggcgtgtttg aaaccgtgga aatgctgccg agcaaagcgg gcatttggcg cgtggaatgc 6000

ctgattggcg aacatctgca tgcgggcatg agcaccctgt ttctggtgta tagcaacaaa 6060

tgccagaccc cgctgggcat ggcgagcggc catattcgcg attttcagat taccgcgagc 6120

ggccagtatg gccagtgggc gccgaaactg gcgcgcctgc attatagcgg cagcattaac 6180

gcgtggagca ccaaagaacc gtttagctgg attaaagtgg atctgctggc gccgatgatt 6240

attcatggca ttaaaaccca gggcgcgcgc cagaaattta gcagcctgta tattagccag 6300

tttattatta tgtatagcct ggatggcaaa aaatggcaga cctatcgcgg caacagcacc 6360

ggcaccctga tggtgttttt tggcaacgtg gatagcagcg gcattaaaca taacattttt 6420

aacccgccga ttattgcgcg ctatattcgc ctgcatccga cccattatag cattcgcagc 6480

accctgcgca tggaactgat gggctgcgat ctgaacagct gcagcatgcc gctgggcatg 6540

gaaagcaaag cgattagcga tgcgcagatt accgcgagca gctattttac caacatgttt 6600

gcgacctgga gcccgagcaa agcgcgcctg catctgcagg gccgcagcaa cgcgtggcgc 6660

ccgcaggtga acaacccgaa agaatggctg caggtggatt ttcagaaaac catgaaagtg 6720

accggcgtga ccacccaggg cgtgaaaagc ctgctgacca gcatgtatgt gaaagaattt 6780

ctgattagca gcagccagga tggccatcag tggaccctgt tttttcagaa cggcaaagtg 6840

aaagtgtttc agggcaacca ggatagcttt accccggtgg tgaacagcct ggatccgccg 6900

ctgctgaccc gctatctgcg cattcatccg cagagctggg tgcatcagat tgcgctgcgc 6960

atggaagtgc tgggctgcga agcgcaggat ctgtat 6996

<210> 159
<211> 2332
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159

[0131]

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

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

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

[0132]

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu

260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

[0133]

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile

435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

[0134]

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser

610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

[0135]

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro

785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

[0136]

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys

965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
980 985 990

Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
995 1000 1005

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
1040 1045 1050

[0137]

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
1115 1120 1125

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

1130 1135 1140

Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
1145 1150 1155

Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
1160 1165 1170

Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
1175 1180 1185

Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
1190 1195 1200

Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
1205 1210 1215

[0138]

Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
1220 1225 1230

Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
1235 1240 1245

Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
1250 1255 1260

His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
1265 1270 1275

Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
1280 1285 1290

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr

1295 1300 1305

Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu
1310 1315 1320

Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr
1325 1330 1335

Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
1340 1345 1350

Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser
1355 1360 1365

Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala
1370 1375 1380

[0139]

Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser
1385 1390 1395

Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser
1400 1405 1410

Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val
1415 1420 1425

Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu
1430 1435 1440

Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu
1445 1450 1455

Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys

1460 1465 1470

Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
1475 1480 1485

Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys
1490 1495 1500

Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu
1505 1510 1515

Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
1520 1525 1530

Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg
1535 1540 1545

[0140]

Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp
1550 1555 1560

Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu
1565 1570 1575

Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys
1580 1585 1590

Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His
1595 1600 1605

Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu
1610 1615 1620

Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln

1625 1630 1635

Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr
1640 1645 1650

Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile
1655 1660 1665

Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp
1670 1675 1680

Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr
1685 1690 1695

Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser
1700 1705 1710

[0141]

Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro
1715 1720 1725

Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe
1730 1735 1740

Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu
1745 1750 1755

Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
1760 1765 1770

Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
1775 1780 1785

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

1790 1795 1800

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys
1805 1810 1815

Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys
1820 1825 1830

Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His
1835 1840 1845

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
1850 1855 1860

Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu
1865 1870 1875

[0142]

Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu
1880 1885 1890

Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu
1895 1900 1905

Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly
1910 1915 1920

Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln
1925 1930 1935

Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile
1940 1945 1950

His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys

1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe
1970 1975 1980

Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val
1985 1990 1995

Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
2000 2005 2010

Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala
2015 2020 2025

Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr
2030 2035 2040

[0143]

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser
2045 2050 2055

Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val
2060 2065 2070

Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly
2075 2080 2085

Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile
2090 2095 2100

Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn
2105 2110 2115

Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser

2120 2125 2130

Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr
2135 2140 2145

Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg
2150 2155 2160

Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu
2165 2170 2175

Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser
2180 2185 2190

Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
2195 2200 2205

[0144]

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp

2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 160
<211> 1245
<212> DNA
<213> 智人

<400> 160

[0145]

tataattcag gtaaattgga agagtttgtt caagggaacc ttgagagaga atgtatggaa 60

gaaaagtgta gttttgaaga agcacgagaa gtttttgaaa acactgaaag aacaactgaa 120

ttttggaagc agtatgttga tggagatcag tgtgagtcca atccatgttt aaatggcggc 180

agttgcaagg atgacattaa ttcctatgaa tgttggtgtc cctttggatt tgaaggaaag 240

aactgtgaat tagatgtaac atgtaacatt aagaatggca gatgcgagca gttttgtaaa 300

aatagtgctg ataacaaggt ggtttgctcc tgtactgagg gatatcgact tgcagaaaac 360

cagaagtcct gtgaaccagc agtgccattt ccatgtggaa gagtttctgt ttcacaaact 420

tctaagctca cccgtgctga ggctgttttt cctgatgtgg actatgtaaa ttctactgaa 480

gctgaaacca ttttggataa catcactcaa agcacccaat catttaatga cttcactcgg 540

gttgttggtg gagaagatgc caaaccaggt caattcccct ggcaggttgt tttgaatggt 600

aaagttgatg cattctgtgg aggctctatc gttaatgaaa aatggattgt aactgctgcc 660

cactgtgttg aaactggtgt taaaattaca gttgtcgcag gtgaacataa tattgaggag 720

acagaacata cagagcaaaa gcgaaatgtg attcgaatta ttcctcacca caactacaat 780

gcagctatta ataagtacaa ccatgacatt gcccttctgg aactggacga acccttagtg 840

ctaaacagct acgttacacc tatttgcatt gctgacaagg aatacacgaa catcttcctc 900

aaatttggat ctggctatgt aagtggctgg ggaagagtct tccacaaagg gagatcagct 960

ttagttcttc agtaccttag agttccactt gttgaccgag ccacatgtct tcgatctaca 1020

aagttcacca tctataacaa catgttctgt gctggcttcc atgaaggagg tagagattca 1080

tgtcaaggag atagtggggg accccatgtt actgaagtgg aagggaccag tttcttaact 1140

ggaattatta gctggggtga agagtgtgca atgaaaggca aatatggaat atataccaag 1200

gtatcccggt atgtcaactg gattaaggaa aaaacaaagc tcact 1245

<210> 161
<211> 415
[0146] <212> PRT
<213> 智人

<400> 161

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys

65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

[0147]

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His

245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
275 280 285

Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
290 295 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305 310 315 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
325 330 335

[0148]

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
340 345 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
355 360 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
370 375 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385 390 395 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
405 410 415

<210> 162

<211> 1344
<212> DNA
<213> 智人

<400> 162

[0149]

gcgaacagct ttctggaaga aatgaaaaaa ggccatctgg aacgcgaatg catggaagaa 60

acctgcagct atgaagaagc gcgcgaagtg tttgaagata gcgataaaac caacgaattt 120

tggaacaaat ataaagatgg cgatcagtgc gaaaccagcc cgtgccagaa ccagggcaaa 180

tgcaaagatg gcctgggcga atatacctgc acctgcctgg aaggctttga aggcaaaaac 240

tgcgaactgt ttacccgcaa actgtgcagc ctggataacg gcgattgcga tcagttttgc 300

catgaagaac agaacagcgt ggtgtgcagc tgcgcgcgcg gctataccct ggcggataac 360

ggcaaagcgt gcattccgac cggcccgtat ccgtgcggca aacagaccct ggaacgccgc 420

aaacgcagcg tggcgcaggc gaccagcagc agcggcgaag cgccggatag cattacctgg 480

aaaccgtatg atgcggcgga tctggatccg accgaaaacc cgtttgatct gctggatttt 540

aaccagaccc agccggaacg cggcgataac aacctgaccc gcattgtggg cggccaggaa 600

tgcaaagatg gcgaatgccc gtggcaggcg ctgctgatta acgaagaaaa cgaaggcttt 660

tgcggcggca ccattctgag cgaattttat attctgaccg cggcgcattg cctgtatcag 720

gcgaaacgct ttaaagtgcg cgtgggcgat cgcaacaccg aacaggaaga aggcggcgaa 780

gcggtgcatg aagtggaagt ggtgattaaa cataaccgct ttaccaaaga aacctatgat 840

tttgatattg cggtgctgcg cctgaaaacc ccgattacct ttcgcatgaa cgtggcgccg 900

gcgtgcctgc cggaacgcga ttgggcggaa agcaccctga tgacccagaa aaccggcatt 960

gtgagcggct ttggccgcac ccatgaaaaa ggccgccaga gcacccgcct gaaaatgctg 1020

gaagtgccgt atgtggatcg caacagctgc aaactgagca gcagctttat tattacccag 1080

aacatgtttt gcgcgggcta tgataccaaa caggaagatg cgtgccaggg cgatagcggc 1140

ggcccgcatg tgacccgctt taaagatacc tattttgtga ccggcattgt gagctggggc 1200

gaaggctgcg cgcgcaaagg caaatatggc atttatacca aagtgaccgc gtttctgaaa 1260

tggattgatc gcagcatgaa aacccgcggc ctgccgaaag cgaaaagcca tgcgccggaa 1320

gtgattacca gcagcccgct gaaa 1344

<210> 163
<211> 448
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

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

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

[0150]

Asp Ser Asp Lys Thr Asn Glu Phe Trp Asn Lys Tyr Lys Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Glu Thr Ser Pro Cys Gln Asn Gln Gly Lys Cys Lys Asp Gly
50 55 60

Leu Gly Glu Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Glu Gly Phe Glu Gly Lys Asn
65 70 75 80

Cys Glu Leu Phe Thr Arg Lys Leu Cys Ser Leu Asp Asn Gly Asp Cys
85 90 95

Asp Gln Phe Cys His Glu Glu Gln Asn Ser Val Val Cys Ser Cys Ala
100 105 110

Arg Gly Tyr Thr Leu Ala Asp Asn Gly Lys Ala Cys Ile Pro Thr Gly

115 120 125

Pro Tyr Pro Cys Gly Lys Gln Thr Leu Glu Arg Arg Lys Arg Ser Val
130 135 140

Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile Thr Trp
145 150 155 160

Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro Phe Asp
165 170 175

Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn Asn Leu
180 185 190

Thr Arg Ile Val Gly Gly Gln Glu Cys Lys Asp Gly Glu Cys Pro Trp
195 200 205

[0151]

Gln Ala Leu Leu Ile Asn Glu Glu Asn Glu Gly Phe Cys Gly Gly Thr
210 215 220

Ile Leu Ser Glu Phe Tyr Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Tyr Gln
225 230 235 240

Ala Lys Arg Phe Lys Val Arg Val Gly Asp Arg Asn Thr Glu Gln Glu
245 250 255

Glu Gly Gly Glu Ala Val His Glu Val Glu Val Val Ile Lys His Asn
260 265 270

Arg Phe Thr Lys Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Ile Ala Val Leu Arg Leu
275 280 285

Lys Thr Pro Ile Thr Phe Arg Met Asn Val Ala Pro Ala Cys Leu Pro

290 295 300

Glu Arg Asp Trp Ala Glu Ser Thr Leu Met Thr Gln Lys Thr Gly Ile
305 310 315 320

Val Ser Gly Phe Gly Arg Thr His Glu Lys Gly Arg Gln Ser Thr Arg
325 330 335

Leu Lys Met Leu Glu Val Pro Tyr Val Asp Arg Asn Ser Cys Lys Leu
340 345 350

Ser Ser Ser Phe Ile Ile Thr Gln Asn Met Phe Cys Ala Gly Tyr Asp
355 360 365

Thr Lys Gln Glu Asp Ala Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
370 375 380

[0152]

Thr Arg Phe Lys Asp Thr Tyr Phe Val Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly
385 390 395 400

Glu Gly Cys Ala Arg Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Thr
405 410 415

Ala Phe Leu Lys Trp Ile Asp Arg Ser Met Lys Thr Arg Gly Leu Pro
420 425 430

Lys Ala Lys Ser His Ala Pro Glu Val Ile Thr Ser Ser Pro Leu Lys
435 440 445

<210> 164
<211> 1821
<212> DNA
<213> 智人

<400> 164

gaatgcgtga cccagctgct gaaagatacc tgctttgaag gcggcgatat taccaccgtg 60

tttaccccga gcgcgaaata ttgccaggtg gtgtgcacct atcatccgcg ctgcctgctg 120

tttaccttta ccgcggaaag cccgagcgaa gatccgaccc gctggtttac ctgcgtgctg 180

aaagatagcg tgaccgaaac cctgccgcgc gtgaaccgca ccgcggcgat tagcggctat 240

agctttaaac agtgcagcca tcagattagc gcgtgcaaca aagatattta tgtggatctg 300

gatatgaaag gcattaacta taacagcagc gtggcgaaaa gcgcgcagga atgccaggaa 360

cgctgcaccg atgatgtgca ttgccatttt tttacctatg cgacccgcca gtttccgagc 420

ctggaacatc gcaacatttg cctgctgaaa catacccaga ccggcacccc gacccgcatt 480

accaaactgg ataaagtggt gagcggcttt agcctgaaaa gctgcgcgct gagcaacctg 540

gcgtgcattc gcgatatttt tccgaacacc gtgtttgcgg atagcaacat tgatagcgtg 600

[0153] atggcgccgg atgcgtttgt gtgcggccgc atttgcaccc atcatccggg ctgcctgttt 660

tttacctttt ttagccagga atggccgaaa gaaagccagc gcaacctgtg cctgctgaaa 720

accagcgaaa gcggcctgcc gagcacccgc attaaaaaaa gcaaagcgct gagcggcttt 780

agcctgcaga gctgccgcca tagcattccg gtgttttgcc atagcagctt ttatcatgat 840

accgattttc tgggcgaaga actggatatt gtggcggcga aaagccatga agcgtgccag 900

aaactgtgca ccaacgcggt gcgctgccag ttttttacct ataccccggc gcaggcgagc 960

tgcaacgaag gcaaaggcaa atgctatctg aaactgagca gcaacggcag cccgaccaaa 1020

attctgcatg gccgcggcgg cattagcggc tataccctgc gcctgtgcaa aatggataac 1080

gaatgcacca ccaaaattaa accgcgcatt gtgggcggca ccgcgagcgt gcgcggcgaa 1140

tggccgtggc aggtgaccct gcataccacc agcccgaccc agcgccatct gtgcggcggc 1200

agcattattg gcaaccagtg gattctgacc gcggcgcatt gcttttatgg cgtggaaagc 1260

ccgaaaattc tgcgcgtgta tagcggcatt ctgaaccaga gcgaaattaa agaagatacc 1320

agctttttg gcgtgcagga aattattatt catgatcagt ataaaatggc ggaaagcggc 1380

tatgatattg cgctgctgaa actggaaacc accgtgaact ataccgatag ccagcgcccg 1440

atttgcctgc cgagcaaagg cgatcgcaac gtgatttata ccgattgctg ggtgaccggc 1500

tggggctatc gcaaactgcg cgataaaatt cagaacaccc tgcagaaagc gaaaattccg 1560

ctggtgacca acgaagaatg ccagaaacgc tatcgcggcc ataaaattac ccataaaatg 1620

atttgcgcgg gctatcgcga aggcggcaaa gatgcgtgca aaggcgatag cggcggcccg 1680

ctgagctgca aacataacga agtgtggcat ctggtgggca ttaccagctg gggcgaaggc 1740

tgcgcgcagc gcgaacgccc gggcgtgtat accaacgtgg tggaatatgt ggattggatt 1800

ctggaaaaaa cccaggcggt g 1821

[0154]

