



(10) 授权公告号 CN 110330563 B

(45) 授权公告日 2024.03.29

(21) 申请号 201910704484.0

(22) 申请日 2014.12.15

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110330563 A

(43) 申请公布日 2019.10.15

(30) 优先权数据
1322091.8 2013.12.13 GB

(62) 分案原申请数据
201480075522.6 2014.12.15

(73) 专利权人 剑桥实业有限公司
地址 英国剑桥郡

(72) 发明人 詹姆斯·安德鲁·亨廷顿
斯蒂芬妮·波尔德代克
特雷弗·巴格林

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 徐爱文 武晶晶

(51) Int.Cl.

C07K 14/81 (2006.01)

C12N 15/15 (2006.01)

A61K 38/57 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101977626 A, 2011.02.16

W0 2006090282 A2.2006.08.31

Rui Jiang, et al. Three Pairs of
Protease-Serpin Complexes Cooperatively
Regulate the Insect Innate Immune
Responses.《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL
CHEMISTRY》.2009,第284卷(第51期),第35652-
35658页.

审查员 杨卓一

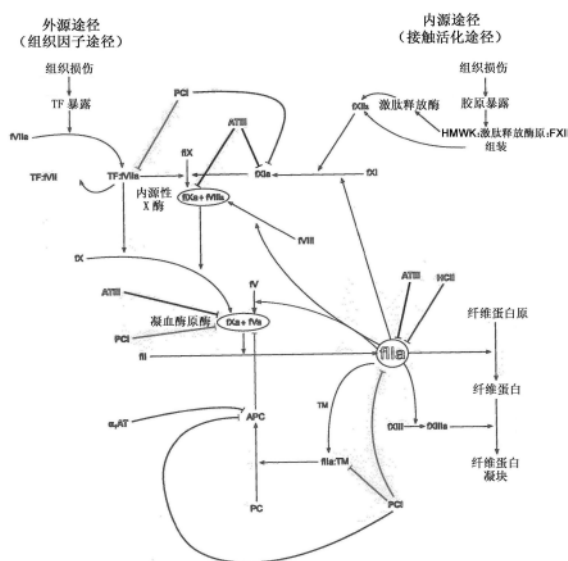
权利要求书2页 说明书41页
序列表38页 附图32页

(54) 发明名称

用于出血性疾病治疗的修饰的丝氨酸蛋白
酶抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及用于出血性疾病治疗的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。具体而言,本发明涉及通过修饰反应中心环(RCL)内的P4、P2、P1和/或P1'残基而工程化的促凝丝氨酸蛋白酶抑制剂分子,以表现出对抗凝血蛋白酶提高的特异性。这些修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂分子可以用于疗法中,例如,作为促凝剂用于出血治疗。



1. 一种修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其序列为在SEQ ID NO:12的残基25-418的基础上进行突变,

其中所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的对应于SEQ ID NO:12的残基382的P1残基为R或突变为R;

其中对应于SEQ ID NO:12的残基383的P1' 残基为Q、H、K或R;且对应于SEQ ID NO:12的残基381的P2残基为H、K或R;以及

其中相对于所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对一种或多种选自凝血酶、fVIIa、fXa、fIXa和fXIa的促凝血蛋白酶的抑制,所述突变增加所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对活化蛋白C的蛋白酶活性的抑制,以及;

其中所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂减少出血或促进止血。

2. 根据权利要求1所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中P1' 残基突变为K或Q。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中P2残基突变为K。

4. 根据权利要求1所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P2残基和P1' 残基分别为KK、RK、RH、KH、RQ或KQ。

5. 根据权利要求1所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在P4包含突变,其中对应于SEQ ID NO:12的残基379的P4残基突变为F、S、R、V、C、W、K、G、L、H、T、Q或A。

6. 根据权利要求1所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的突变由在位置P1' 和P2;位置P1' 、P2和P1;位置P1' 、P2和P4;或者位置P1' 、P2、P4和P1的突变组成。

7. 根据权利要求5所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中,

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是K并且P1' 残基是K;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是R并且P1' 残基是H;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是K并且P1' 残基是H;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是R并且P1' 残基是Q;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是K并且P1' 残基是Q;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是K,P1残基是R并且P1' 残基是K;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是K,P1残基是R并且P1' 残基是Q;或者

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是A,P2残基是R,P1残基是R并且P1' 残基是Q;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是K,P2残基是R并且P1' 残基是H;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是F,P2残基是K并且P1' 残基是K;

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是F,P2残基是R并且P1' 残基是K;或者

在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基是S,P2残基是H并且P1' 残基是R。

8. 根据权利要求5所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,其中在所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基为A,P2残基为K,P1残基为R并且P1' 残基为K。

9. 一种编码根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸。
10. 一种包含编码根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸的载体。
11. 一种包含表达根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的载体的重组细胞。
12. 一种药物组合物, 包含根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂以及药学上可接受的赋形剂。
13. 根据权利要求1-8中任一项所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在制备用于在治疗个体中的出血或者促进止血中使用的药物中的用途。
14. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述个体患有出血性疾病。
15. 根据权利要求14所述的用途, 其中所述出血性疾病为血友病。
16. 根据权利要求13所述的用途, 其中所述个体是创伤患者。

用于出血性疾病治疗的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂

[0001] 本申请是申请日为2014年12月15日的题为“用于出血性疾病治疗的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂”的中国专利申请号201480075522.6的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及具有改变的特异性的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂 (serpin) 分子, 具体地涉及修饰为具有针对抗凝血蛋白酶 (抗凝剂蛋白酶, anticoagulant protease) (如, 活化蛋白C (激活蛋白C, activated Protein C) (APC)) 的增加了的特异性的丝氨酸蛋白酶抑制剂分子。

背景技术

[0003] 血友病是出血性疾病 (bleeding disorder), 它是由缺乏循环血浆fVIII (血友病A, HA) 或fIX (血友病B, HB) 所引起 (在Bolton-Maggs&Pasi, 2003中综述)。这降低了内源性X酶 (tenase) (Xase) 的活性并且由此减少了发生组织损伤时产生的凝血酶的量。这导致了损伤后不受控制的出血以及自发性出血至关节和软组织。

[0004] 血友病在5,000人中影响约1人。世界血友病联盟全球调查 (World Federation of Hemophilia Global Survey) 中确认的170,000名患者是对全球健康负担的低估 (世界血友病联盟, 2011)。治疗费用极高, 而且治疗频繁并且是终身的。

[0005] 血友病的标准疗法需要使用重组的或血浆-来源的因子替换受影响的凝血因子 (Mannucci, 2003; 2008中综述)。然而, 显著比例的以这种方式治疗的患者将发展出针对补充的凝血因子的抑制性抗体, 从而使治疗无效 (Brettler, 1996中综述)。在30%治疗的血友病患者中出现抑制物 (inhibitor) (在Teitel&Sholzberg, 2013中综述), 但是由于未治疗的抑制物患者 (inhibitor patient) 中的高死亡率以及在因子VIII置换疗法 (replacement therapy) 不可用的众多国家中抑制物的低发病率, 全球估计值较低。常规疗法的另一个缺点是它们的费用, 以及注射的凝血因子的短的半衰期, 使得需要频繁治疗 (在Lee et al, 2006中综述)。

[0006] 在患者发展出抑制性抗体的病例中, 将旁路剂 (旁路制剂, bypassing agent) 用于出血事件的治疗 (在 (Negrier et al, 2006) 中综述)。旁路剂减少出血, 但不直接提供受影响的凝血因子; 它们“绕过”了X酶复合物 (tenase complex) 的活性。目前旁路剂的实例包括重组fVIIa和FEIBA (因子VIII旁路活性 (Factor Eight Bypassing Activity)), 其是凝血酶原复合物浓缩物。这些置换治疗是非常昂贵的 (Bohn et al, 2004; Di Minno et al, 2010; Gringeri et al, 2003; Escobar, 2010) 并且由于两种产品短暂的半衰期而需要比常规疗法更频繁地高剂量施用 (在Haya et al, 2007中综述)。另外, 患者反应表现为可变化并且不可预知 (在Berntorp, 2009中综述)。

[0007] 另外, 因子浓缩物短暂的半衰期使得血友病的标准置换疗法并未达到最佳标准 (次优的, suboptimal)。这在血友病A中是特别明显的, 因为因子VIII的半衰期小于12小时。因此, 虽然对血友病A和B治疗可用, 但是血友病A中出血速率更高, 从而使得慢性血友病性

关节病更常见。这可能与因子VIII短暂的半衰期有关,并因此难以维持因子VIII止血水平(Escobar和Sallah 2013)。在治疗的全局性评估中,不具有抑制物的重度血友病A患者的年出血频率为14,相比之下在血友病B患者中为9(Nagel et al,2011)。在血友病A患者中,肌骨外科手术的需要为3倍高。Tagariello et al.发现血友病A患者,相比血友病B患者对关节置换的需要为3倍频繁(Tagariello et al,2009)。Lowe et al.发现,血友病A患者对住院治疗的需要,与血友病B相比为3倍频繁(Lowe和Ludlam 2008)。

[0008] 因此,目前对于出血性疾病,如血友病的治疗具有一定范围的缺陷。

发明内容

[0009] 本发明人已认识到可以通过修饰(改变,modification)反应中心环(RCL)内的残基来工程化(设计,engineered)丝氨酸蛋白酶抑制剂分子的特异性,并且已鉴别了具有针对抗凝血蛋白酶的增加的特异性的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂分子。这些修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂分子可以在疗法,例如用于出血的治疗中用。

[0010] 本发明一方面提供了在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)的残基P4、P2、P1和P1'的一处或多处具有突变的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0011] 本发明另一方面提供了在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)中的残基P1'和P2中的一处或两处以及可选的残基P4和/或P1具有突变的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0012] 相对于凝血酶的抑制,该突变可以提高活化蛋白C的抑制。

[0013] 相对于其它促凝血蛋白酶(促凝集蛋白酶,anticoagulant protease)(如,fVIIa、fIXa、fXa和fXIa)的抑制,该突变还可以提高活化蛋白C的抑制。

[0014] 本发明的其它方面涉及,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂用于出血治疗,例如遗传性出血性疾病的患者和获得性出血(包括创伤、手术)的患者以及接受抗凝血疗法的患者的出血治疗。

附图说明

[0015] 图1示出了凝血级联(cascade)和该级联中丝氨酸蛋白酶抑制剂的调控作用。

[0016] 图2示出了凝血酶原(prothrombin)时间(PT)试验的结果以确定具有21个残基的N末端截短(当将前肽(propeptide)的残基1计数为成熟蛋白的残基1时,N末端残基为野生型序列的A22)并且在RCL内的P2和P1'位置具有K残基(A22 P2KP1'K PCI)的蛋白C抑制物(PCI)对通过组织因子途径(通路,passway)(外源)的凝血的影响。将来自三种单独的血浆的汇集的正常血浆与无PCI(黑条,-)或者与5 μ M A22野生型(WT)PCI(灰色条,WT)或5 μ M A22 P2KP1'K PCI(白色条,P2KP1'K)一起孵育。通过加入PT试剂引起凝血,以引发通过外源途径的凝血并测量直至凝块形成的时间。测定重复3次,误差条(error bar)示出了标准偏差。将2-倍稀释的血浆用于提高对于凝血抑制剂的测定灵敏度。在该凝血酶原时间(PT)测定中,A22 P2KP1'K PCI对凝血无影响。该结果表明A22 P2KP1'K PCI对TF:fVIIa、凝血酶和其它促凝蛋白酶无显著影响。

[0017] 图3示出了活化部分凝血活酶(thromboplastin)时间(aPTT)试验的结果以确定A22 P2KP1'K PCI对通过接触激活途径(内源)的凝血的影响。图3中A示出了与无PCI(黑色

条,-)或5 μ M A22野生型(WT)PCI(灰色条,WT)或A22 P2KP1'K PCI(白色条,P2KP1'K)一起孵育的来自三种单独的血浆的汇集的正常血浆。加入aPTT试剂,并将样品在37 $^{\circ}$ C培育5min。然后,通过加入CaCl₂引起凝血,从而引发通过内源途径的凝血,并测量直至凝块形成的时间。条棒示出了至少三个测量的平均值,误差条示出了标准偏差。测定在300s终止。300s时所示样品在实验时间内不凝固并用星号标记。图3中B示出了来自A的不具有A22 WT PCI样品的数据以表明对凝血时间的较小影响。

[0018] 图4示出了凝血酶原时间试验(PT)的结果,其确定了全长(FL) α_1 -抗胰蛋白酶Pittsburgh(Pitts)突变体(M358R=P1R)对通过组织因子途径(内源)的凝血的影响,该Pittsburgh突变体还在RCL内包含C232S突变和P357K(P2)和S359K(P1'K)突变(FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K)。将来自三种单独血浆的汇集的正常血浆与无 α_1 AT(-,黑色条)或5 μ M FL α_1 AT Pitts C232S(Pitts,灰色条)或5 μ M FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K(P2KP1'K,白色条)一起培育。通过加入PT试剂引起凝血,并测量直至凝块形成的时间。条棒示出了至少三个测量的平均值,误差条示出了标准偏差。将2-倍稀释的血浆用于提高用于凝血抑制剂的测定的灵敏度。不同于FL α_1 AT Pitts C232S,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K不延长PT。这表明包括TF-fVIIa、凝血酶或fXa的任何促凝蛋白酶没有显著抑制作用。

[0019] 图5A和图5B示出了活化部分凝血活酶时间试验(aPTT)的结果以确定FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K对通过接触激活途径(内源)的凝血的影响。图5A示出了与无 α_1 AT(黑色条,-)或提高浓度的FL α_1 AT Pitts C232S(灰色条)或FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K(白色条)孵育的三种单独的血浆的汇集的正常血浆。加入aPTT试剂,并将样品在37 $^{\circ}$ C培育5min。然后,通过加入CaCl₂引起凝血,并测量直至凝块形成的时间。条棒示出了至少三个测量的平均值,误差条示出了标准偏差。测定在300s终止。300s时所示样品在实验时间内不凝固并用星号标记。图5B示出了来自A的无FL α_1 AT Pitts C232S样品的数据以显示对通过FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K的凝血时间的较小影响。然而,这种影响不会提高剂量依赖性。

[0020] 图6A-图6D示出了FL α_1 AT Pitts C232S抑制正常人血浆(NP)中的凝血酶产生。图6A-图6C示出了在存在(A)无凝血调节蛋白(血栓调节蛋白,thrombomodulin)(TM)、(B)1.25nM凝血调节蛋白(TM)、(C)10nM凝血调节蛋白(TM)的情况下,包含升高的浓度的FL α_1 AT Pitts C232S的代表的凝血酶产生曲线。曲线示出了重复的平均值。在来自George King Biomedical的汇集的正常人血浆(NP)中进行所有试验。通过加入CaCl₂和TF/磷脂(RB低TF(RB low TF)和磷脂试剂#5006210,Technoclone GmbH)以激活通过外源途径的凝血来引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解(断裂,酶解,cleavage)来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone),将荧光单位转化为凝血酶浓度。图6D示出了平均ETP(内源性凝血酶能力(endogenous thrombin potential)),其代表反应期间产生的凝血酶的总量。条(bar)示出了重复两次进行的两个独立实验的平均值。误差条代表了标准偏差。所使用的凝血调节蛋白(TM)是从HEK-EBNA细胞重组产生的,并且由TM的胞外区(extracellular domain)组成。

[0021] 图7A-图7D示出了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K挽回了正常人血浆(NP)中TM的抗凝血作用。图7A-图7C示出了在存在(A)无TM、(B)1.25nM TM、(C)10nM TM的情况下,含有升高的浓度的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K的代表的凝血酶产生曲线。曲线示出了重复的平均值。在来自George King Biomedical的汇集的正常人血浆(NP)中进行所有试验。

通过加入CaCl₂和TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂#5006210, Technoclone GmbH)以激活通过外源途径的凝血来引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone GmbH)将荧光单位转化为凝血酶浓度。图7D示出了平均ETP(内源性凝血酶能力),其代表反应期间产生的凝血酶的总量。条示出了重复两次进行的3个独立实验的平均值。误差条代表标准偏差。

[0022] 图8示出了FL α_1 AT Pitts C232S消除了人血友病A血浆(HA, fVIII-缺乏)和人血友病B血浆(HB, fIX-缺乏)中的凝血酶产生。该图示出了来自凝血酶产生实验的平均ETP,该实验在具有指定量的加入的凝血调节蛋白(TM)的(A) fVIII-缺乏的血浆(小于1% fVIII活性)或者(B) fIX-缺乏的血浆(小于1% fIX活性)中,添加升高浓度的FL α_1 AT Pitts C232S。所有血浆来自于George King Biomedical。通过加入CaCl₂和TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂#5006210, Technoclone GmbH)以及1:4,000最终稀释的Dade Innovin(Siemens)从而激活通过外源途径的凝血来引发反应。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone)将荧光单位转化为凝血酶浓度。由重复两次进行的至少两个独立实验示出平均ETP。误差条代表标准偏差。

[0023] 图9A-图9D示出了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K挽回了TM对人HA血浆(fVIII-缺乏的血浆)的影响。图9A-图9C示出了在存在(A)无TM、(B)1.25nM TM、(C)5nM TM的情况下,含有升高的浓度的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的代表的凝血酶产生曲线。曲线示出了重复的平均值。在来自George King Biomedical的fVIII-缺乏的血浆(小于1% fVIII活性)中进行所有试验。通过加入CaCl₂和TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂#5006210, Technoclone GmbH)和1:4,000的Dade Innovin(Siemens)以激活通过外源途径的凝血来引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone),将荧光单位转化为凝血酶浓度。图9D示出了平均ETP(内源性凝血酶能力),这表示反应期间产生的凝血酶的总量。条(bar)示出了重复两次进行的两个独立实验的平均值。误差条代表标准偏差。

[0024] 图10A-图10D示出了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K挽回了TM对人HB血浆的影响(fIX-缺乏的血浆)。对在存在(A)无TM、(B)1.25nM TM、(C)5nM TM的情况下,含有升高的浓度的FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1' K的反应,示出了(A-C)代表性凝血酶产生曲线。曲线示出了重复的平均值。在来自George King Biomedical的fIX-缺乏的血浆(小于1% fIX活性)中进行所有试验。通过加入CaCl₂和TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂#5006210, Technoclone GmbH)与1:4,000的Dade Innovin(Siemens)以激活通过外源途径的凝血来引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone),将荧光单位转化为凝血酶浓度。图10D示出了平均ETP(内源性凝血酶能力),其代表反应期间产生的凝血酶的总量。条示出了重复两次进行的至少两个独立实验的平均值。误差条代表标准偏差。