<210> 165
<211> 607
<212> PRT
<213> 智人

<400> 165

Glu Cys Val Thr Gln Leu Leu Lys Asp Thr Cys Phe Glu Gly Gly Asp
1 5 10 15

Ile Thr Thr Val Phe Thr Pro Ser Ala Lys Tyr Cys Gln Val Val Cys
20 25 30

Thr Tyr His Pro Arg Cys Leu Leu Phe Thr Phe Thr Ala Glu Ser Pro
35 40 45

Ser Glu Asp Pro Thr Arg Trp Phe Thr Cys Val Leu Lys Asp Ser Val
50 55 60

Thr Glu Thr Leu Pro Arg Val Asn Arg Thr Ala Ala Ile Ser Gly Tyr

65 70 75 80

Ser Phe Lys Gln Cys Ser His Gln Ile Ser Ala Cys Asn Lys Asp Ile
85 90 95

Tyr Val Asp Leu Asp Met Lys Gly Ile Asn Tyr Asn Ser Ser Val Ala
100 105 110

Lys Ser Ala Gln Glu Cys Gln Glu Arg Cys Thr Asp Asp Val His Cys
115 120 125

His Phe Phe Thr Tyr Ala Thr Arg Gln Phe Pro Ser Leu Glu His Arg
130 135 140

Asn Ile Cys Leu Leu Lys His Thr Gln Thr Gly Thr Pro Thr Arg Ile
145 150 155 160

[0155]

Thr Lys Leu Asp Lys Val Val Ser Gly Phe Ser Leu Lys Ser Cys Ala
165 170 175

Leu Ser Asn Leu Ala Cys Ile Arg Asp Ile Phe Pro Asn Thr Val Phe
180 185 190

Ala Asp Ser Asn Ile Asp Ser Val Met Ala Pro Asp Ala Phe Val Cys
195 200 205

Gly Arg Ile Cys Thr His His Pro Gly Cys Leu Phe Phe Thr Phe Phe
210 215 220

Ser Gln Glu Trp Pro Lys Glu Ser Gln Arg Asn Leu Cys Leu Leu Lys
225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Ser Gly Phe Ser Leu Gln Ser Cys Arg His Ser Ile Pro Val Phe
260 265 270

Cys His Ser Ser Phe Tyr His Asp Thr Asp Phe Leu Gly Glu Glu Leu
275 280 285

Asp Ile Val Ala Ala Lys Ser His Glu Ala Cys Gln Lys Leu Cys Thr
290 295 300

Asn Ala Val Arg Cys Gln Phe Phe Thr Tyr Thr Pro Ala Gln Ala Ser
305 310 315 320

Cys Asn Glu Gly Lys Gly Lys Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Ser Asn Gly
325 330 335

[0156]

Ser Pro Thr Lys Ile Leu His Gly Arg Gly Gly Ile Ser Gly Tyr Thr
340 345 350

Leu Arg Leu Cys Lys Met Asp Asn Glu Cys Thr Thr Lys Ile Lys Pro
355 360 365

Arg Ile Val Gly Gly Thr Ala Ser Val Arg Gly Glu Trp Pro Trp Gln
370 375 380

Val Thr Leu His Thr Thr Ser Pro Thr Gln Arg His Leu Cys Gly Gly
385 390 395 400

Ser Ile Ile Gly Asn Gln Trp Ile Leu Thr Ala Ala His Cys Phe Tyr
405 410 415

Gly Val Glu Ser Pro Lys Ile Leu Arg Val Tyr Ser Gly Ile Leu Asn

420 425 430

Gln Ser Glu Ile Lys Glu Asp Thr Ser Phe Phe Gly Val Gln Glu Ile
435 440 445

Ile Ile His Asp Gln Tyr Lys Met Ala Glu Ser Gly Tyr Asp Ile Ala
450 455 460

Leu Leu Lys Leu Glu Thr Thr Val Asn Tyr Thr Asp Ser Gln Arg Pro
465 470 475 480

Ile Cys Leu Pro Ser Lys Gly Asp Arg Asn Val Ile Tyr Thr Asp Cys
485 490 495

Trp Val Thr Gly Trp Gly Tyr Arg Lys Leu Arg Asp Lys Ile Gln Asn
500 505 510

[0157]

Thr Leu Gln Lys Ala Lys Ile Pro Leu Val Thr Asn Glu Glu Cys Gln
515 520 525

Lys Arg Tyr Arg Gly His Lys Ile Thr His Lys Met Ile Cys Ala Gly
530 535 540

Tyr Arg Glu Gly Gly Lys Asp Ala Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro
545 550 555 560

Leu Ser Cys Lys His Asn Glu Val Trp His Leu Val Gly Ile Thr Ser
565 570 575

Trp Gly Glu Gly Cys Ala Gln Arg Glu Arg Pro Gly Val Tyr Thr Asn
580 585 590

Val Val Glu Tyr Val Asp Trp Ile Leu Glu Lys Thr Gln Ala Val

595 600 605

<210> 166
<211> 750
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 0012LC.C36A-HPC4

<400> 166
atgaagttgc ctgttgggct gttggtgctg atgttctgga ttccagcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttgtacac agaaatggaa acacctattt tcattgggcc 180

ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

[0158]

agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tgttccgtac 360

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgtacgg tggctgcacc atctgtcttc 420

atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 480

aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 540

ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc 600

agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc 660

acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga gtgtgaggac 720

caggtggacc ccagactgat cgacggcaag 750

<210> 167
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0012LC.C36A-HPC4

<400> 167

Met Lys Leu Pro Val Gly Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

Val His Arg Asn Gly Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro
50 55 60

[0159] Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
100 105 110

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn
165 170 175

Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala
195 200 205

Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly
210 215 220

Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Asp
225 230 235 240

[0160] Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
245 250

<210> 168
<211> 735
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 0012VH-CH1-HPC4

<400> 168
atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctatacgcca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaag aggaccaggt ggaccccaga 720

ctgatcgacg gcaag 735

<210> 169
<211> 245
<212> PRT
<213> 人工序列

[0161]

<220>
<223> 0012VH-CH1-HPC4

<400> 169

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro

65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

[0162]

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Glu Asp Gln Val Asp Pro Arg
225 230 235 240

Leu Ile Asp Gly Lys

245

<210> 170
<211> 714
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 0012VH.T60N-CH1-YGPPC

<400> 170

[0163]

atggattttg ggctgatttt ttttattgtt gctcttttaa aaggggtcca gtgtgaggtg 60

aaacttctcg agtctggagg tggcctggtg cagcctggag gatccctgaa actctcctgt 120

gcagcctcag gattcgattt tagtagatac tggatgactt gggtccggca ggctccaggg 180

aaagggctag aatggattgg agaaattaat ccagatagca gtacgataaa ctataaccca 240

tctctaaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca agaatacgct gtacctgcaa 300

atgagcgaag tgagatctga ggacacagcc ctttattact gtgcaagcgg ggtgtttact 360

tcctggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgcagcta gcaccaaggg cccatccgtc 420

ttcccccctgg cgccctgctc caggagcacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg 480

gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc 540

ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg 600

gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag 660

cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atggtccccc atgc 714

<210> 171
<211> 238
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0012VH.T60N-CH1-YGPPC

<400> 171

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
35 40 45

Arg Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Asn Pro
65 70 75 80

[0164]

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Glu Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
100 105 110

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

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

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly

165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
225 230 235

[0165]

<210> 172
<211> 2091
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-L4b-0012LC

<400> 172
atgcagcgcg tgaacatgat catggcagaa tcaccaggcc tcatcaccat ctgcctttta 60

ggatatctac tcagtgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatt 120

ctgaatcggc caaagaggta taattcaggt aaattggaag agtttgttca agggaacctt 180

gagagagaat gtatggaaga aaagtgtagt tttgaagaag cacgagaagt ttttgaaaac 240

actgaaagaa caactgaatt ttggaagcag tatgttgatg gagatcagtg tgagtccaat 300

ccatgtttaa atggcggcag ttgcaaggat gacattaatt cctatgaatg ttggtgtccc 360

tttggatttg aaggaaagaa ctgtgaatta gatgtaacat gtaacattaa gaatggcaga 420

tgcgagcagt tttgtaaaaa tagtgctgat aacaaggtgg tttgctcctg tactgaggga 480

tatcgacttg cagaaaacca gaagtcctgt gaaccagcag tgccatttcc atgtggaaga 540

gtttctgttt cacaaacttc taagctcacc cgtgctgagg ctgtttttcc tgatgtggac 600

tatgtaaatt ctactgaagc tgaaaccatt ttggataaca tcactcaaag cacccaatca 660

tttaatgact tcactcgggt tgttggtgga gaagatgcca aaccaggtca attcccttgg 720

caggttgttt tgaatggtaa agttgatgca ttctgtggag gctctatcgt taatgaaaaa 780

tggattgtaa ctgctgccca ctgtgttgaa actggtgtta aaattacagt tgtcgcaggt 840

gaacataata ttgaggagac agaacataca gagcaaaagc gaaatgtgat tcgaattatt 900

cctcaccaca actacaatgc agctattaat aagtacaacc atgacattgc ccttctggaa 960

ctggacgaac ccttagtgct aaacagctac gttacaccta tttgcattgc tgacaaggaa 1020

tacacgaaca tcttcctcaa atttggatct ggctatgtaa gtggctgggg aagagtcttc 1080

cacaaaggga gatcagcttt agttcttcag taccttagag ttccacttgt tgaccgagcc 1140

[0166]

acatgtcttc gatctacaaa gttcaccatc tataacaaca tgttctgtgc tggcttccat 1200

gaaggaggta gagattcatg tcaaggagat agtgggggac cccatgttac tgaagtggaa 1260

gggaccagtt tcttaactgg aattattagc tggggtgaag agtgtgcaat gaaaggcaaa 1320

tatggaatat ataccaaggt atcccggtat gtcaactgga ttaaggaaaa aacaaagctc 1380

actggaggtg gcgggtctgg tggcgggggа tcaggcgggg gaggttccgg atccgatgtt 1440

gtgatgaccc aaactccact ctccctgcct gtcagtcttg gagatcaagc ctccatctct 1500

tgcagatcta gtcagagcct tgtacacaga aatggaaaca cctattttca ttggtgcctg 1560

cagaaaccag gccagtctcc aaagctcctg atctacaaag tttccaaccg attttctggg 1620

gtcccagaca ggttcagtgg cagtggatca gggacagatt tcacactcaa gatcagcaga 1680

gtggaggctg aggatctggg agtttatttc tgctctcaaa gtacacatgt tccgtacacg 1740

ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcatc 1800

ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat 1860

aacttctatc ccagagaggc caaagtacag tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt 1920

aactcccagg agagtgtcac agagcaggac agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc 1980

accctgacgc tgagcaaagc agactacgag aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc 2040

catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag agcttcaaca ggggagagtg t 2091

<210> 173
<211> 697
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-L4b-0012LC

<400> 173

[0167] Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

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

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

[0168]

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

[0169]

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Val
465 470 475 480

Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln
485 490 495

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly
500 505 510

Asn Thr Tyr Phe His Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
515 520 525

[0170] Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
530 535 540

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
545 550 555 560

Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His
565 570 575

Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
580 585 590

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
595 600 605

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
610 615 620

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
625 630 635 640

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
645 650 655

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
660 665 670

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
675 680 685

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 174
[0171] <211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0003Fab LC=0062LC-HPC4

<400> 174

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys Phe Gln
1 5 10 15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val

50 55 60

Lys Leu Leu Ile Phe Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Thr
100 105 110

Lys Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Met Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

[0172]

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Asp Gln Val Asp Pro

225 230 235 240

Arg Leu Ile Asp Gly Lys
245

<210> 175
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0003Fab VH-CH1-YGPPC=0062VH-CH1-YGPPC

<400> 175

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

[0173] Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Ser Ser His Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe
115 120 125

Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
[0174] 195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu
225 230 235 240

Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
245

<210> 176
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0051VH-CH1-YGPPC（0074Fab 的一部分）

<400> 176

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Ser Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Val Arg Tyr Asn
65 70 75 80

[0175]

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Ala Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Met Ile Thr Thr Gly Ala Trp Phe Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro

165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
245

[0176]

<210> 177
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0051LC-HPC4 (0074Fab 的一部分)

<400> 177

Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
20 25 30

Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35 40 45

Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

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

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85 90 95

Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Glu Arg
115 120 125

[0177]

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu Asp Gln Val Asp Pro
225 230 235 240

Arg Leu Ile Asp Gly Lys
245

<210> 178
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0023VH-CH1-YGPPC (0004Fab 的一部分)

<400> 178

Met Asn Leu Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

[0178]

Val Gln Cys Glu Val Arg Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asp Tyr Phe Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Asp Ser Ser Ser Tyr Pro
65 70 75 80

Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met

100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Asn Lys Asn Trp Asp Asp Tyr Tyr Asp Met Asp
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
130 135 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
145 150 155 160

Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
165 170 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
180 185 190

[0179]

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn
210 215 220

Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser
225 230 235 240

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
245

<210> 179
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 0023LC-HPC4 (0004Fab 的一部分)

<400> 179

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Ser Cys Gly Asp Ile Val Val Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

[0180] Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

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

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Glu
225 230 235 240

Asp Gln Val Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
[0181] 245 250

<210> 180
<211> 696
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 FVII-L4b-0062VH-CH1-HPC4

<400> 180

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

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

35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

[0182]