[0025] 图11A-图11E示出了FL α_1 AT Pitts C232S和FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1' K在HB小鼠血浆中的影响。图11A-图11D示出了在存在(A和C)无TM、(B和D)750nM可溶性人TM的情况下,含有升高的浓度的(A-B)FL α_1 AT Pitts C232S或者(C-D)FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的反

应的代表性凝血酶产生曲线。在HB小鼠血浆中进行所有试验,该HB小鼠血浆在通过尾部出血至柠檬酸盐,离心除去红血球并在-80℃冷冻收集。通过加入CaCl₂、TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂,Technoclone)和1:12,000的Dade Innovin(Siemens)以激活通过外源途径的凝血来引起凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone),将荧光单位转化为凝血酶浓度。图11E示出了平均ETP(内源性凝血酶能力),其代表反应期间产生的凝血酶的总量。条示出了四个独立实验的平均值。误差条代表标准偏差。所有试验在33℃进行。

[0026] 图12示出了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K降低了尾部剪裁试验(tail clip assay)中HB小鼠的出血。尾部剪裁结果示出了对WT小鼠或HB小鼠以3mm直径对尾部横切之后的10min采集期内的总失血。向小鼠注射总注射体积200 μ l的指定剂量的PBS、FL α_1 AT Pitts C232S或FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K。使用PBS使蛋白溶液达到200 μ l。通过将来自尾部的血液采集至14ml盐水中确定体积失血。将所采集的血液旋转沉淀并将红血球裂解,随后在575nm测量吸光度。通过使用已知体积的采集的血液,在红血球溶胞之后在575nm确定吸光度来构建标准曲线。然后,根据该标准曲线计算实验样品中的失血。所示每个点表明了来自单只小鼠的数据,并且水平线示出了每组中所有动物的平均值。使用非配对t检验计算P值。圆表示注射了PBS的WT小鼠,正方形表示注射了PBS的HB小鼠,三角形表示注射了7.5mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S的HB小鼠,倒三角形表示注射了7.5mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K的HB小鼠,以及菱形表示注射了15mg/kg FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K的HB小鼠。

[0027] 图13示出了在提睾肌微动脉(cremaster arteriole)激光损伤模型中,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K增加了HB小鼠中稳定的凝块形成。通过颈静脉插管,向HB小鼠注入荧光标记的 α -纤维蛋白抗体和用于标记血小板的荧光标记的抗体。对照示出了在仅注入抗体的小鼠的损伤之后的凝块形成的基线水平。 m 表示每种条件的小鼠数目, n 表示该条件进行的损伤数目。浅灰色表示无凝块,深灰色表示仅血小板凝块,并且黑色代表含有血小板和纤维蛋白的凝块。

[0028] 图14示出了在提睾肌微动脉激光损伤模型中FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K增加了HB小鼠中稳定的凝块形成。图14示出了图13中所示结果的代表性原始数据。对每种条件的所有损伤,随时间定量荧光。该图示出了指定条件中所有损伤的中值。小鼠数目和损伤总数如下所示:对照:5只小鼠,8处损伤;7.5mg/kg的FL α_1 AT Pitts C232S:1只小鼠,7处损伤;7.5mg/kg的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K:4只小鼠,18处损伤;15mg/kg的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K:3只小鼠,20处损伤。

[0029] 图15示出了相对于凝血酶,对APC特异的 α_1 AT突变体的凝血酶和fXa的抑制,该突变体筛选用于fXa抑制。然后,对具有降低的fXa抑制的获得的4个突变体测试(A)凝血酶和(B)fXa抑制,以确定筛选是否在产生并不抑制凝血酶或fXa的APC特异性突变体中获得成功。将1 μ M丝氨酸蛋白酶抑制剂与12.5nM蛋白酶培育不同的时间量。在指定时间点,通过加入过量发色底物(凝血酶为S2238;fXa为S2222)终止反应。将残余酶活性除以初始酶活性并将该值的自然对数对时间作图。这些图的斜率为表观速率常数 k_{obs} 。为获得二级速率常数 k_2 的估计值,将 k_{obs} 除以丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度。所选的值如图所示,以说明凝血酶和fXa的

最高抑制以及基本不抑制fXa的仅有的突变体(P2RP1' Q)的值。示出的突变体全部具有Pitts(M358R,P1R)突变。

具体实施方式

[0030] 本发明涉及丝氨酸蛋白酶抑制剂的修饰以相对于其它凝血蛋白酶提高丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的特异性。对APC特异的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂变体可以是有用的,例如作为促凝血剂。

[0031] 由于修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC特异,因此本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂预期具有较少或没有脱靶效应(off target effect)并且对损伤时激活的途径特异。这使得修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂能够治疗性和预防性地应用,以及在紧急情况(即,创伤)中应用。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的给药是可预测的,这是因为它们是自杀式抑制剂,表示丝氨酸蛋白酶抑制剂的一个分子不能抑制多于一个蛋白酶分子。另外,相对于单独的丝氨酸蛋白酶抑制剂,由于有效的天然清除机制对丝氨酸蛋白酶抑制剂:蛋白酶复合物是特异的,因此修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的血浆半衰期很可能超过当前的旁路剂。例如,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的半衰期可以为约5天。

[0032] 蛋白C(基因ID(Gene ID) 5624)是维生素K-依赖性血浆糖蛋白,其通过凝血酶-凝血调节蛋白复合物被裂解成活化形式(活化蛋白C,APC)。人蛋白C具有NP_000303.1GI:4506115的参考氨基酸序列,并且可以通过NM_000312.3GI:270483720的参考核苷酸序列编码。APC是抗凝血蛋白酶,其蛋白水解地裂解fVa和fVIIIa(图1),借此减少凝血酶的产生。

[0033] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以在其反应中心环(RCL)中具有一个或多个突变。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以在其RCL中具有1个、2个、3个、4个或多于4个突变。可以突变在位置P4、P2、P1和P1'中的1处、2处、3处或所有4处的残基。例如,可以突变在位置P1'和P2中1处或2处以及可选的P1和/或P4的残基。

[0034] 在本文中,根据Schechter-Berger对于丝氨酸蛋白酶的底物和抑制剂的术语表(Schechter&Berger,1967)对RCL残基编号。这种标准命名使得能够容易地在任何丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中鉴别RCL中特定位置(如,位置P1'、P1、P2和/或P4)的残基。

[0035] 优选地,一个或多个突变是修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中仅有的突变。例如,RCL可以由在位置P1'和P2的1处或2处以及可选的P1和/或P4具有突变的野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL的序列组成。

[0036] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL可以在P1'和P2位置具有突变;在P1'、P2和P1位置具有突变;在P1'、P2和P4位置具有突变或者在P1'、P2、P1和P4位置具有突变;在P1'位置具有突变;在P1'和P1位置具有突变;在P1'和P4位置具有突变或者在P1'、P1和P4位置具有突变;在P2位置具有突变;在P2和P1位置具有突变;在P2和P4位置具有突变,在P2、P1和P4位置具有突变,在P1位置具有突变,在P4位置具有突变;或者在P1和P4位置具有突变。RCL中其它位置的残基可以是未突变的野生型残基。

[0037] 优选地,在RCL的位置P1';位置P1'和P2;位置P1'、P1和P2;位置P2和P1;位置P1和P1';位置P1'、P2和P4或位置P1'、P1、P2和P4处的残基是突变的。在一些优选的实施方式中,在位置P1'、P1和P2处的残基是突变的。

[0038] 丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)通常为约20个残基长并且含有通过靶标

蛋白酶裂解的易裂解的P1-P1' 键。RCL从丝氨酸蛋白酶抑制剂的 β 折叠A的链5延伸至 β 折叠C的链1。丝氨酸蛋白酶抑制剂中,残基P17 Glu、P15 Gly和P14 Thr是保守的。例如,丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL可以包含共有序列P17 E、P16 E/K/R、P15 G、P14 T/S、P12-P9 (A/G/S)₄ (Hopkins et al,1993;Irving et al,2000)。RCL从残基P17起始,并通常在残基P3' 结束。在一些丝氨酸蛋白酶抑制剂(如,PCI)中,RCL可以通过P' 侧上另外的残基延伸。例如, α_1 -抗胰蛋白酶的RCL由残基P17-P3' 组成,并且PCI的RCL由残基P17-P6' 组成。以下SEQ ID NO:1至11中显示了突出显示的具有残基P1'、P1、P2和P4的丝氨酸蛋白酶抑制剂的实例。还显示了构成成熟的丝氨酸蛋白酶抑制剂序列的残基。

[0039] 丝氨酸蛋白酶抑制剂中RCL的其他位置的残基可以是未修饰的,即它们可以是野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列的天然残基(native residue)。因此,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含具有在如上所述的位置P1、P1'、P2和/或P4处具有突变的野生型序列的RCL。

[0040] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)的一个或多个突变可以包含P1' 位置处的突变或由该突变组成。优选地,该突变是替换(substitution)。野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的天然P1' 残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的非天然残基替换。例如, α_1 AT或PCI的野生型序列中的P1' 位置的天然S残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中S以外的残基替换。

[0041] 野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的天然P1' 残基可以被以下残基替换:大的极性残基,如Q、N、Y;大的疏水性残基,如I、M和V;带正电荷的残基,如R、H或K;或者另一种残基,如C、A、S和E。

[0042] 在一些优选的实施方式中,可以将P1' 残基修饰为大的极性残基,如Q、N、Y;大的疏水性残基,如V;或者带正电荷的残基,如R、H或K;更优选地,带正电荷的残基或大的极性残基,如H、K、R或Q;最优选K。

[0043] 在其它实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中P1' 残基可以是未修饰的。例如,在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中P1' 位置的残基可以是在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中P1' 残基处的残基。

[0044] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)中的一个或多个突变可以包含P2残基处的突变或由该突变组成。优选地,该突变是替换。例如,野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的天然P2残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的非天然残基替换。

[0045] 野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的天然P2残基可以被以下各项替换:大的极性残基,如D、Q、N、Y;大的疏水性残基,如W、L、I、V或F;带正电荷的残基,如R、H或K;或者另一残基,如C、A、T、S或P。

[0046] 在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中P2残基可以是P以外的残基。

[0047] 在一些优选的实施方式中,可以将P2残基修饰为大的极性残基,如Q、N、Y;大的疏水性残基,如W;或带正电荷的残基,如R、H或K,最优选带正电荷的残基,如H、K或R,优选K。

[0048] 在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中P2残基可以是未修饰的。例如,在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中P2位置的残基可以是在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中P2残基处的残基。

[0049] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的一个或多个突变可以包含P1' 和/或P2残基

处的替换或者由该替换组成,即位于野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列RCL中P1' 和/或P2位置的残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的其它残基替换。

[0050] 在优选的实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在RCL的P2和P1' 位置具有突变。

[0051] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的P2和P1' 位置处的适合的残基是如上所述的。

[0052] 在本文所述的一些修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中,P1' 和P2残基中的至少一个可以是带正电荷的残基,如R、H或K,或者大的极性残基,如D、Y、Q或N;大的疏水性残基,如W、L、F、V、M或I;或者另一种残基,如L、C、A、E、T、S或P。优选地,P1' 和P2残基中的至少一个是带正电荷的残基,如R、H或K;大的极性残基,如Y、Q或N;或者大的疏水性残基,如W、L、F、V或I。

[0053] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中P2和P1' 残基的实例分别包括KK、FK、RK、VK、LK、QK、CK、PK、FR、HR、IR、SR、TR、VR、YR、AR、PR、RS、KS、QV、RV、RI、RH、KH、TH、RC、RA、LY、QY、TY、DM、TM、WN、RN、HN、TN、KN、NN、PE、RQ、KQ和TQ。

[0054] 在一些优选的实施方式中,可以将P1' 和P2残基两者修饰为带正电荷的残基,如K、H或R,最优选K。

[0055] 在一些实施方式中,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P2和P1' 残基分别可以除PN、FS、QS、AS、TS、HS、TA、PT、CC、PS、PT、PM、PH、PA或PC以外的残基。例如,P2和P1' 残基可以是除PCI支架中的PN、FS、QS、AS、TS、HS、TA、PT、CC或PC以外的残基或者可以是除在 α_1 AT支架中的PS、PT、PM、PH或PA以外的残基。

[0056] 在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P1残基可以是未修饰的。例如,在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中P1位置的残基可以是在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中P1残基处的残基。例如,修饰的PCI中的P1残基可以是R残基。

[0057] 在其它实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中P1残基可以是突变的。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)中的一个或多个突变还包含P1残基处的突变。优选地,该突变是替换。野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的天然P1残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的非天然残基替换。

[0058] 在一些实施方式中,可以将P1残基突变或修饰成带正电荷的残基,如H、K或R,优选R。

[0059] 优选地,野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的P1位置处的非带正电荷的天然残基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中带正电荷的残基替换。例如,野生型 α_1 AT的P1位置处的M可以被修饰的 α_1 AT中的带正电荷的残基,如R替换。 α_1 AT的Pittsburgh (Pitts) 变体在残基358处具有突变,其在P1位置用R残基替换M残基。

[0060] 在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基可以是未修饰的。例如,在修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中P4位置的残基可以是在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中P4残基处的残基。例如,PCI支架中的P4残基可以是F,并且 α_1 AT支架中的P4残基可以是A。

[0061] 在其它实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基可以是突变的。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的反应中心环(RCL)中的一个或多个突变还包含P4残基处的突变。

[0062] 优选地,所述突变是替换。在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的P4残基处的残

基可以被修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中不同的残基替换。例如,可以将在修饰的PCI中的P4残基突变或修饰成F以外的残基,并且在修饰的 α_1 AT中的P4残基可以突变或修饰成A以外的残基。

[0063] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL的P4位置中适合的残基包括S、R、V、C、W、K、G、L、H、F、T、Q和A。

[0064] 在如本文所述的修饰的促凝丝氨酸蛋白酶抑制剂的实例中,

- [0065] (1) P4残基是Q, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是N;
- [0066] (2) P4残基是K, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是H;
- [0067] (3) P4残基是S, P2残基是L, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0068] (4) P4残基是H, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是V;
- [0069] (5) P4残基是F, P2残基是K, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0070] (6) P4残基是F, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0071] (7) P4残基是F, P2残基是V, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0072] (8) P4残基是C, P2残基是L, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0073] (9) P4残基是F, P2残基是F, P1残基是R并且P1' 残基是R;
- [0074] (10) P4残基是S, P2残基是H, P1残基是R并且P1' 残基是R;
- [0075] (11) P4残基是G, P2残基是I, P1残基是R并且P1' 残基是R;
- [0076] (12) P4残基是R, P2残基是Q, P1残基是R并且P1' 残基是V;
- [0077] (13) P4残基是T, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是V;
- [0078] (14) P4残基是R, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是I;
- [0079] (15) P4残基是V, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是I;
- [0080] (16) P4残基是L, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是I;
- [0081] (17) P4残基是T, P2残基是L, P1残基是R并且P1' 残基是Y;
- [0082] (18) P4残基是A, P2残基是Q, P1残基是R并且P1' 残基是Y;
- [0083] (19) P4残基是K, P2残基是D, P1残基是R并且P1' 残基是M;
- [0084] (20) P4残基是W, P2残基是W, P1残基是R并且P1' 残基是N;
- [0085] (21) P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R并且P1' 残基是S;
- [0086] (22) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是S;
- [0087] (23) P4残基是A, P2残基是P, P1残基是R并且P1' 残基是E;
- [0088] (24) P4残基是A, P2残基是P, P1残基是R并且P1' 残基是R;
- [0089] (25) P4残基是A, P2残基是P, P1残基是R并且P1' 残基是K;
- [0090] (26) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是M;
- [0091] (27) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是H;
- [0092] (28) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是Q;
- [0093] (29) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是N;
- [0094] (30) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是Y;
- [0095] (32) P4残基是A, P2残基是T, P1残基是R并且P1' 残基是R;
- [0096] (33) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是A;
- [0097] (34) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1' 残基是H;

- [0098] (35) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1'残基是C;
- [0099] (36) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1'残基是N;
- [0100] (37) P4残基是A, P2残基是S, P1残基是R并且P1'残基是R;
- [0101] (38) P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R并且P1'残基是N;
- [0102] (39) P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R并且P1'残基是H;
- [0103] (40) P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R并且P1'残基是K;
- [0104] (41) P4残基是A, P2残基是V, P1残基是R并且P1'残基是R;
- [0105] (42) P4残基是A, P2残基是Y, P1残基是R并且P1'残基是R;
- [0106] (43) P4残基是A, P2残基是A, P1残基是R并且P1'残基是R;
- [0107] (44) P4残基是A, P2残基是C, P1残基是R并且P1'残基是K;
- [0108] (45) P4残基是A, P2残基是W, P1残基是R并且P1'残基是N;
- [0109] (46) P4残基是A, P2残基是H, P1残基是R并且P1'残基是N;
- [0110] (47) P4残基是A, P2残基是Q, P1残基是R并且P1'残基是K; 或者
- [0111] (48) P4残基是A, P2残基是N, P1残基是R并且P1'残基是N。
- [0112] (49) P4残基是F, P2残基是F, P1残基是R并且P1'残基是K。
- [0113] (50) P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R并且P1'残基是Q,
- [0114] (51) P4残基是A, P2残基是R, P1残基是R并且P1'残基是Q。
- [0115] 在一些优选的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中, P4残基是A, P2残基是K, P1残基是R, 并且P1'残基是K。
- [0116] 在一些实施方式中, 如本文所述的修饰的促凝丝氨酸蛋白酶抑制剂中P4、P2和P1'位置处的残基分别可以是除HPN、DKN、HPE、FFS、LQS、HAS、YTS、AHS、ATA、LPT、ACC、APT、APA、APM、APH、APS和VPC以外的残基。例如, 修饰的PCI可以在P4、P2和P1'位置具有除HPN、DKN、HPE、FFS、LQS、HAS、YTS、AHS、ATA、LPT、ACC和VPC以外的残基, 并且修饰的 α_1 AT可以在P4、P2和P1'位置具有除APT、APA、APM或APH以外的残基。在一些实施方式中, 如本文所述的修饰的促凝丝氨酸蛋白酶抑制剂中P4、P2和P1'位置处的残基的组合可以是非天然存在的, 即P4、P2和P1'位置处的残基的组合在亲代野生型(即未修饰的)丝氨酸蛋白酶抑制剂中或者在其它野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂中不存在。
- [0117] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含野生型(即未修饰的)丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列, 优选地, 如上所述在其RCL中具有一个或多个突变并且任选地在RCL以外具有一个或多个其它突变的成熟野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂。
- [0118] 野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列本领域中是熟知的, 并且可以包括如本文所示的SEQ ID NO:1至11。野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列可以包括成熟野生型蛋白的序列。
- [0119] 包含其前肽的成熟的蛋白C抑制物(PCI)序列对应于SEQ ID NO:1的残基20至406。成熟的 α_1 -抗胰凝乳蛋白酶对应于SEQ ID NO:2的残基26至423。成熟的C1-酯酶抑制剂(esterase inhibitor)序列对应于SEQ ID NO:3的残基23-500。成熟的 α_2 -抗血纤维蛋白酶(抗纤维蛋白溶酶, antipiasmin)序列对应于SEQ ID NO:4的残基28-491。成熟的抗凝血酶(ATIII)序列对应于SEQ ID NO:5的残基33-464。成熟的肝素辅因子II序列对应于SEQ ID NO:6的残基20-499。成熟的 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 AT)序列对应于SEQ ID NO:7的残基25-418。成熟的激肽释放酶结合蛋白(人源性激肽释放酶结合蛋白, kallistatin)序列对应于SEQ ID