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile

210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

[0183]

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val

385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gln Val Gln
450 455 460

Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Pro Met Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys
465 470 475 480

[0184]

Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser His Trp Ile Glu
485 490 495

Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile
500 505 510

Leu Pro Gly Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys Gly Lys
515 520 525

Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu
530 535 540

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly
545 550 555 560

Tyr Tyr Gly Leu Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly

565 570 575

Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
580 585 590

Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu
595 600 605

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
610 615 620

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
625 630 635 640

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
645 650 655

[0185]

Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro
660 665 670

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Glu Asp Gln Val
675 680 685

Asp Pro Arg Leu Ile Asp Gly Lys
690 695

<210> 181
<211> 407
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人 FVII-407C (C-末端半胱氨酸)

<400> 181

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

[0186]

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
115 120 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
130 135 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145 150 155 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
165 170 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
180 185 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
195 200 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
210 215 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225 230 235 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
245 250 255

[0187] His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
260 265 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
275 280 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
290 295 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro Cys
405

<210> 182
<211> 697
<212> PRT
<213> 人工序列

[0188] <220>
<223> 人 FIX-L4b-0061LC

<400> 182

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

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

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn

65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

[0189]

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile

245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

[0190]

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly

420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Gly Gly Gly
450 455 460

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Asp Val
465 470 475 480

Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln
485 490 495

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Arg Asn Gly
500 505 510

[0191]

Asn Thr Tyr Phe His Trp Ala Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys
515 520 525

Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg
530 535 540

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg
545 550 555 560

Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser Thr His
565 570 575

Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr
580 585 590

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu

595 600 605

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro
610 615 620

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
625 630 635 640

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr
[0192] 645 650 655

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His
660 665 670

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
675 680 685

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

```
     M  G  L  T  L  L  L  L  L  L  G  L  E  G  Q  G  I
   1 ATGGGCCTC ACCCTGCTC TTGCTGCTG CTCCTGGGA CTAGAAGGT CAGGGCATA

     V  G  S  L  P  E  V  L  Q  A  P  V  G  S  S  I  L  V
  55 GTTGGCAGC CTCCCTGAG GTGCTGCAG GCACCCGTG GGAAGCTCC ATTCTGGTG

     Q  C  H  Y  R  L  Q  D  V  K  A  Q  K  V  W  C  R  F
 109 CAGTGCCAC TACAGGCTC CAGGATGTC AAAGCTCAG AAGGTGTGG TGCCGGTTC

     L  P  E  G  C  Q  P  L  V  S  S  A  V  D  R  R  A  P
 163 TTGCCGGAG GGGTGCCAG CCCCTGGTG TCCTCAGCT GTGGATCGC AGAGCTCCG

     A  G  R  R  T  F  L  T  D  L  G  G  G  L  L  Q  V  E
 217 GCGGGCAGG CGTACGTTT CTCACAGAC CTGGGTGGG GGCCTGCTG CAGGTGGAA

     M  V  T  L  Q  E  E  D  A  G  E  Y  G  C  M  V  D  G
 271 ATGGTTACC CTGCAGGAA GAGGATGCT GGCGAGTAT GGCTGCATG GTGGATGGG

     A  R  G  P  Q  I  L  H  R  V  S  L  N  I  L  P  P  E
 325 GCCAGGGGG CCCCAGATT TTGCACAGA GTCTCTCTG AACATACTG CCCCCAGAG

     E  E  E  E  T  H  K  I  G  S  L  A  E  N  A  F  S  D
 379 GAAGAAGAA GAGACCCAT AAGATTGGC AGTCTGGCT GAGAACGCA TTCTCAGAC

     P  A  G  S  A  N  P  L  E  P  S  Q  D  E  K  S  I  P
 433 CCTGCAGGC AGTGCCAAC CCTTTGGAA CCCAGCCAG GATGAGAAG AGCATCCCC

     L  I  W  G  A  V  L  L  V  G  L  L  V  A  A  V  V  L
 487 TTGATCTGG GGTGCTGTG CTCCTGGTA GGTCTGCTG GTGGCAGCG GTGGTGCTG

     F  A  V  M  A  K  R  K  Q  G  N  R  L  G  V  C  G  R
 541 TTTGCTGTG ATGGCCAAG AGGAAACAA GGGAACAGG CTTGGTGTC TGTGGCCGA

     F  L  S  S  R  V  S  G  M  N  P  S  S  V  V  H  H  V
 595 TTCCTGAGC AGCAGAGTT TCAGGCATG AATCCCTCC TCAGTGGTC CACCACGTC

     S  D  S  G  P  A  A  E  L  P  L  D  V  P  H  I  R  L
 649 AGTGACTCT GGACCGGCT GCTGAATTG CCTTTGGAT GTACCACAC ATTAGGCTT

     D  S  P  P  S  F  D  N  T  T  Y  T  S  L  P  L  D  S
 703 GACTCACCA CCTTCATTT GACAATACC ACCTACACC AGCCTACCT CTTGATTCC

     P  S  G  K  P  S  L  P  A  P  S  S  L  P  P  L  P  P
 757 CCATCAGGA AAACCTTCA CTCCCAGCT CCATCCTCA TTGCCCCCT CTACCTCCT

     K  V  L  V  C  S  K  P  V  T  Y  A  T  V  I  F  P  G
 811 AAGGTCCTG GTCTGCTCC AAGCCTGTG ACATATGCC ACAGTAATC TTCCCGGGA

     G  N  K  G  G  G  T  S  C  G  P  A  Q  N  P  P  N  N
 865 GGGAACAAG GGTGGAGGG ACCTCGTGT GGGCCAGCC CAGAATCCA CCTAACAAT

     Q  T  P  S  S
 919 CAGACTCCA TCCAGC
```

图 1

```
      HindIII          M   G   L   T   L   L   L   L   L   L   G   L
    1 AAGCTTGCC GCCACCATG GGCCTCACC CTGCTCTTG CTGCTGCTC CTGGGACTA
        E   G   Q   G   I   V   G   S   L   P   E   V   L   Q   A   P   V   G
   55 GAAGGTCAG GGCATAGTT GGCAGCCTC CCTGAGGTG CTGCAGGCA CCCGTGGGA
        S   S   I   L   V   Q   C   H   Y   R   L   Q   D   V   K   A   Q   K
  109 AGCTCCATT CTGGTGCAG TGCCACTAC AGGCTCCAG GATGTCAAA GCTCAGAAG
        V   W   C   R   F   L   P   E   G   C   Q   P   L   V   S   S   A   V
  163 GTGTGGTGC CGGTTCTTG CCGGAGGGG TGCCAGCCC CTGGTGTCC TCAGCTGTG
        D   R   R   A   P   A   G   R   R   T   F   L   T   D   L   G   G   G
  217 GATCGCAGA GCTCCGGCG GGCAGGCGT ACGTTTCTC ACAGACCTG GGTGGGGGC
        L   L   Q   V   E   M   V   T   L   Q   E   E   D   A   G   E   Y   G
  271 CTGCTGCAG GTGGAAATG GTTACCCTG CAGGAAGAG GATGCTGGC GAGTATGGC
        C   M   V   D   G   A   R   G   P   Q   I   L   H   R   V   S   L   N
  325 TGCATGGTG GATGGGGCC AGGGGGCCC CAGATTTTG CACAGAGTC TCTCTGAAC
        I   L   P   P   E   E   E   E   E   T   H   K   I   G   S   L   A   E
  379 ATACTGCCC CCAGAGGAA GAAGAAGAG ACCCATAAG ATTGGCAGT CTGGCTGAG
        N   A   F   S   D   P   A   G   S   A   N   P   L   E   P   S   Q   D
  433 AACGCATTC TCAGACCCT GCAGGCAGT GCCAACCCT TTGGAACCC AGCCAGGAT

        E   K   S   I   P  H   H   H   H   H   H   *  EcoRI
  487 GAGAAGAGC ATCCCCCAC CATCACCAT CACCATTAA GAATTC
```

图 2

A

```
      M  K  L   P  V  G   L  L  V   L  M  F   W  I  P   A  S  S
  1  ATGAAGTTG CCTGTTGGG CTGTTGGTG CTGATGTTC TGGATTCCA GCTTCCAGC

      S  D  V   V  M  T   Q  T  P   L  S  L   P  V  S   L  G  D
 55  AGTGATGTT GTGATGACC CAAACTCCA CTCTCCCTG CCTGTCAGT CTTGGAGAT

      Q  A  S   I  S  C   R  S  S   Q  S  L   V  H  R   N  G  N
109  CAAGCCTCC ATCTCTTGC AGATCTAGT CAGAGCCTT GTACACAGA AATGGAAAC

      T  Y  F   H  W  C   L  Q  K   P  G  Q   S  P  K   L  L  I
163  ACCTATTTT CATTGGTGC CTGCAGAAA CCAGGCCAG TCTCCAAAG CTCCTGATC

      Y  K  V   S  N  R   F  S  G   V  P  D   R  F  S   G  S  G
217  TACAAAGTT TCCAACCGA TTTTCTGGG GTCCCAGAC AGGTTCAGT GGCAGTGGA

      S  G  T   D  F  T   L  K  I   S  R  V   E  A  E   D  L  G
271  TCAGGGACA GATTTCACA CTCAAGATC AGCAGAGTG GAGGCTGAG GATCTGGGA

      V  Y  F   C  S  Q   S  T  H   V  P  Y   T  F  G   G  G  T
325  GTTTATTTC TGCTCTCAA AGTACACAT GTTCCGTAC ACGTTCGGA GGGGGGACC

      K  L  E   I  K  R
379  AAGCTGGAA ATAAAACGT
```

B

```
         1         2                  3         4         5         6
1234567890123456789012345678ABCDEF8901234567890123456789012345678901234567890
DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHR-NGNTYFHWCLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPD

         7         8         9                  10
1234567890123456789012345678901234AB67890123456789012345678901234567890
RFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP--YTFGGGTKLEIKR
```

Kabat
0012LC-V
Kabat
0012LC-V

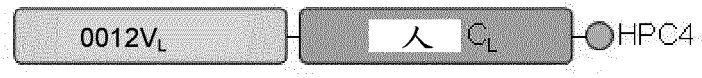
C

```
      M  D  F   G  L  I   F  F  I   V  A  L   L  K  G   V  Q  C
  1  ATGGATTTT GGGCTGATT TTTTTTATT GTTGCTCTT TTAAAAGGG GTCCAGTGT

      E  V  K   L  L  E   S  G  G   G  L  V   Q  P  G   G  S  L
 55  GAGGTGAAA CTTCTCGAG TCTGGAGGT GGCCTGGTG CAGCCTGGA GGATCCCTG

      K  L  S   C  A  A   S  G  F   D  F  S   R  Y  W   M  T  W
109  AAACTCTCC TGTGCAGCC TCAGGATTC GATTTTAGT AGATACTGG ATGACTTGG

      V  R  Q   A  P  G   K  G  L   E  W  I   G  E  I   N  P  D
163  GTCCGGCAG GCTCCAGGG AAAGGGCTA GAATGGATT GGAGAAATT AATCCAGAT

      S  S  T   I  N  Y   T  P  S   L  K  D   K  F  I   I  S  R
217  AGCAGTACG ATAAACTAT ACGCCATCT CTAAAGGAT AAATTCATC ATCTCCAGA

      D  N  A   K  N  T   L  Y  L   Q  M  S   E  V  R   S  E  D
271  GACAACGCC AAGAATACG CTGTACCTG CAAATGAGC GAAGTGAGA TCTGAGGAC

      T  A  L   Y  Y  C   A  S  G   V  F  T   S  W  G   Q  G  T
325  ACAGCCCTT TATTACTGT GCAAGCGGG GTGTTTACT TCCTGGGGC CAAGGGACT

      L  V  T   V  S  A
379  CTGGTCACT GTCTCTGCA
```

D

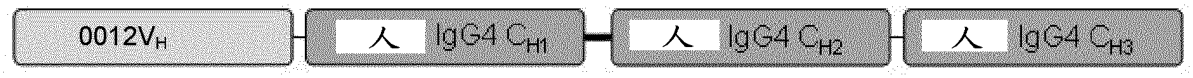
```
          1         2         3         4         5         6
12345678901234567890123456789012345AB6789012345678901 2ABC34567890      Kabat
EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMT--WVRQAPGKGLEWIGEIN--PDSSTINYT      0012HC-V

          7         8         9        10                  11
12345678901234567890123ABC3456789012345 7890ABCDEFGHIJK1234567890123    Kabat
PSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMSEVRSEDTALYYCASGVFTS--------------WGQGTLVTVSA    0012HC-V
```

图 3




```
     M  K  L   P  V  G   L  L  V   L  M  F   W  I  P   A  S  S
   1 ATGAAGTTG CCTGTTGGG CTGTTGGTG CTGATGTTC TGGATTCCA GCTTCCAGC

     S  D  V   V  M  T   Q  T  P   L  S  L   P  V  S   L  G  D
  55 AGTGATGTT GTGATGACC CAAACTCCA CTCTCCCTG CCTGTCAGT CTTGGAGAT

     Q  A  S   I  S  C   R  S  S   Q  S  L   V  H  R   N  G  N
 109 CAAGCCTCC ATCTCTTGC AGATCTAGT CAGAGCCTT GTACACAGA AATGGAAAC

     T  Y  F   H  W  C   L  Q  K   P  G  Q   S  P  K   L  L  I
 163 ACCTATTTT CATTGGTGC CTGCAGAAA CCAGGCCAG TCTCCAAAG CTCCTGATC

     Y  K  V   S  N  R   F  S  G   V  P  D   R  F  S   G  S  G
 217 TACAAAGTT TCCAACCGA TTTTCTGGG GTCCCAGAC AGGTTCAGT GGCAGTGGA

     S  G  T   D  F  T   L  K  I   S  R  V   E  A  E   D  L  G
 271 TCAGGGACA GATTTCACA CTCAAGATC AGCAGAGTG GAGGCTGAG GATCTGGGA

     V  Y  F   C  S  Q   S  T  H   V  P  Y   T  F  G   G  G  T
 325 GTTTATTTC TGCTCTCAA AGTACACAT GTTCCGTAC ACGTTCGGA GGGGGGACC

     K  L  E   I  K  R   T  V  A   A  P  S   V  F  I   F  P  P
 379 AAGCTGGAA ATAAAACGT ACGGTGGCT GCACCATCT GTCTTCATC TTCCCGCCA

     S  D  E   Q  L  K   S  G  T   A  S  V   V  C  L   L  N  N
 433 TCTGATGAG CAGTTGAAA TCTGGAACT GCCTCTGTT GTGTGCCTG CTGAATAAC

     F  Y  P   R  E  A   K  V  Q   W  K  V   D  N  A   L  Q  S
 487 TTCTATCCC AGAGAGGCC AAAGTACAG TGGAAGGTG GATAACGCC CTCCAATCG

     G  N  S   Q  E  S   V  T  E   Q  D  S   K  D  S   T  Y  S
 541 GGTAACTCC CAGGAGAGT GTCACAGAG CAGGACAGC AAGGACAGC ACCTACAGC

     L  S  S   T  L  T   L  S  K   A  D  Y   E  K  H   K  V  Y
 595 CTCAGCAGC ACCCTGACG CTGAGCAAA GCAGACTAC GAGAAACAC AAAGTCTAC

     A  C  E   V  T  H   Q  G  L   S  S  P   V  T  K   S  F  N
 649 GCCTGCGAA GTCACCCAT CAGGGCCTG AGCTCGCCC GTCACAAAG AGCTTCAAC

     R  G  E   C  E  D   Q  V  D   P  R  L   I  D  G   K
 703 AGGGGAGAG TGTGAGGAC CAGGTGGAC CCCAGACTG ATCGACGGC AAG
```