NO:8的残基21-427。成熟的纤溶酶原激活物抑制剂(plasminogen activator inhibitor)序列对应于SEQ ID NO:9的残基24-402。成熟的蛋白Z依赖性抑制剂序列对应于SEQ ID NO:10的残基22-444。成熟的蛋白酶连接素(蛋白酶连接蛋白,protease nexin)1同种型序列对应于SEQ ID NO:11的残基20-398。

[0120] 除了如上所述的RCL中残基的突变之外,相对于野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1至11,优选SEQ ID NO:1或7的一个的成熟丝氨酸蛋白酶抑制剂序列),修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以具有50个或更少的改变的氨基酸残基,优选45个或更少、40个或更少、30个或更少、20个或更少、15个或更少、10个或更少、5个或更少的或者3个或更少的改变的氨基酸残基。例如,除了如上所述的突变或改变的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中1、2、3或4个氨基酸残基(即位置P1'和/或P2以及可选的P1和/或P4处的残基)之外,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含具有50个或更少、45个或更少、40个或更少、30个或更少、20个或更少、15个或更少、10个或更少、5个或更少的或者3个或更少的突变或改变的氨基酸残基的野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的序列。

[0121] 野生型氨基酸序列中的氨基酸残基可以通过插入、缺失或替换来改变或突变,优选替换为不同的氨基酸残基。这些改变可以通过编码核酸中一个或多个核苷酸的添加、插入、缺失或替换引起。

[0122] 例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含具有50个或更少的突变的SEQ ID NO:12的残基25-418的氨基酸序列,其中所述突变位于除P4、P2、P1和P1'的位置,即修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的P4残基是A,P2残基是K,P1残基是R并且P1'残基是K。

[0123] SEQ ID NO:12所示的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的P4残基位于位置379(成熟蛋白的355),P2残基位于位置381(成熟蛋白的357),P1残基位于位置382(成熟蛋白的358)并且P1'残基位于位置383(成熟蛋白的359)。

[0124] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以与野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的野生型氨基酸序列(例如,SEQ ID NO:1至11,优选地SEQ ID NO:1或7中任一个的成熟丝氨酸蛋白酶抑制剂序列)共有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少约80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性(序列一致性,sequence identity)。

[0125] 例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含与SEQ ID NO:12的残基25-418具有至少50%序列同一性的氨基酸序列,其中修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的P4残基为A,P2残基为K,P1残基为R并且P1'残基为K。

[0126] 参考算法GAP(Wisconsin GCG package,Accelrys Inc,San Diego USA)常规定义序列同一性。GAP使用Needleman和Wunsch算法来比对两条完整序列,使得配对的数目最大并且缺口数目最小。通常,使用默认参数,其中缺口产生罚分=12并且缺口延伸罚分=4。GAP的使用可以是优选的,但是可以使用其它算法,例如BLAST(其使用了Altschul et al.(1990)J.Mol.Biol.215:405-410的方法),FASTA(其使用了Pearson和Lipman(1988)PNAS USA 85:2444-2448的方法)或者Smith-Waterman算法(Smith和Waterman(1981)J.Mol Biol.147:195-197),或者Altschul et al.(1990)(如上)的TBLASTN程序,其通常使用默认参数。特别地,可以使用psi-Blast算法(Nucl.Acids Res.(1997)25 3389-3402)。还可以使用Genomequest™软件(Gene-IT,Worcester MAUSA)确定序列同一性和相似度。

[0127] 优选地,对本文所述的相关序列的全长进行序列比较。

[0128] 优选地,如本文所述的修饰的促凝血丝氨酸蛋白酶抑制剂,包含RCL共有序列P17 E、P16 S/E/K/R、P15 G、P14 T/S、P12-P9(A/G/S)₄。

[0129] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂还可以包含在野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中的保守的一个或多个残基。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以包含以下残基中的一些或全部(根据它们在 α_1 AT中的位置编号):33F、49N、53S、54P、56S、61L、67G、72T、80L、130F、147F、157I、158N、161V、165T、167G、169I、180T、184L、186N、190F、191K、192G、194W、198F、203T、208F、218V、220M、221M、277Y、254L、255P、289P、290K、299L、303L、307G、312F、316A、327L、334H、342E、344G、347A、369P、370F、383L、384F、386G和391P(Irving et al 2008)。可以使用常规序列分析容易地确定其它丝氨酸蛋白酶抑制剂序列中相应的保守残基。

[0130] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL以外的突变或变化可以包括修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中一个或多个Cys残基的替换,如 α_1 AT的C232残基(根据成熟序列编号),以消除二硫桥键(bridge)的形成或其它修饰;野生型序列N末端残基的缺失或替换,例如以利于表达;或者修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的肝素结合位点中的残基的突变或修饰(即螺旋D或螺旋H)以改变修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的肝素结合活性。

[0131] 在一些实施方式中,相对于野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以具有N末端截短。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以在N末端具有10至30个残基的截短,优选地,约20个残基的截短。

[0132] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂中的一个或多个残基可以是非天然氨基酸,修饰的氨基酸或D-氨基酸。这些氨基酸的使用是本领域技术人员熟知的。

[0133] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以表现出野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂的二级结构,例如修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以表现出包含3个 β 折叠、8-9个 α 螺旋和约20个残基的柔性RCL的结构。

[0134] 在一些优选的实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以由野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂(如本所描述的,在其反应中心环(RCL)中具有一个或多个突变)的氨基酸序列组成。

[0135] 优选地,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在人体中是非免疫原性的。例如,野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂可以是人丝氨酸蛋白酶抑制剂,优选人血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0136] 野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂可以是 α_1 -抗胰凝乳蛋白酶(SERPINA3)、 α_2 -抗血纤溶蛋白酶(SERPINF2)、抗凝血酶(ATIII)(SERPINC1)、肝素辅因子II(HCII)(SERPIND1)、蛋白C抑制物(PCI)(SERPINA5)、 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 AT)(SERPINA1)、激肽释放酶结合蛋白(SERPINA4)、纤溶酶原激活物抑制剂-1(SERPINE1)、C1-酯酶抑制剂(SERPING1)、蛋白酶连接素1(SERPINE2)或者蛋白Z-依赖性抑制剂(SERPINA10)(Whisstock et al JBC.285 32 24307-24312;Rau et al Journal of Thrombosis and Hemostasis,5(Suppl.1):102-115;Huntington,Journal of Thrombosis and Hemostasis,9(Suppl.1):26-34)。

[0137] 优选地,野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂为ATIII、HCII、PCI或 α_1 AT,最优选PCI或 α_1 AT(Huntington et al Cell.Mol.Life Sci.66(2009)113-121;Li et al JBC.283 51 36039-36045;和Li et al PNAS 2008 105 4661-4666)。

[0138] α_1 -抗胰凝乳蛋白酶(SERPINA3;基因ID 12)可以具有NP_001076.2GI:50659080的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:2),并且可以通过NM_001085.4GI:73858562的参考核苷酸序

列编码。

[0139] C1-酯酶抑制剂(SERPING1;基因ID 710)可以具有NP_000053.2GI:73858568的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:3),并且可以通过NM_000062.2GI:73858567所示的参考核苷酸序列编码。

[0140] α_2 -抗血纤维蛋白酶(SERPINF2;基因ID 5345)可以具有NP_000925.2GI:115583663的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:4),并且可以通过NM_001165920.1GI:260064047的参考核苷酸序列编码。

[0141] 抗凝血酶(ATIII)(SERPINC1;基因ID 462)可以具有NP_000479.1GI:4502261的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:5),并且可以通过NM_000488.3GI:254588059的参考核苷酸序列编码。

[0142] 肝素辅因子II(HCII)(SERPIND1;基因ID 3053)可以具有NP_000176.2GI:73858566的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:6),并且可以通过NM_000185.3GI:73858565的参考核苷酸序列编码。

[0143] 蛋白C抑制物(PCI)(SERPINA5;基因ID 5104)可以具有NP_000615.3GI:194018472的参考氨基酸序列,并且可以通过NM_000624.5GI:401782581的参考核苷酸序列编码。在一些优选的实施方式中,蛋白C抑制物(PCI)可以是由SNP rs6115,VAR_013081的取代所产生的等位变体(S45N变体,根据包括前肽的成熟蛋白质编号)并且具有SEQ ID NO:1所示的序列。SEQ ID NO:1的残基1-19对应于信号序列。在血浆中,PCI可以以包括SEQ ID NO:1的残基20-25所示的前肽的全长形式存在(即SEQ ID NO:1的残基20-406)或者以缺少前肽的N末端裂解形式存在(即SEQ ID NO:1的残基26-406)。

[0144] α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 AT)(SERPINA1;基因ID 5265)可以具有NP_000286.3GI:50363217的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:7),并且可以通过NM_000295.4GI:189163524的参考核苷酸序列编码。

[0145] 激肽释放酶结合蛋白(SERPINA4;基因ID 5267)可以具有NP_006206.2GI:21361302的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:8),并且可以通过NM_006215.2GI:21361301的参考核苷酸序列编码。

[0146] 纤溶酶原激活物抑制剂-1(SERPINE1;基因ID 5054)可以具有NP_000593.1GI:10835159的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:9),并且可以通过NM_000602.4GI:383286745的参考核苷酸序列编码。

[0147] 蛋白Z-依赖性抑制剂(PZI)(Serpina10;基因ID 51156)可以具有NP_057270.1GI:7705879(SEQ ID NO:10)的参考氨基酸序列,并且可以通过NM_016186.2GI:154759289的参考核苷酸序列编码。

[0148] 蛋白酶连接素1(PN1)(Serpine2;基因ID 5270)可以具有NP_001130000.1GI:24307907、NP_001130002.1GI:211904152或NP_006207.1GI:211904156的参考氨基酸序列(SEQ ID NO:11),并且可以通过NM_001136528.1GI:211904151、NM_001136530.1GI:211904155或者NM_006216.3GI:211904150的参考核苷酸序列编码。

[0149] 在SEQ ID NO:1至11中以粗体突出显示了如上所述可以突变的P1'、P1、P2和P4残基。

[0150] 相对于未修饰的野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂,RCL中的一个或多个突变改变了修

饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的特异性。与野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂相比,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂表现出相对于促凝血蛋白酶对抗凝血蛋白酶的提高的选择性。

[0151] 优选地,相对于其它凝血蛋白酶,特别是凝血酶、fXa、fVIIa、fIXa和fXIIa中的一个或多个的促凝血蛋白酶的抑制,RCL内的一个或多个突变增加了修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制。

[0152] 例如,相对于凝血酶的抑制,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的一个或多个突变可以提高修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制。相对于凝血酶,在存在或不存在肝素的情况下,APC的选择性抑制可以提高。

[0153] 另外,相对于促凝血蛋白酶fXa、fVIIa、fIXa和fXIIa中的1、2、3或所有4个的抑制,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的RCL中的一个或多个突变可以提高修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制。

[0154] 相对于凝血酶及其它促凝血蛋白酶,如本文所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂显示出比未修饰的野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的更大的抑制。

[0155] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以显示出比凝血酶抑制的对APC的更大的抑制。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以比修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对凝血酶的抑制大至少5倍、至少10倍、至少100倍或至少1000倍。在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以以比凝血酶抑制的二级速率常数(second-order rate constant)至少5倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大的二级速率常数(k_2)抑制APC。优选地,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制的化学计量为1。

[0156] 优选地,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以结合并抑制APC,但没有表现出对凝血酶的结合或抑制或者基本无结合或抑制。

[0157] 相对于fVIIa、fIXa、fXa和fXIIa中的1、2、3或所有4个的抑制,RCL中的一个或多个突变也可以提高APC的抑制。相对于fVIIa、fIXa、fXa和/或fXIIa,在存在或不存在肝素的情况下,APC的抑制可以提高。

[0158] 例如,相对于fVIIa、fIXa、fXa和fXIIa中的1、2、3或所有4个,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以表现出比野生型丝氨酸蛋白酶抑制剂更大的APC抑制。

[0159] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以比对fVIIa的抑制更强。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以是修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对fVIIa的抑制的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以以这样的二级速率常数(k_2)抑制APC,该二级速率常数(k_2)是fVIIa的抑制的二级速率常数的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。

[0160] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以比对fIXa的抑制更强。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以是修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对fIXa的抑制的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以以这样的二级速率常数(k_2)抑制APC,该二级速率常数(k_2)是fIXa的抑制的二级速率常数的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。

[0161] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以比对fXa的抑制更强。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以是修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对fXa的抑制的至少1.5倍大、至少2倍大、至少10倍大、至少100大倍或至少1000倍大。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制

剂可以以这样的二级速率常数 (k_2) 抑制APC, 该二级速率常数 (k_2) 是fXIa的抑制的二级速率常数的至少1.5倍大、至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。

[0162] 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以比对fXIa的抑制更强。例如, 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的抑制可以是修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对fXIa的抑制的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以以这样的二级速率常数 (k_2) 抑制APC, 该二级速率常数 (k_2) 是fXIa的抑制的二级速率常数的至少2倍大、至少10倍大、至少100倍大或至少1000倍大。

[0163] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以是融合蛋白的一部分, 其含有修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂序列以外的一个或多个异源氨基酸序列。例如, 包含修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的融合蛋白还可以包含一个或多个可以改善修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的稳定性、药物动力学、靶向性、亲合力、纯化和生产特性的另外的结构域。

[0164] 适合的其它结构域包括免疫球蛋白Fc结构域。免疫球蛋白Fc结构域在本领域中是熟知的, 并且包括人IgG1 Fc结构域。人免疫球蛋白Fc结构域可以位于修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的N-末端或C-末端。

[0165] 使用在本领域中标准的合成或重组技术可以提供如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0166] 在一些实施方式中, 修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以产生为进一步包含亲合标签的融合蛋白, 该亲和标签可以, 例如用于纯化。亲和标签是构成特异性结合对的一个成员的异源肽序列。含有所述标签的多肽可以 (例如) 在亲和层析柱中, 通过特异性结合对的另一个成员结合至该多肽来纯化。例如, 标签序列可以构成抗体分子结合的表位。

[0167] 适合的亲合标签包括, 例如谷胱甘肽-S-转移酶 (GST)、麦芽糖结合结构域 (MBD)、MRGS (H)₆、DYKDDDDK (FLAGTM)、T7-、S- (KETAAAKFERQHMDs)、聚-Arg (R₅₋₆)、聚-His (H₂₋₁₀)、聚-Cys (C₄)、聚-Phe (F₁₁)、聚-Asp (D₅₋₁₆)、SUMO标签 (Invitrogen Champion pET SUMO表达系统)、Strept-标签II (WSHPQFEK)、c-myc (EQKLISEEDL)、流感 (Influenza) -HA标签 (Murray, P.J. et al (1995) Anal Biochem 229, 170-9)、Glu-Glu-Phe标签 (Stammers, D.K. et al (1991) FEBS Lett 283, 298-302)、Tag.100 (Qiagen; 来源于哺乳动物MAP激酶2的12aa标签)、Cruz tag 09TM (MKAEFRRQESDR, Santa Cruz Biotechnology Inc.) 和Cruz tag 22TM (MRDALDRLDRLA, Santa Cruz Biotechnology Inc.)。在Terpe (2003) Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 523-533中综述了已知的标签序列。在优选的实施方式中, 可以使用聚-His标签, 如 (H)₆、His-SUMO标签 (Invitrogen Champion pET SUMO表达系统) 或MRGS (H)₆。

[0168] 纯化后, 可以, 例如使用位点-特异的蛋白酶将亲合标签序列与修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂分离。

[0169] 在一些实施方式中, 可以将修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂偶联至适合的信号前导肽 (导肽, leader peptide) 以指导融合多肽从细胞向培养基分泌。适合的信号前导肽的范围在本领域中是已知的。信号前导肽可以是丝氨酸蛋白酶抑制剂信号序列或者可以对修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂是异源的, 即它可以是非丝氨酸蛋白酶抑制剂信号序列。例如, 可以使用 α -因子分泌信号或BiP信号序列。优选地, 在所述多肽表达后, 通过翻译后处理除去信号肽。

[0170] 在不含污染物(如,未修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂及其它多肽和/或血清成分)的意义上,可以分离,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0171] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制活化蛋白C (APC) 的一种或多种活性。例如,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以抑制一种或多种APC底物,如fVa或fVIIIa的蛋白水解裂解(蛋白水解酶解,proteolytic cleavage)。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂与APC的结合可以导致fVa、fVIIIa和/或另一APC底物的蛋白水解裂解降低至少5倍、至少10倍或至少15倍。在一些实施方式中,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对APC的结合可以导致APC对fVa或fVIIIa底物的不可检测的裂解(断裂,酶解,cleavage)。