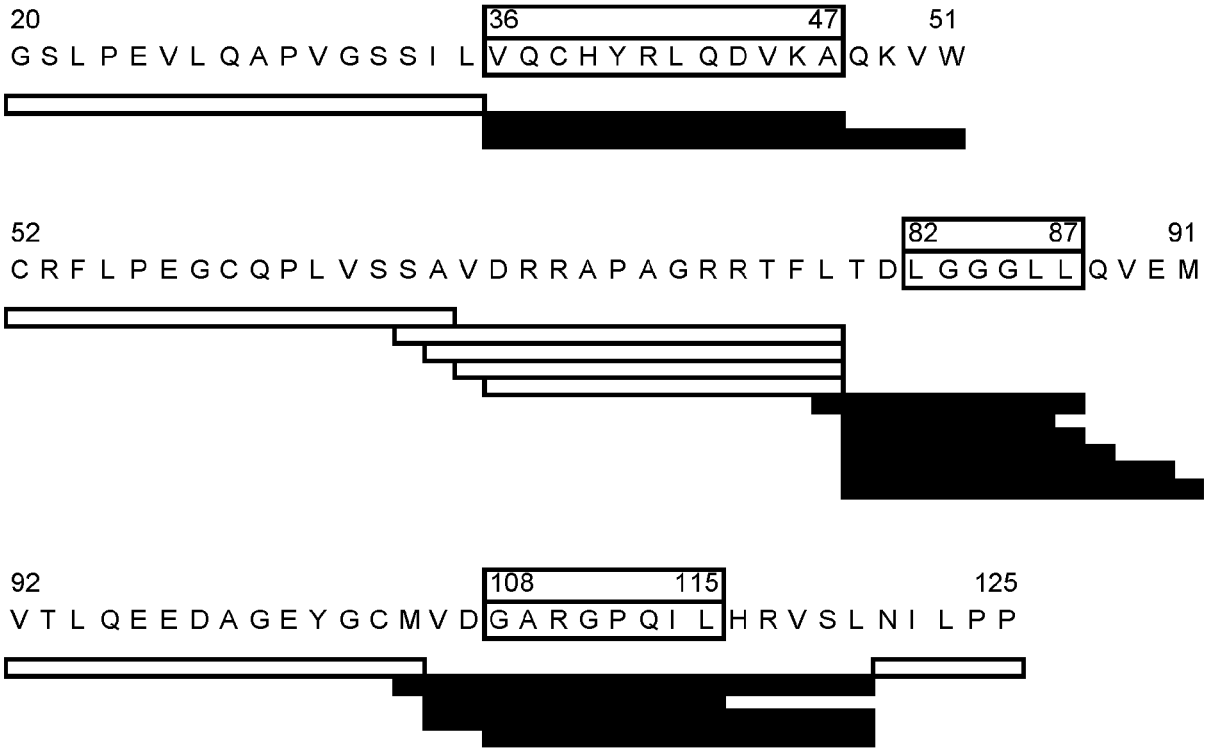
图 4




```
     M  D  F  G  L  I  F  F  I  V  A  L  L  K  G  V  Q  C
   1 ATGGATTTT GGGCTGATT TTTTTTATT GTTGCTCTT TTAAAAGGG GTCCAGTGT

     E  V  K  L  L  E  S  G  G  G  L  V  Q  P  G  G  S  L
  55 GAGGTGAAA CTTCTCGAG TCTGGAGGT GGCCTGGTG CAGCCTGGA GGATCCCTG

     K  L  S  C  A  A  S  G  F  D  F  S  R  Y  W  M  T  W
 109 AAACTCTCC TGTGCAGCC TCAGGATTC GATTTTAGT AGATACTGG ATGACTTGG

     V  R  Q  A  P  G  K  G  L  E  W  I  G  E  I  N  P  D
 163 GTCCGGCAG GCTCCAGGG AAAGGGCTA GAATGGATT GGAGAAATT AATCCAGAT

     S  S  T  I  N  Y  T  P  S  L  K  D  K  F  I  I  S  R
 217 AGCAGTACG ATAAACTAT ACGCCATCT CTAAAGGAT AAATTCATC ATCTCCAGA

     D  N  A  K  N  T  L  Y  L  Q  M  S  E  V  R  S  E  D
 271 GACAACGCC AAGAATACG CTGTACCTG CAAATGAGC GAAGTGAGA TCTGAGGAC

     T  A  L  Y  Y  C  A  S  G  V  F  T  S  W  G  Q  G  T
 325 ACAGCCCTT TATTACTGT GCAAGCGGG GTGTTTACT TCCTGGGGC CAAGGGACT

     L  V  T  V  S  A  A  S  T  K  G  P  S  V  F  P  L  A
 379 CTGGTCACT GTCTCTGCA GCTAGCACC AAGGGCCCA TCCGTCTTC CCCCTGGCG

     P  C  S  R  S  T  S  E  S  T  A  A  L  G  C  L  V  K
 433 CCCTGCTCC AGGAGCACC TCCGAGAGC ACAGCCGCC CTGGGCTGC CTGGTCAAG

     D  Y  F  P  E  P  V  T  V  S  W  N  S  G  A  L  T  S
 487 GACTACTTC CCCGAACCG GTGACGGTG TCGTGGAAC TCAGGCGCC CTGACCAGC

     G  V  H  T  F  P  A  V  L  Q  S  S  G  L  Y  S  L  S
 541 GGCGTGCAC ACCTTCCCG GCTGTCCTA CAGTCCTCA GGACTCTAC TCCCTCAGC

     S  V  V  T  V  P  S  S  S  L  G  T  K  T  Y  T  C  N
 595 AGCGTGGTG ACCGTGCCC TCCAGCAGC TTGGGCACG AAGACCTAC ACCTGCAAC

     V  D  H  K  P  S  N  T  K  V  D  K  R  V  E  S  K  Y
 649 GTAGATCAC AAGCCCAGC AACACCAAG GTGGACAAG AGAGTTGAG TCCAAATAT

     G  P  P  C  P  P  C  P  A  P  E  F  L  G  G  P  S  V
 703 GGTCCCCCA TGCCCACCA TGCCCAGCA CCTGAGTTC CTGGGGGGA CCATCAGTC

     F  L  F  P  P  K  P  K  D  T  L  M  I  S  R  T  P  E
 757 TTCCTGTTC CCCCCAAAA CCCAAGGAC ACTCTCATG ATCTCCCGG ACCCCTGAG

     V  T  C  V  V  V  D  V  S  Q  E  D  P  E  V  Q  F  N
 811 GTCACGTGC GTGGTGGTG GACGTGAGC CAGGAAGAC CCCGAGGTC CAGTTCAAC

     W  Y  V  D  G  V  E  V  H  N  A  K  T  K  P  R  E  E
 865 TGGTACGTG GATGGCGTG GAGGTGCAT AATGCCAAG ACAAAGCCG CGGGAGGAG

     Q  F  N  S  T  Y  R  V  V  S  V  L  T  V  L  H  Q  D
 919 CAGTTCAAC AGCACGTAC CGTGTGGTC AGCGTCCTC ACCGTCCTG CACCAGGAC

     W  L  N  G  K  E  Y  K  C  K  V  S  N  K  G  L  P  S
 973 TGGCTGAAC GGCAAGGAG TACAAGTGC AAGGTCTCC AACAAAGGC CTCCCGTCC

     S  I  E  K  T  I  S  K  A  K  G  Q  P  R  E  P  Q  V
1027 TCCATCGAG AAAACCATC TCCAAAGCC AAAGGGCAG CCCCGAGAG CCACAGGTG

     Y  T  L  P  P  S  Q  E  E  M  T  K  N  Q  V  S  L  T
1081 TACACCCTG CCCCCATCC CAGGAGGAG ATGACCAAG AACCAGGTC AGCCTGACC
```

```
      C  L  V   K  G  F   Y  P  S   D  I  A   V  E  W   E  S  N
1135  TGCCTGGTC AAAGGCTTC TACCCCAGC GACATCGCC GTGGAGTGG GAGAGCAAT

      G  Q  P   E  N  N   Y  K  T   T  P  P   V  L  D   S  D  G
1189  GGGCAGCCG GAGAACAAC TACAAGACC ACGCCTCCC GTGCTGGAC TCCGACGGC

      S  F  F   L  Y  S   R  L  T   V  D  K   S  R  W   Q  E  G
1243  TCCTTCTTC CTCTACAGC AGGCTAACC GTGGACAAG AGCAGGTGG CAGGAGGGG

      N  V  F   S  C  S   V  M  H   E  A  L   H  N  H   Y  T  Q
1297  AATGTCTTC TCATGCTCC GTGATGCAT GAGGCTCTG CACAACCAC TACACACAG

      K  S  L   S  L  S   L  G  K
1351  AAGAGCCTC TCCCTGTCT CTGGGTAAA
```

图 5



白：无差异

黑：**0023** 表位

图 6

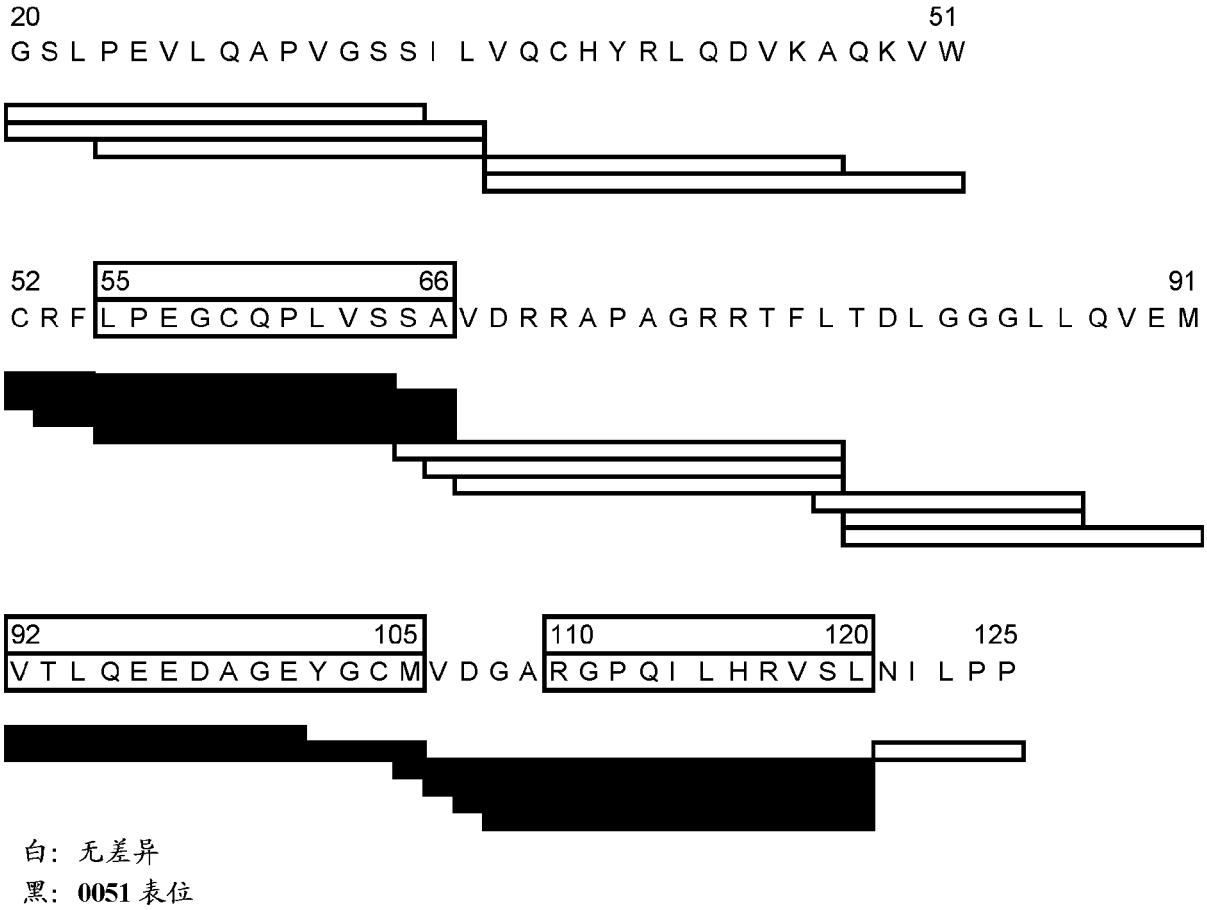

20
51
G S L P E V L Q A P V G S S I L V Q C H Y R L Q D V K A Q K V W
52
55
66
91
C R F L P E G C Q P L V S S A V D R R A P A G R R T F L T D L G G G L L Q V E M
92
105
110
120
125
V T L Q E E D A G E Y G C M V D G A R G P Q I L H R V S L N I L P P
白：无差异
黑：0051 表位