[0172] 用于测量APC活性的技术(例如,通过体外测量APC底物蛋白水解裂解)在本领域中是标准的并且是本文所述的。在确定APC活性中使用的适合的试验(测定,assay)包括,例如测量速率常数的标准动力学试验,和凝血试验,包括凝血酶产生试验(TGA)。

[0173] 用于测量促凝血蛋白酶活性的技术(例如,通过体外测量发色底物的蛋白水解裂解)在本领域中是标准的并且是本文所述的。在确定蛋白酶活性中使用的适合的试验包括,例如测量速率常数的标准动力学试验,和凝血试验,包括凝血酶产生试验(TGA)、凝血酶原时间试验(PT)和活化部分凝血活酶时间试验(aPTT)。

[0174] 在一些实施方式中,本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂还可以通过化学修饰,例如通过聚乙二醇化(PEG化,PEGylation),或者通过结合于脂质体来修饰以改善它们的药物特性,例如通过提高体内半衰期改善药物特性。

[0175] 可以将如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂连接到一个或多个聚乙二醇(PEG) 或者其它部分以提高修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的体内半衰期(Cantin et al.2002,Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.27;659-665)。例如,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以是单-聚乙二醇化的或者是聚-聚乙二醇化的(例如,具有2-6个PEG部分)。适合的聚乙二醇化方法在本领域中是熟知的。

[0176] 可以确定修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对凝血和出血的影响。适合的方法在本领域中是标准的。例如,可以使用本文所述的凝血酶产生试验(TGA) 或活化部分凝血活酶时间试验(activated partial thromboplastin time assay)或凝血酶原时间试验确定修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对凝血酶产生的影响。适合的体内模型包括如本文所述的提睾肌微动脉激光损伤模型,FeCl₃颈动脉模型和尾部剪裁试验(tail clip assay)。其它适合的凝血模型在本领域中是熟知的。

[0177] 本发明的其它方面提供了如上所述的编码修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸和包含该核酸的载体。

[0178] 可以选择或构建适合的载体,该载体包括合适的调控序列,包括启动子序列、终止子片段、多腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因以及根据情况的其它序列。优选地,所述载体含有适当的调控序列以使得核酸在哺乳动物细胞中表达。载体还可以包含序列,如复制起点、启动子区和可选择的标志物,其使得载体能够在细菌宿主,如大肠杆菌(E.coli)中选择、表达和复制。

[0179] 根据情况,载体可以是质粒、病毒(例如,噬菌体)或噬菌粒。有关进一步的详细情况,参见,例如Molecular Cloning:Laboratory Manual:第3版,Russell et al,2001,Cold Spring Harbor Laboratory Press。在Current Protocols in Molecular Biology,

Ausubel et al编辑, John Wiley&Sons, 1992中详细描述了用于核酸操作的多种已知技术和规程, 例如核酸构建体的制备、突变发生 (mutagenesis)、测序、DNA导入细胞和基因表达。

[0180] 可以将如本文所述的核酸或载体引入宿主细胞。

[0181] 本发明另一方面提供了包含核酸或载体的重组细胞, 该核酸或载体表达含有如上所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂或由所述修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂组成的多肽。

[0182] 适合重组的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的生产的宿主细胞的范围在本领域中是已知的。适合的宿主细胞可以包括原核细胞, 特别是细菌, 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 以及真核细胞, 包括哺乳动物细胞, 如CHO和CHO-来源的细胞系 (Lec细胞)、HeLa、COS、HEK293和HEK-EBNA细胞, 两栖动物细胞, 如非洲蟾蜍属卵母细胞, 昆虫细胞, 如粉纹夜蛾 (*trichoplusia ni*)、Sf9和Sf21, 以及酵母细胞, 如巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*)。

[0183] 在本领域中很好地建立了将核酸引入细胞的技术, 并且根据具体情况, 可以使用任何适用的技术。对于真核细胞, 适合的方法可以包括磷酸钙转染、DEAE-右旋糖酐、电穿孔、脂质体-介导的转染和使用反转录病毒或其它病毒, 例如腺病毒、AAV、慢病毒或牛痘的转导 (transduction)。对于细菌细胞, 适合的方法可以包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体转染。

[0184] 可以在鉴别含有所关心的核酸的克隆中使用标记基因 (如, 抗生素抗性) 或敏感基因, 如本领域熟知的。

[0185] 所引入的核酸可以是细胞内的染色体外载体或者可以将核酸整合到宿主细胞的基因组中。可以根据标准技术, 通过将序列包括在核酸或载体内 (促进与基因组的重组) 来促进整合。

[0186] 在一些实施方式中, 编码如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸可以包含在适合于向个体施用的载体内, 例如用于基因疗法应用。适合的载体包括反转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和AAT载体。

[0187] 引入之后可以表达核酸以产生编码的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。在一些实施方式中, 可以在核酸表达的条件下体外培养宿主细胞 (其可以包括实际已转化的细胞, 尽管更可能的是所述细胞是转化细胞的子代), 从而产生编码的丝氨酸蛋白酶抑制剂多肽。当使用诱导型启动子时, 表达可能需要激活诱导型启动子。

[0188] 在多肽产生后, 可以分离和/或纯化包含修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂或由修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂所组成的表达的多肽。这可以使用本领域中已知的任何便利方法实现。用于重组多肽纯化的技术在本领域中是熟知的并且包括, 例如HPLC、FPLC或亲和色谱法。在一些实施方式中, 可以使用如上所述的多肽上的亲和标签进行纯化。

[0189] 本发明另一方面提供了产生修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的方法, 其包括在宿主细胞中表达如上所述的编码修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸, 和任选地分离和/或纯化由此产生的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0190] 可以进一步研究包含根据描述的制备的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂或由其组成的多肽, 例如可以确定药理学特性和/或活性。蛋白分析的方法和手段在本领域中是熟知的。

[0191] 如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、编码修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核

酸或者表达修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的重组细胞在治疗中可以是有益的。例如,可以将如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、编码修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸或者表达修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的重组细胞给予个体以用于出血治疗。

[0192] 尽管可以单独给予(administer)修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,但是通常将以药物组合物的形式给予修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂,该药物组合物可以包含除修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂之外的至少一种成分,例如编码修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的核酸或者表达修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的重组细胞。因此,除了修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞之外,药物组合物可以包含本领域技术人员熟知的药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或其它材料。如本文所使用的术语“药学上可接受的”是指这样的化合物、材料、组合物和/或药剂形式,其在合理的医学判断的范围内适合接触受试者(例如,人)的组织而无过度毒性、刺激、过敏反应或其它问题或并发症,与合理的效益/风险比率相称。在与制剂的其他成分相容的意义上,每种载体、赋形剂等也必须是“可接受的”。载体或其它材料的准确性将取决于施用途,其可以通过丸剂、输注(infusion)、注射或任何其它适合的途径进行,如以下所讨论的。

[0193] 在一些实施方式中,可以在给予前用于复原(重构,reconstitution)的冻干形式提供修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞。例如,在向个体给予前,可以将冻干的丝氨酸蛋白酶抑制剂在无菌水中复原并与盐水混合。

[0194] 对于肠胃外给予,例如皮下或静脉内给予,例如通过注射给予,包含修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞的药物组合物可以处于无热原并且具有适合的pH、等渗性和稳定性的肠胃外的可接受的水溶液形式。本领域相关技术人员使用,例如等渗媒介(vehicle),如氯化钠注射液、林格氏注射剂(Ringer's Injection)、乳酸林格氏注射剂能够很好地制备适合的溶液。可以根据需要使用防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其它添加剂,其包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐及其它有机酸;抗氧化剂,如抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如,十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲氯铵(hexamethonium chloride);苯扎氯铵、苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;烷基对羟苯甲酸(alkyl paraben),如对羟苯甲酸甲酯或对羟苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3'-戊醇;和间甲酚);低分子量多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖及其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子(counter-ion),如钠;金属复合物(例如,锌-蛋白质复合物);和/或非离子型表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。适合的载体、赋形剂等可见于标准药物教科书,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1990。

[0195] 药物组合物和制剂可以方便地以单位剂量形式提供,并且可以通过任何药学领域中熟知的方法制备。这些方法包括使修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂与形成一种或多种副成分的载体结合的步骤。一般地,通过将活性化合物与液体载体或细碎的固体载体或两者均匀并且紧密地结合,如有必要,然后将产物成形来制备所述组合物。

[0196] 优选地,将如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞配制成用于静脉内或皮下给予的药物组合物。

[0197] 可以单独给予包含修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞的药物组合物,或者根据待治疗的病况,与其它治疗结合,同时或顺序给予。

[0198] 在人或动物体的治疗方法,包括治疗和预防或预防性治疗(例如,在个体中病况发生前治疗以降低个体中发生病况的风险;延迟其发生;或减轻发生后的严重性)中,可以使用如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂、核酸或细胞。治疗方法可以包括向需要其的个体给予修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0199] 适合于如上所述的治疗的个体可以是哺乳动物,如啮齿类(例如,豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠(例如,小鼠)、犬科动物(例如,狗)、猫科动物(例如,猫)、马(equine)(例如,马)、灵长类、类人猿(例如,猴或猿)、猴(例如,狨猴、狒狒)、猿(例如,大猩猩、黑猩猩、红毛猩猩(orange-utan)、长臂猿)或人。