图 7

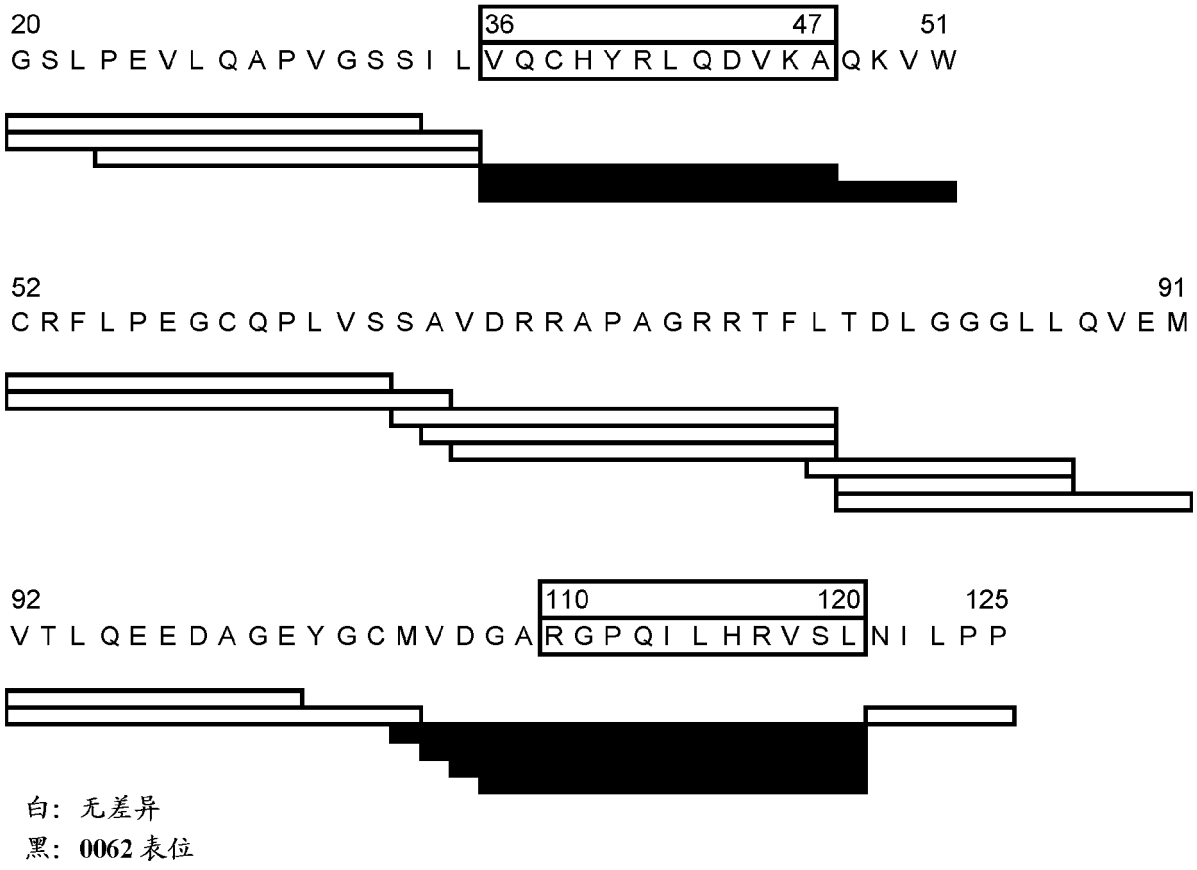

20
36
47
51
G S L P E V L Q A P V G S S I L V Q C H Y R L Q D V K A Q K V W
52
91
C R F L P E G C Q P L V S S A V D R R A P A G R R T F L T D L G G G L L Q V E M
92
110
120
125
V T L Q E E D A G E Y G C M V D G A R G P Q I L H R V S L N I L P P
白：无差异
黑：0062 表位

图 8

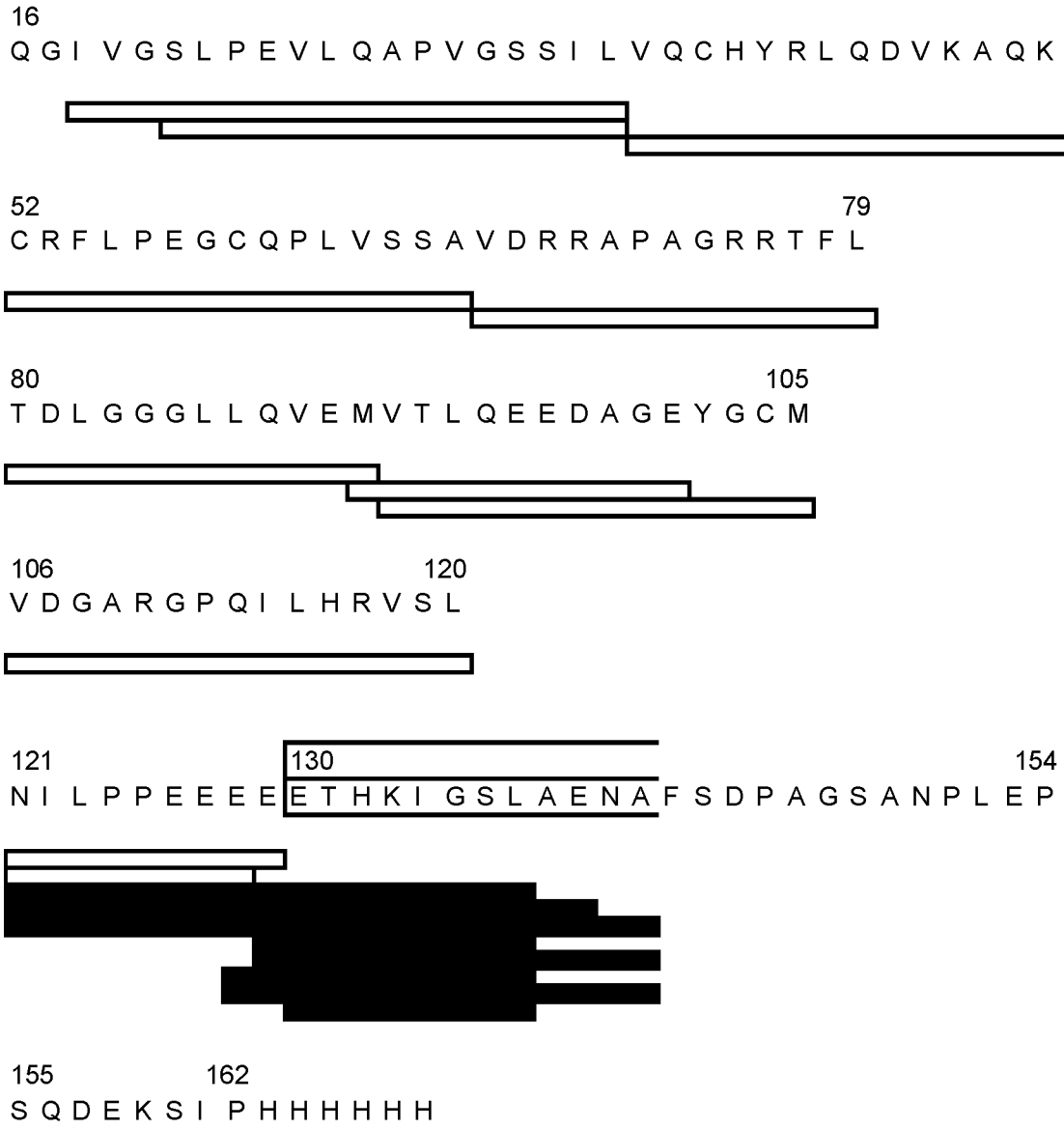

16
51
Q G I V G S L P E V L Q A P V G S S I L V Q C H Y R L Q D V K A Q K V W
52
79
C R F L P E G C Q P L V S S A V D R R A P A G R R T F L
80
105
T D L G G G L L Q V E M V T L Q E E D A G E Y G C M
106
120
V D G A R G P Q I L H R V S L
121
130
154
N I L P P E E E E E T H K I G S L A E N A F S D P A G S A N P L E P
155
162
S Q D E K S I P H H H H H H H
白：无差异
黑：0061 表位

图 9

白：无差异

黑：0061 表位

图 10

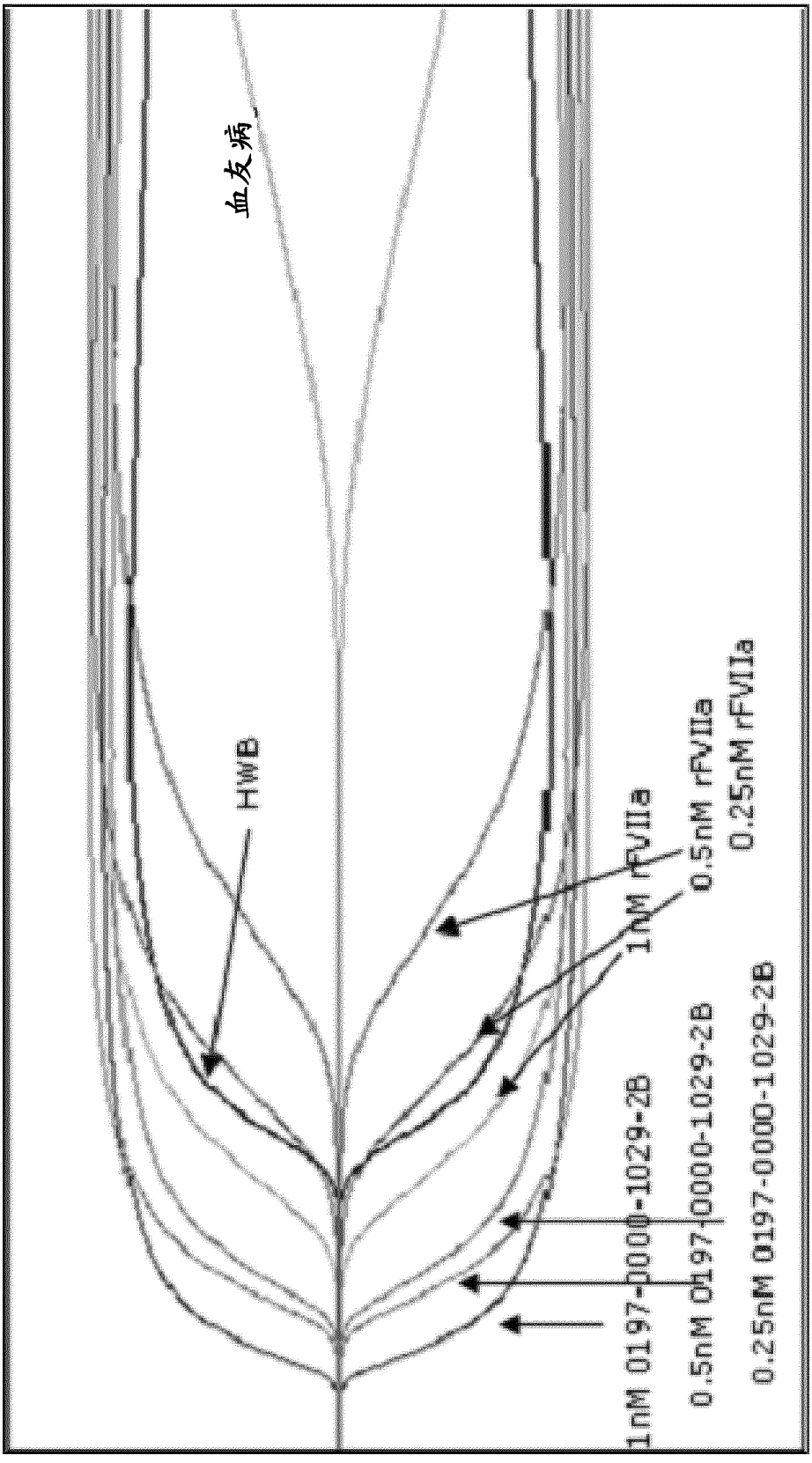

血友病
HWB
1nM 0197-0000-1029-2B
0.5nM 0197-0000-1029-2B
0.25nM 0197-0000-1029-2B
1nM rFVIIa
0.5nM rFVIIa
0.25nM rFVIIa

图 11A

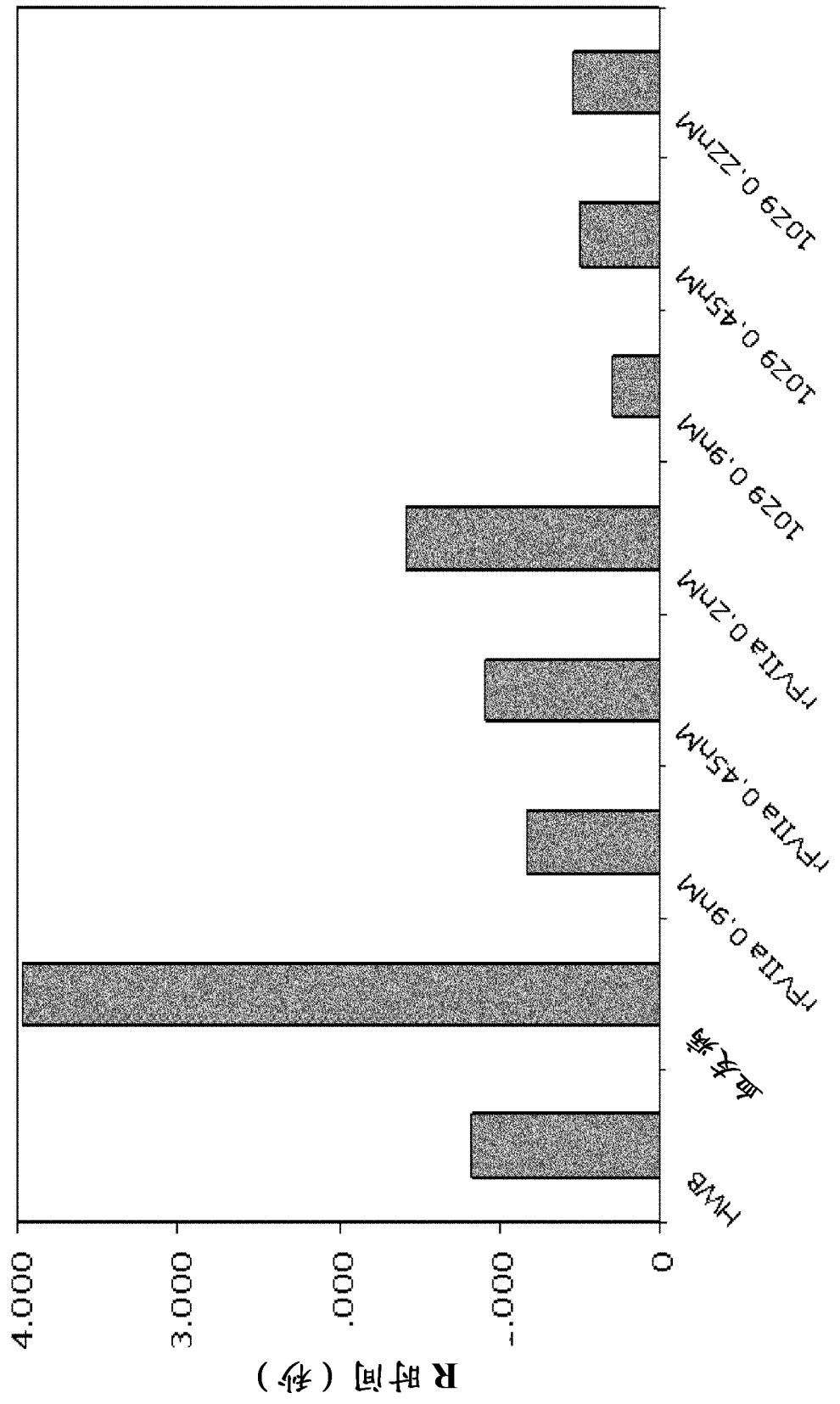

R 时间（秒）
4.000
3.000
.000
-.000
0
HMB
血友病
rFVIIa 0.9nM
rFVIIa 0.45nM
rFVIIa 0.2nM
1029 0.9nM
1029 0.45nM
1029 0.22nM

图 11B

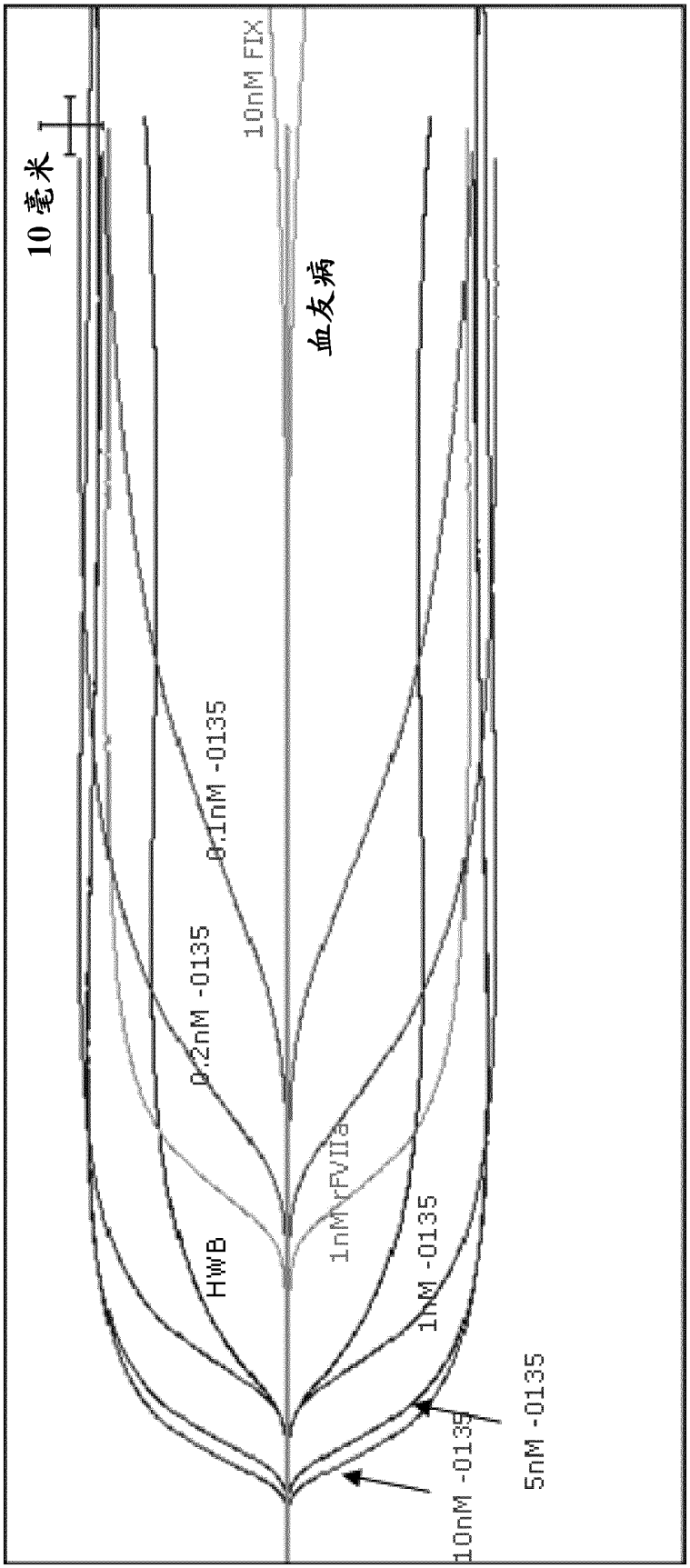

10 毫米
10nM FIX
血友病
0.2nM -0135
0.1nM -0135
HWB
1nM rFVIIa
1nM -0135
5nM -0135
10nM -0139

图 12

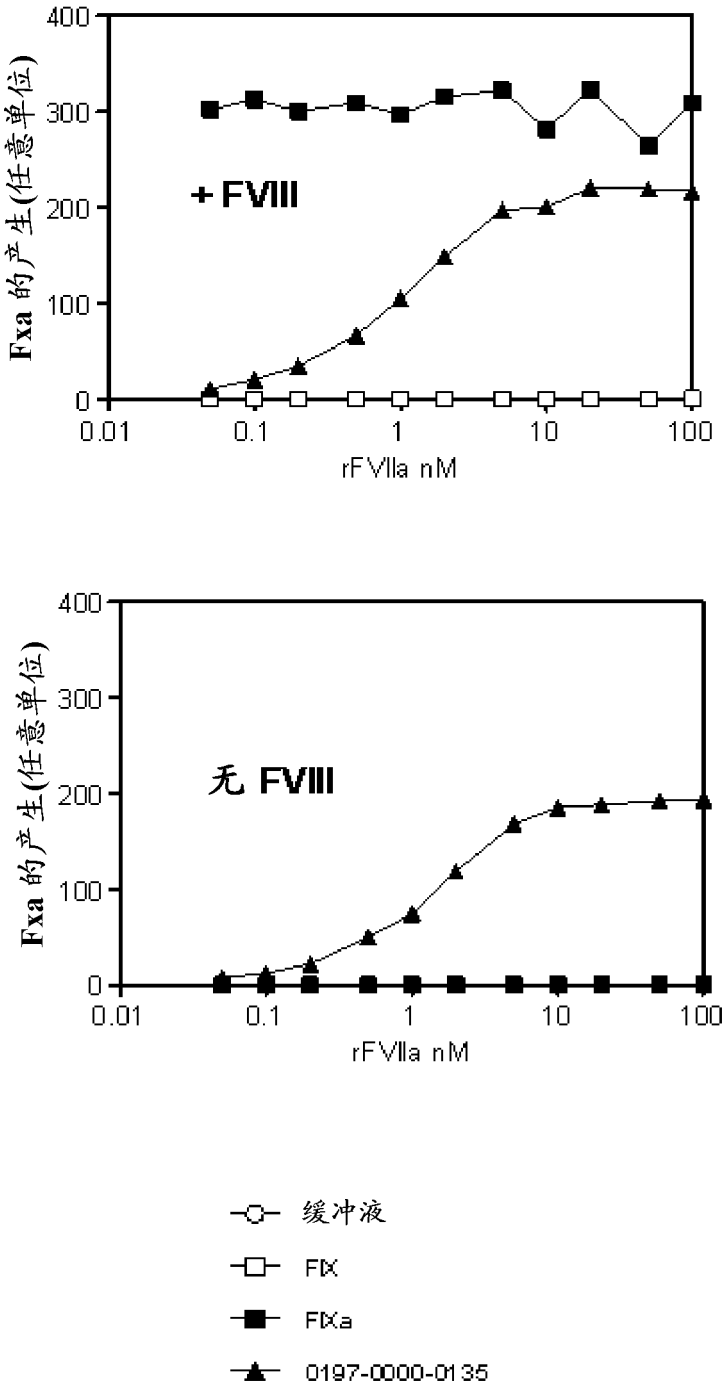

400
300
200
100
0
Fxa 的产生(任意单位)
+ FVIII
0.01
0.1
1
10
100
rFVIIa nM
400
300
200
100
0
Fxa 的产生(任意单位)
无 FVIII
0.01
0.1
1
10
100
rFVIIa nM
缓冲液
FIX
FIXa
0197-0000-0135

图 13

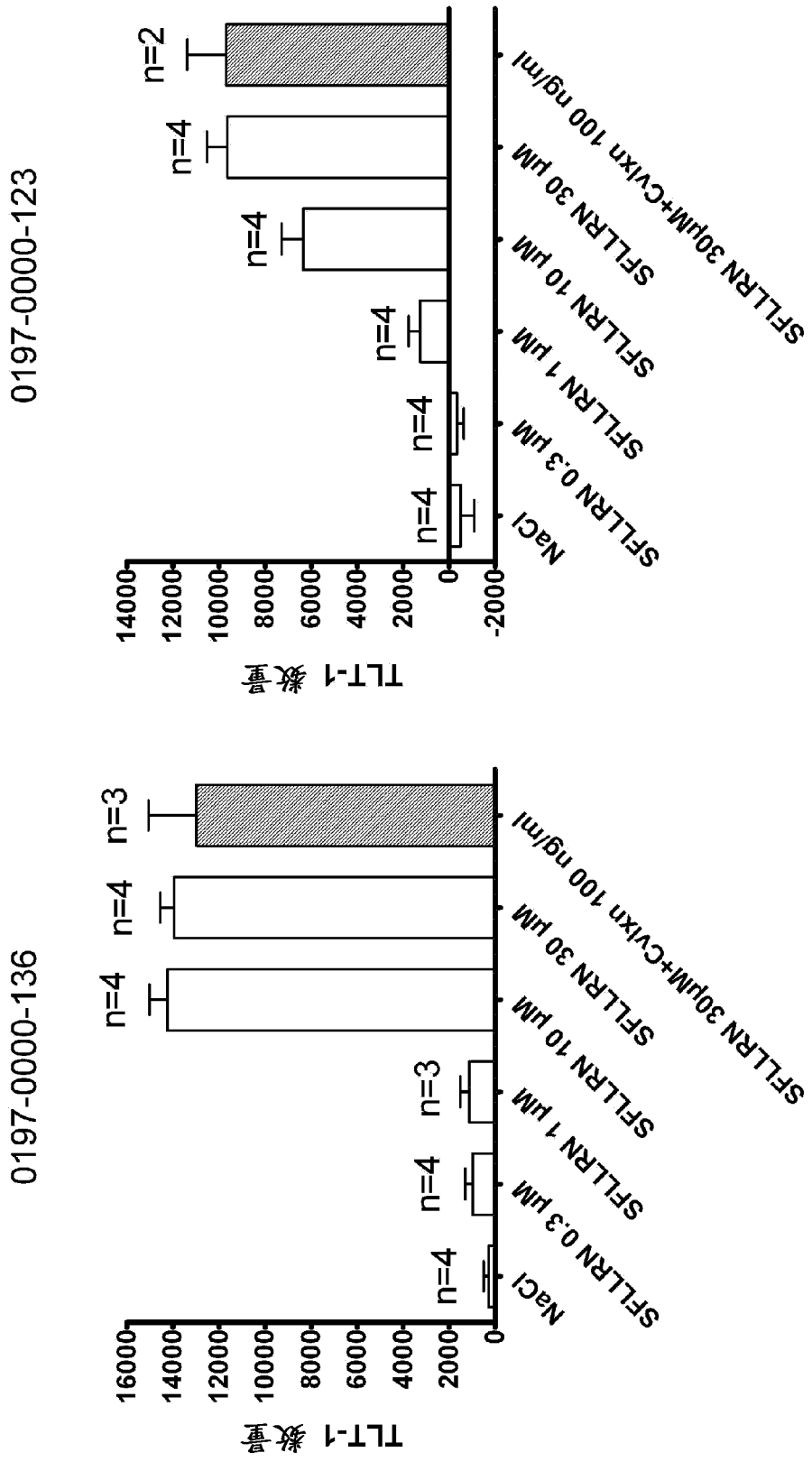

0197-0000-123
TLT-1 数量
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
n=2
n=4
n=4
n=4
n=4
n=4
NaCl
SFLLRN 0.3 μM
SFLLRN 1 μM
SFLLRN 10 μM
SFLLRN 30 μM
SFLLRN 30μM+Cv1xn 100 ng/ml
0197-0000-136
TLT-1 数量
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
n=3
n=4
n=4
n=3
n=4
n=4
NaCl
SFLLRN 0.3 μM
SFLLRN 1 μM
SFLLRN 10 μM
SFLLRN 30 μM
SFLLRN 30μM+Cv1xn 100 ng/ml

图 14

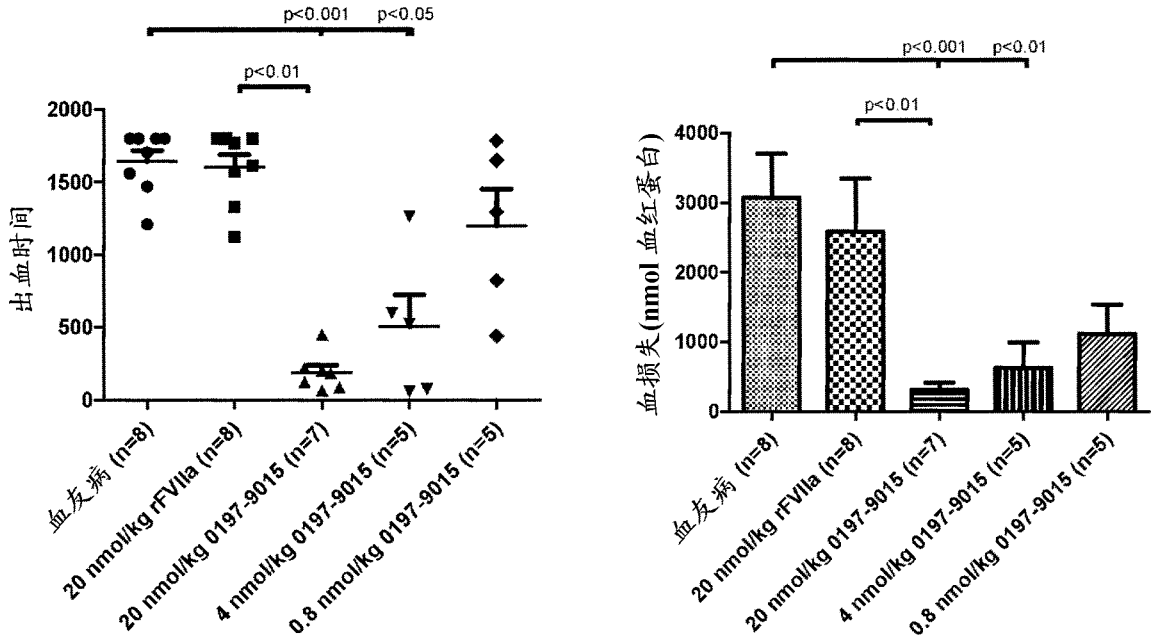

p<0.001
p<0.05
p<0.01
出血时间
2000
1500
1000
500
0
血友病 (n=8)
20 nmol/kg rFVIIa (n=8)
20 nmol/kg 0197-9015 (n=7)
4 nmol/kg 0197-9015 (n=5)
0.8 nmol/kg 0197-9015 (n=5)
p<0.001
p<0.01
p<0.01
血损失(nmol 血红蛋白)
4000
3000
2000
1000
0
血友病 (n=8)
20 nmol/kg rFVIIa (n=8)
20 nmol/kg 0197-9015 (n=7)
4 nmol/kg 0197-9015 (n=5)
0.8 nmol/kg 0197-9015 (n=5)

图 15

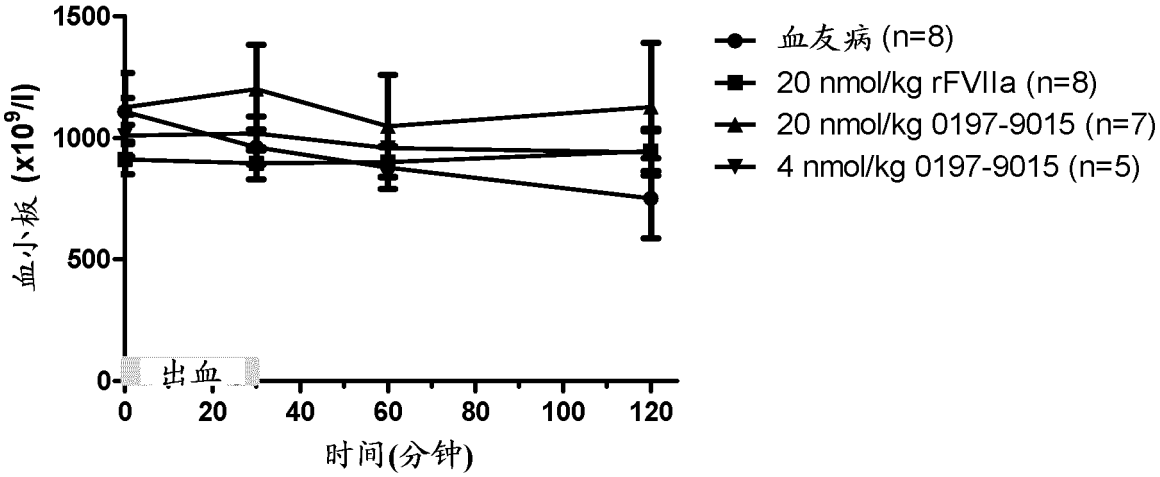

血小板 (x10^9/l)
1500
1000
500
0
出血
0
20
40
60
80
100
120
时间(分钟)
血友病 (n=8)
20 nmol/kg rFVIIa (n=8)
20 nmol/kg 0197-9015 (n=7)
4 nmol/kg 0197-9015 (n=5)

图 16

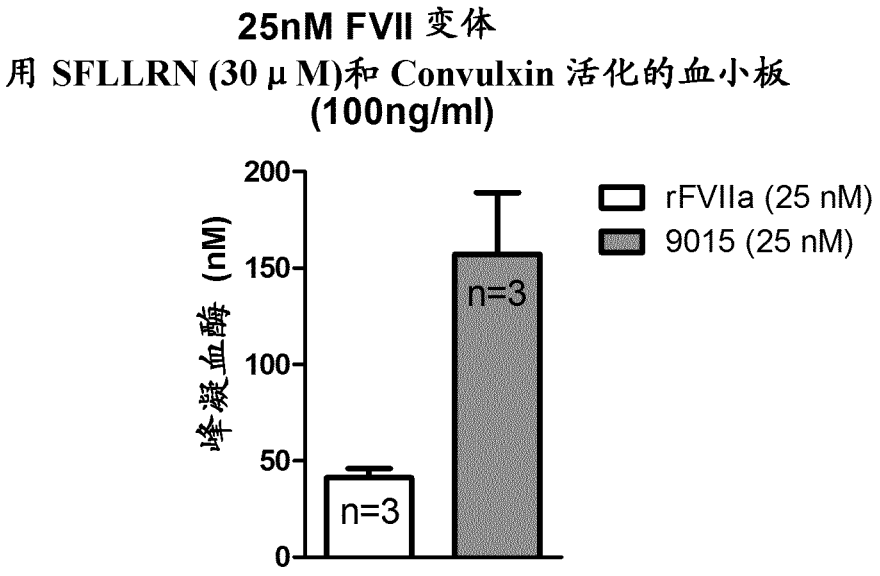

25nM FVII 变体
用 SFLLRN (30 μ M)和 Convulxin 活化的血小板
(100ng/ml)
峰凝血酶 (nM)
200
150
100
50
0
n=3
n=3
rFVIIa (25 nM)
9015 (25 nM)

图 17A

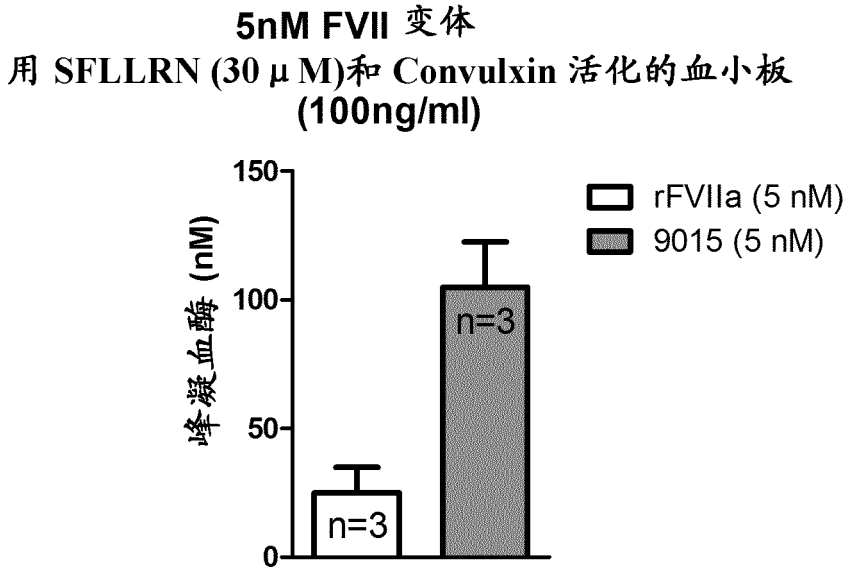

5nM FVII 变体
用 SFLLRN (30 μ M)和 Convulxin 活化的血小板
(100ng/ml)
峰凝血酶 (nM)
150
100
50
0
n=3
n=3
rFVIIa (5 nM)
9015 (5 nM)

图 17B

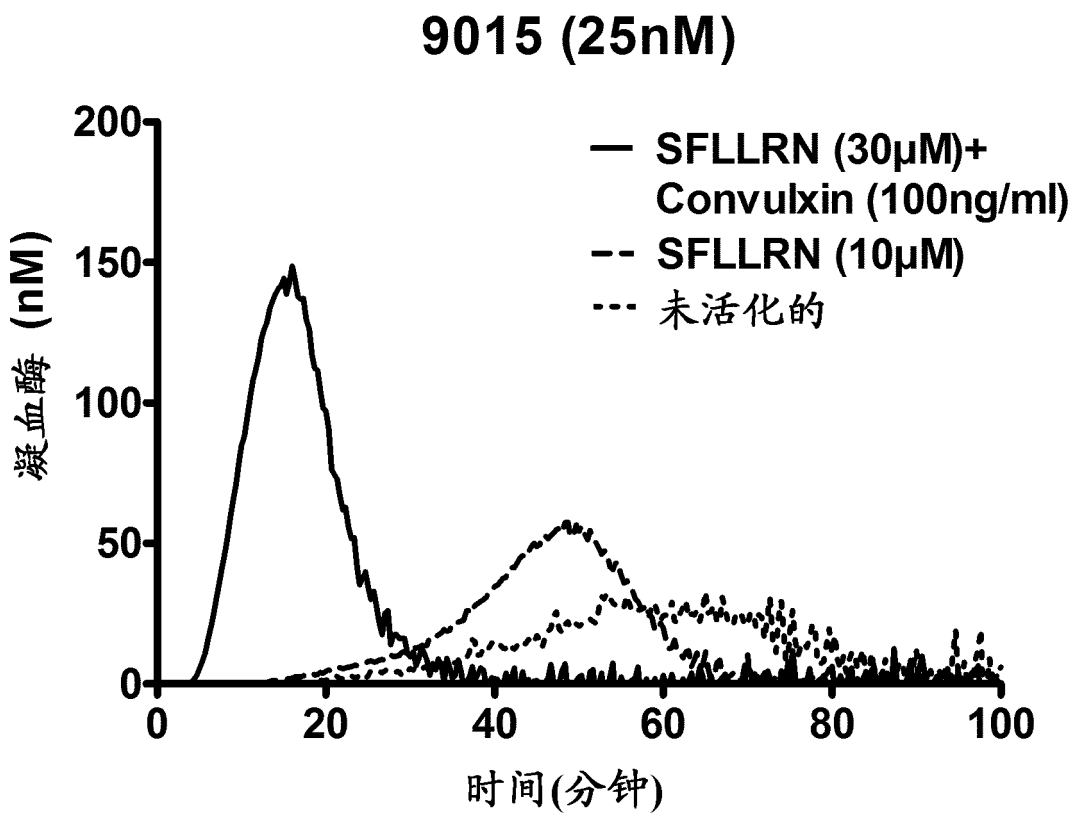

9015 (25nM)
200
150
100
50
0
凝血酶 (nM)
0
20
40
60
80
100
时间(分钟)
SFLLRN (30μM)+
Convulxin (100ng/ml)
SFLLRN (10μM)
未活化的

图 18

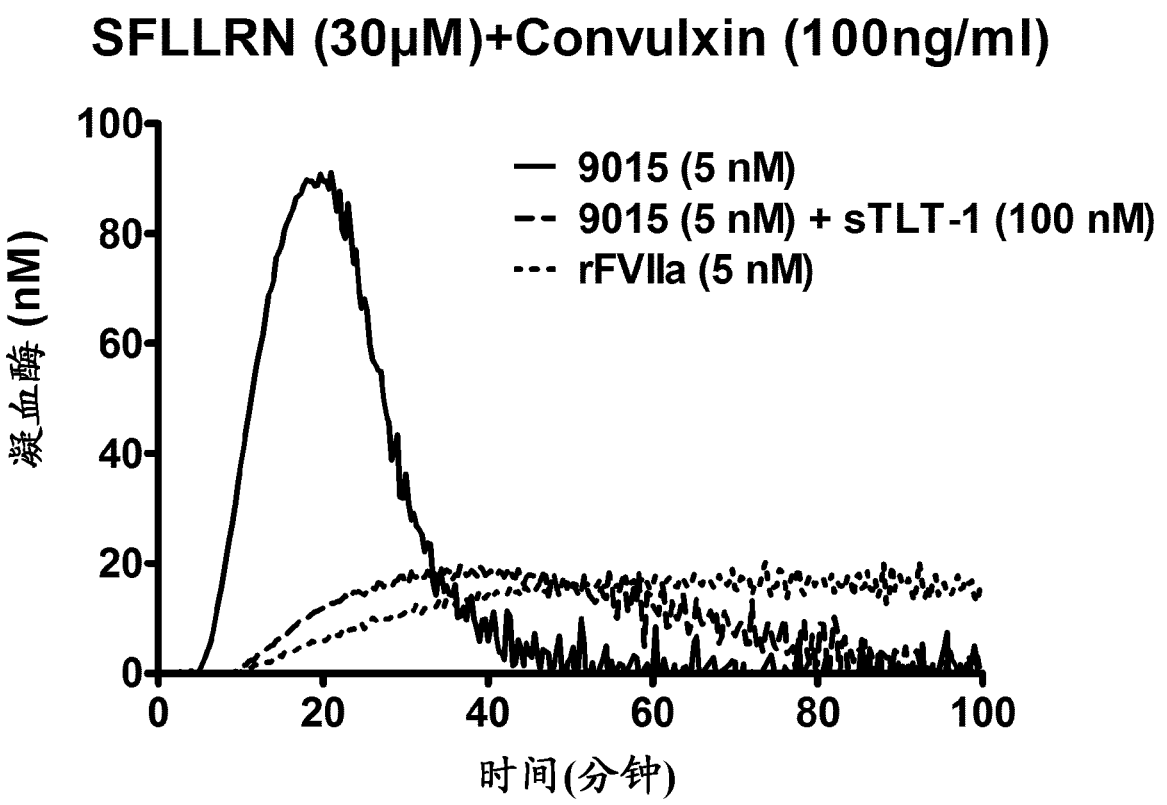

SFLLRN (30μM)+Convulxin (100ng/ml)
凝血酶 (nM)
时间(分钟)
9015 (5 nM)
9015 (5 nM) + sTLT-1 (100 nM)
rFVIIa (5 nM)
0
20
40
60
80
100

图 19

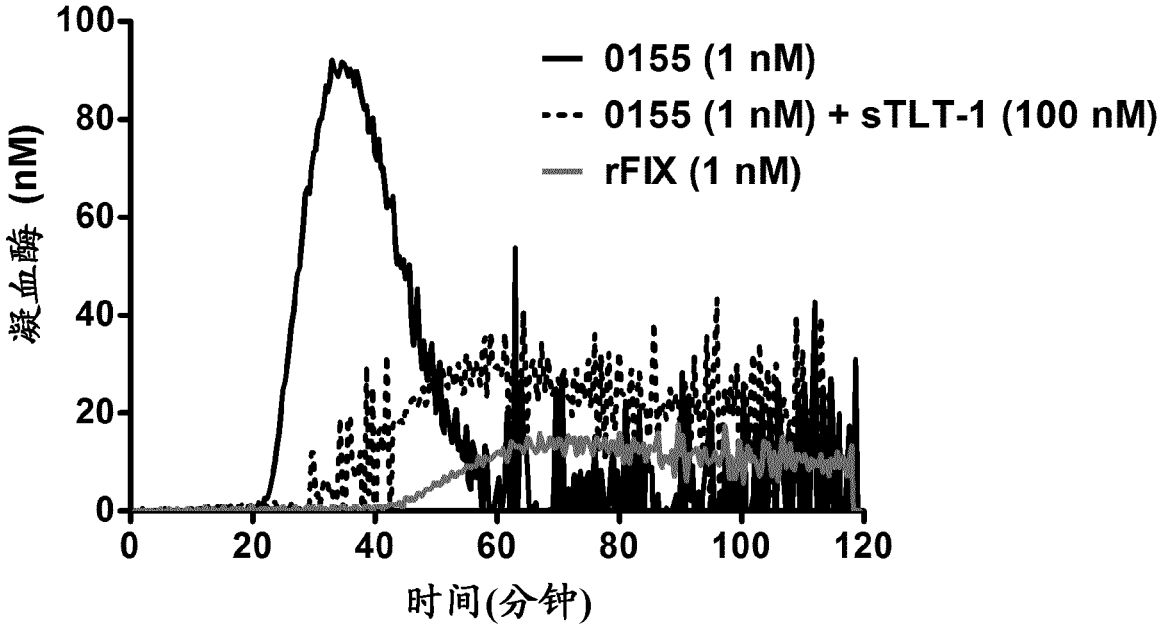

凝血酶 (nM)
时间(分钟)
0155 (1 nM)
0155 (1 nM) + sTLT-1 (100 nM)
rFIX (1 nM)
0
20
40
60
80
100
120

图 20

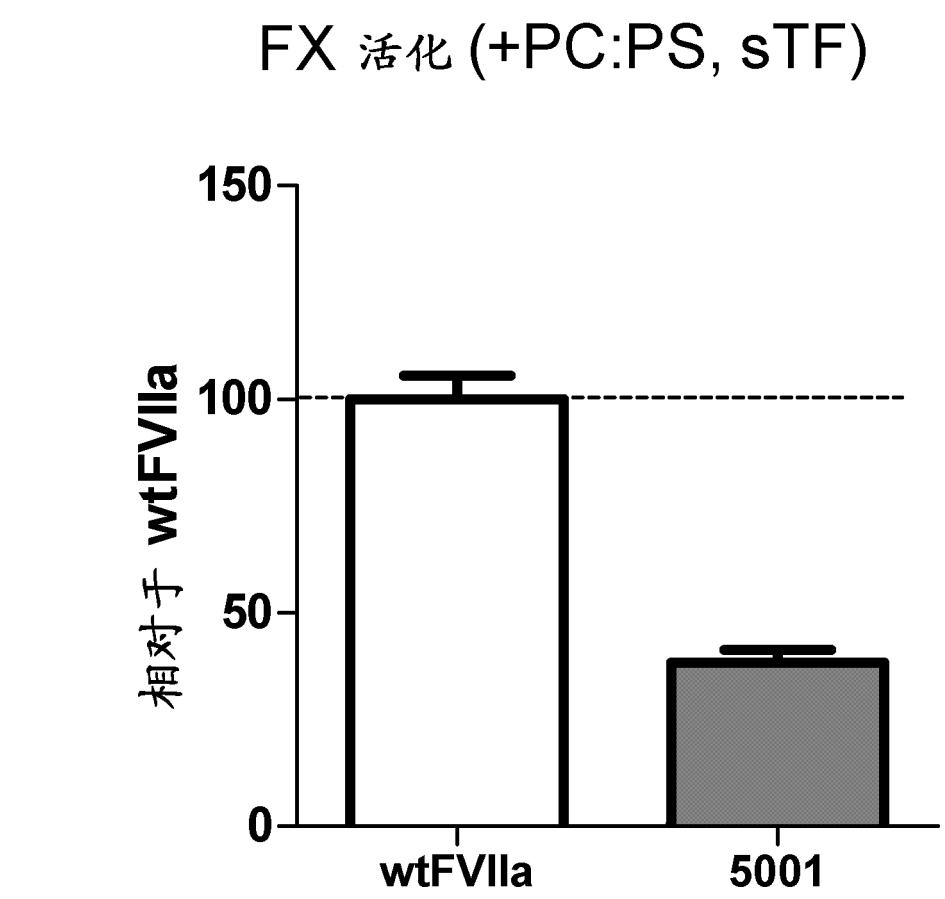

FX 活化 (+PC:PS, sTF)
150
100
50
0
相对于 wtFVIIa
wtFVIIa
5001

图 21

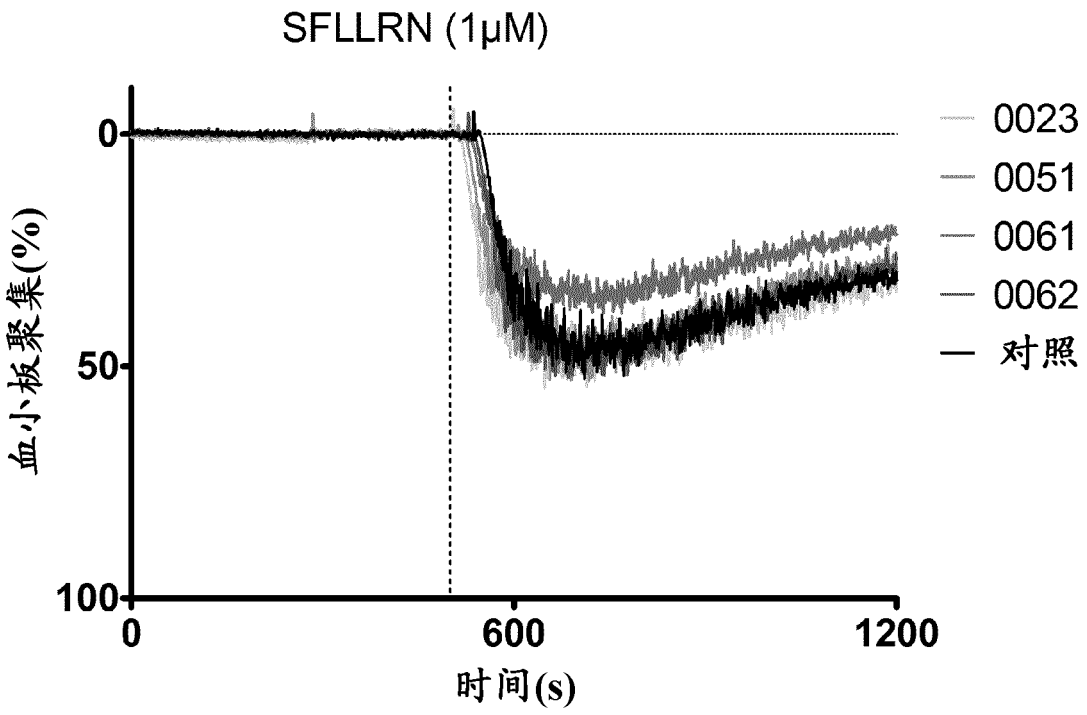

SFLLRN (1μM)
0
50
100
血小板聚集(%)
0
600
1200
时间(s)
0023
0051
0061
0062
对照

图 22A

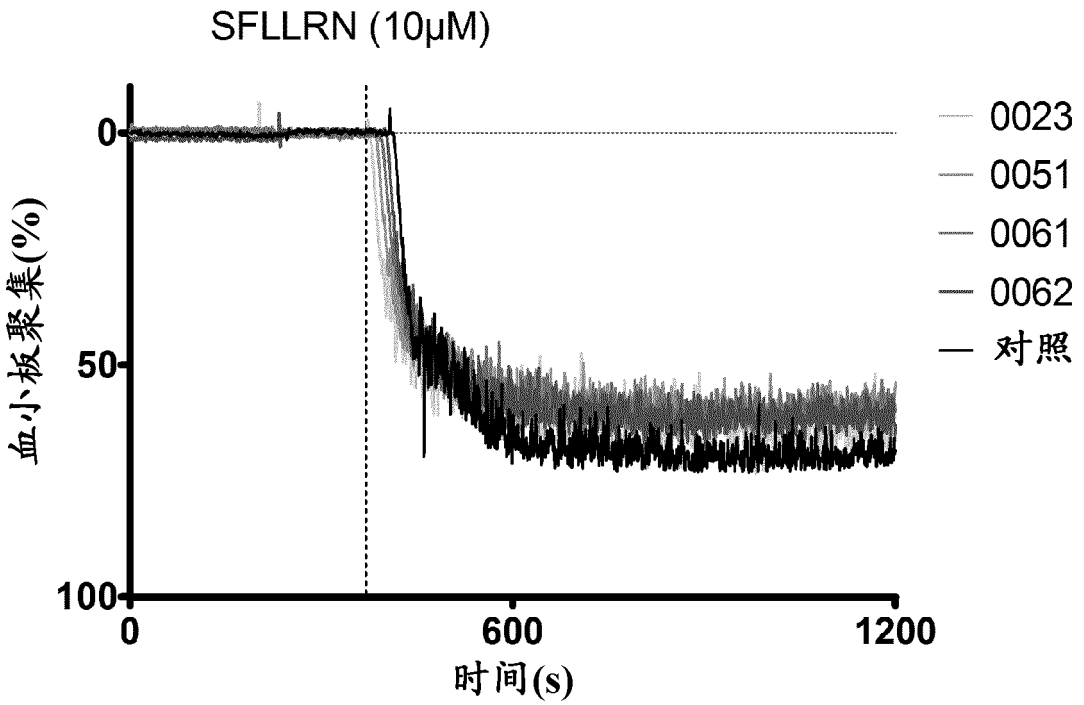

SFLLRN (10μM)
血小板聚集(%)
0
50
100
0
600
1200
时间(s)
0023
0051
0061
0062
对照

图 22B

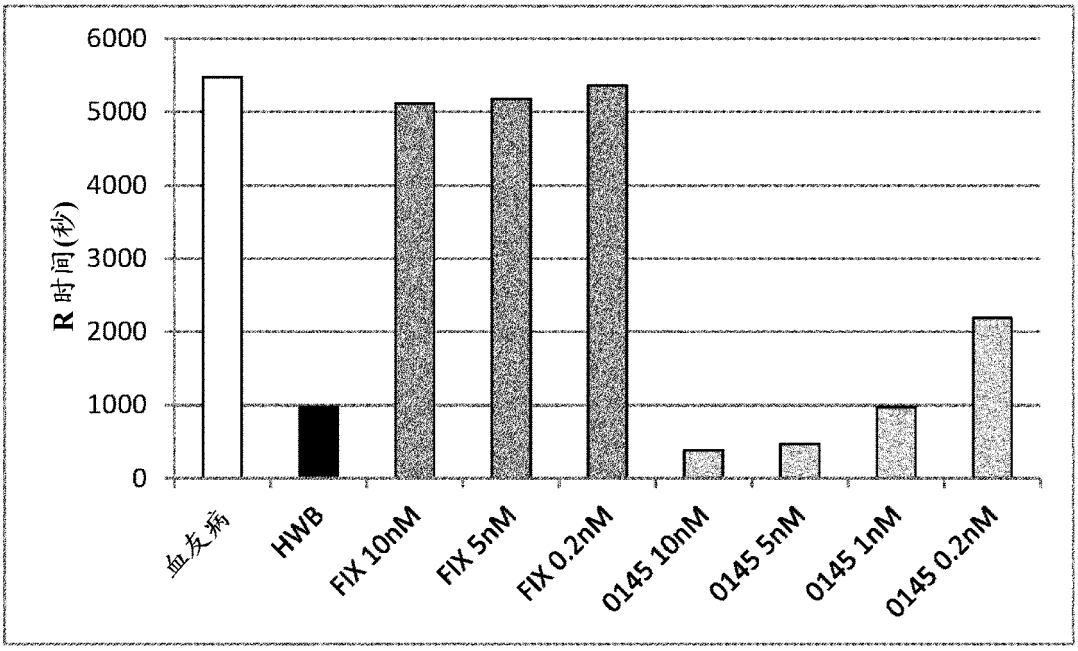

R 时间(秒)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
血友病
HWB
FIX 10nM
FIX 5nM
FIX 0.2nM
0145 10nM
0145 5nM
0145 1nM
0145 0.2nM

图 23

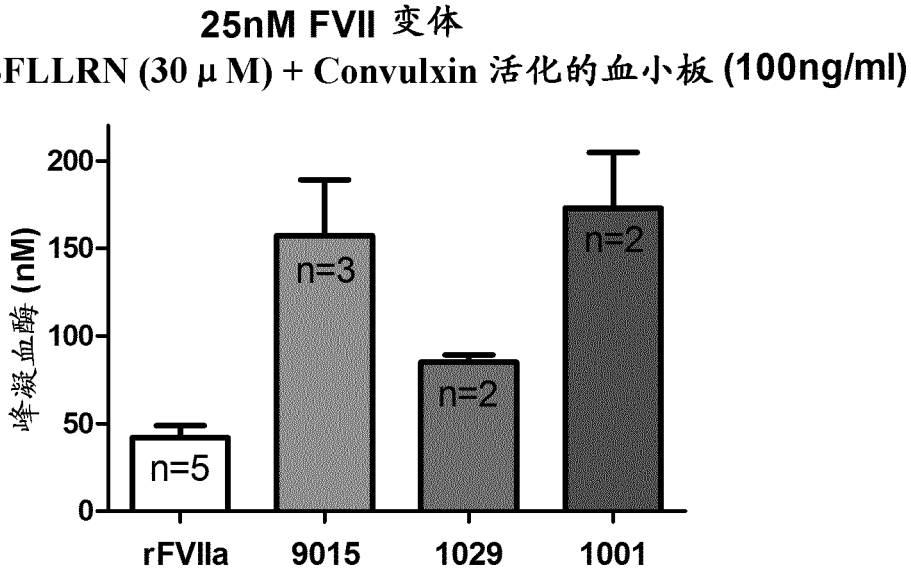

25nM FVII 变体
用 SFLLRN (30 μ M) + Convulxin 活化的血小板 (100ng/ml)
峰凝血酶 (nM)
200
150
100
50
0
n=5
n=3
n=2
n=2
rFVIIa
9015
1029
1001

图 24

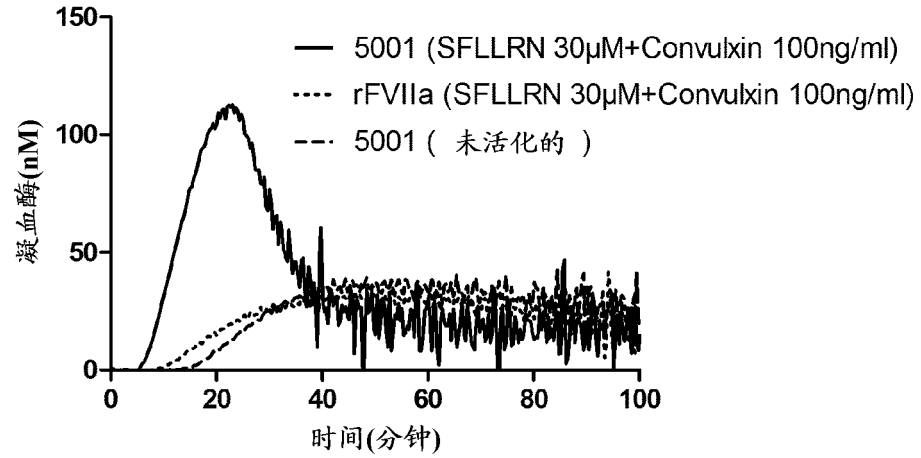

在含有人血小板的因子 VIII 缺陷型血浆中的 FVIIa 变体(25nM)
凝血酶(nM)
150
100
50
0
0
20
40
60
80
100
时间(分钟)
5001 (SFLLRN 30μM+Convulxin 100ng/ml)
rFVIIa (SFLLRN 30μM+Convulxin 100ng/ml)
5001 (未活化的)

图 25