[0200] 在一些优选的实施方式中,个体是人。在其它优选的实施方式中,可以使用非人哺乳动物,特别是通常用作证明在人类中的治疗效力的模型的哺乳动物(例如,鼠、灵长类、猪、犬科动物或兔动物)。以下示出了修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂对人和鼠APC抑制,但不抑制人或鼠凝血酶。

[0201] 通常,以“治疗有效的量”或“预防有效的量”给予,这足以表现出对患者的益处。这种益处可以是至少一种症状的至少改善。所给予的实际量以及给予速率和时间过程将取决于要治疗的疾病的性质和严重性、正在治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床状况、病症的病因、组合物的递送位点、给予方法、给予时间表以及医学从业人员已知的其它因素。

[0202] 可以单独给予组合物,或者根据待治疗的个体的情况,与其它治疗结合,同时或顺序给予。

[0203] 治疗处方(例如,剂量等的决定)在普通医生(general practioner)及其它医学医生的职责范围内并且可以取决于待治疗疾病的症状严重性和/或发展。治疗性多肽的适合剂量在本领域中是熟知的(Ledermann J.A.et al.(1991) Int.J.Cancer 47:659-664; Bagshawe K.D.et al(1991)Antibody,Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922)。根据情况对于可以使用正在给予的药剂类型,具体剂量可以在本文中或者在Physician'sDesk Reference(2003)中指明。可以通过在动物模型中比较修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的体外活性和体内活性来确定它的治疗有效量或适合剂量。用于推断(extrapolation)小鼠及其它试验动物中有效剂量方法是已知的。准确剂量将取决于多种因素,包括修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂是用于预防还是用于治疗、治疗面积的大小和位置、修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的准确性质以及连接到修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的任何可检测标记或其它分子的性质。

[0204] 典型的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的剂量在0.1mg/kg至100mg/kg的范围内,例如1至80mg/kg的范围内。例如,对于全身应用,可以使用100 μ g至1g范围内的剂量,对于局部给予,可以使用1 μ g至1mg范围内的剂量。可以给予初始较高的负荷剂量(loading dose),然后是一个或多个较低的剂量。这是成年患者单次治疗的剂量,对于儿童和婴儿可以按比例调整,并且可以以与分子量成正比来对其它修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂形式进行调整。根据医生的判断,可以以每天、每周两次、每周或每月的间隔重复治疗。个体治疗计划表可以依赖于修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂组合物的药物动力学和药效性质、给予途径和待治疗病况的性质。

[0205] 治疗可以是周期性的,并且给予之间的周期可以为约1周或以上,例如约2周或以上、约3周或以上、约4周或以上、1月一次或以上、约5周或以上或约6周或以上。例如,治疗可以是每2至4周或每4至8周。可以在手术之前和/或之后提供治疗和/或可以在创伤、外科疗法或侵入性手术的解剖位点直接给予或应用治疗。以上描述了适合的制剂和给予途径。

[0206] 在一些实施方式中,可以作为皮下注射给予如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂。例如,可以使用自动注射器给予皮下注射用于长期预防/治疗。

[0207] 在一些优选的实施方式中,取决于剂量,修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的治疗效果可以持续多个半衰期。

[0208] 本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂抑制APC而不抑制或基本不抑制促凝血因子,如凝血酶,并且可以用于治疗出血和出血性疾病,特别是由凝血酶产生减少或APC抗凝血途径活性提高所引起的疾病。

[0209] 止血(hemostasis)是对损伤的正常的凝血反应,即防止,例如受损的血管出血或流血。止血阻止了体内血管的出血和流血。修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以促进止血,即它们可以促进或提高对体内血管出血和流血的止血,例如在患有出血性疾病或创伤的个体中。

[0210] 本发明的方面提供:如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在人或动物体的治疗方法中的使用;如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在治疗出血或促进止血的方法中的使用;如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在用于治疗出血或促进止血的治疗的药剂生产中的使用;和包括向需要其的个体给予如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂的治疗出血或促进止血的方法。

[0211] 出血可以包括体内血管的出血或流血。

[0212] 适合于使用如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂治疗的个体可以患有出血性疾病。

[0213] 出血性疾病可以由凝血酶产生减少或APC抗凝血途径活性提高引起或与之有关。

[0214] 出血性疾病可以包括任何遗传性或获得性出血性疾病,其中存在凝血酶产生降低、纤维蛋白凝块形成降低或凝块稳定性降低。例如,出血性疾病可以包括因子VII、VIII、X、IX、XI和XIII的先天性缺乏;V和VIII混合缺乏;凝血酶原缺乏;纤维蛋白缺乏;和其它凝血因子罕见的缺乏;血友病A、B和C;与纤溶亢进有关的出血增加;由于计数血小板减少或血小板功能降低导致的出血增加;和血管性血友病(von willebrand)。

[0215] 获得性出血性疾病可以包括稀释性凝血障碍,它与大出血、由创伤和手术以及抗凝血疗法的影响所导致的出血有关。

[0216] 在一些实施方式中,个体可以抵抗外源凝血因子,如外源fVIII或fIX。例如,外源fVIII或fIX可以在个体中引起免疫应答,例如产生抑制性的同种异体抗体。

[0217] 适合于使用如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂进行治疗的个体可以患有获得性出血性疾病,如与创伤、手术或抗凝血疗法有关的出血。例如,适合于使用如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂进行治疗的个体可以经受创伤;或者可以经历或正在进行手术或抗凝血疗法。适合的个体可以在体内的一个或多个血管出血或具有出血风险。

[0218] 在一些实施方式中,如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以在以下情况的预防或治疗中使用:i)具有凝血因子同种异体抗体(alloantibody)的患者中的出血;ii)具

有抑制剂发展的高风险的患者中的出血,例如以避免发展出同种异体抗体;iii) 在没有抑制剂的情况下,患有因子VIII缺乏症的患者中的出血;iv) 患有先天性出血性疾病的患者中的出血,例如目前没有重组最佳置换疗法的先天性出血性疾病,如重度因子VII缺乏症、因子XI缺乏症、VIII&V混合缺乏症、因子X缺乏症和因子V缺乏症的出血;v) 血友病患者中的出血,例如置换疗法不合适或不可接受的患者的出血;或者vi) 获得性出血,包括与创伤、手术和抗凝血疗法有关的出血。

[0219] 本发明的其它方面提供了如本文所述的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂作为促凝剂的使用和修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂在出血治疗中抑制APC的使用。

[0220] 参考本发明公开,本发明的多个其它方面和实施方式对本领域技术人员是显而易见的。

[0221] 本发明的其它方面和实施方式提供了如上所述的方面和实施方式(其中术语“包括”由术语“由其组成”代替)以及如上所述的方面和实施方式,其中术语“包括”由术语“基本由其组成”代替。

[0222] 应理解的是除非上下文另外要求,否则本发明申请公开了如上所述的任何以上方面和实施方式的所有相互组合。类似地,除非上下文另外要求,否则本发明申请公开了优选和/或任选的特征单独或与任何另一个方面一起的所有组合。

[0223] 通过阅读本发明公开,以上实施方式的改变、其它实施方式及其改变对技术人员是显而易见的,并且因此它们在本发明的范围内。

[0224] 在本说明书中提及的所有文档和序列数据库条目出于所有目的以其全部内容通过引证并入本文。

[0225] 在本文中使用时,“和/或”将作为两种指定的特征或组成中的每个与另一个的具体的公开或者不与另一个的具体的公开。例如,“A和/或B”将被视为(i)A、(ii)B和(iii)A和B的每个的具体的公开,就好像它们中的每个在本文中单独说明一样。

[0226] 现将通过实施例并参考如上所述的附图和如下所述的表格来说明本发明的某些方面和实施方式。

[0227] 表1示出了A22 PCI (PCI具有N末端截短,起始于Ala22,编号使用成熟蛋白质序列,包括前肽)、FL α_1 AT Pitts (具有P1R Pittsburgh (Pitts) 突变的全长 α_1 AT) 和它们的变体对凝血酶和APC的抑制的二级速率常数。示出了标准偏差。*PCI的P2KP1' 变体对凝血酶抑制的速率常数是估计值,这是因为在初始抑制后,反应似乎未到达完全抑制,这可能是由于丝氨酸蛋白酶抑制剂向下穿梭于(下调,shuttled down) 底物途径或者共价丝氨酸蛋白酶抑制剂:蛋白酶抑制复合物的分离。

[0228] 表2示出了在存在肝素的情况下PCI和变体对凝血酶和APC抑制的二级速率常数。示出了标准偏差。*PCI的P2KP1' K变体的凝血酶抑制速率常数是来自残余凝血酶活性相对于时间的图的起始斜率的估计值。未实现完全抑制,可能是由于丝氨酸蛋白酶抑制剂向下穿梭于(shuttled down) 底物途径或者共价丝氨酸蛋白酶抑制剂:蛋白酶抑制复合物的分离。

[0229] 表3示出了 α_1 AT Pitts和PCI以及它们的变体对fXa的抑制的二级速率常数。示出了标准偏差。

[0230] 表4示出了PCI和PCI P2KP1' K变体对fXIa抑制的二级速率常数。示出了APC抑制用

于比较(来自表1)。示出了标准偏差。

[0231] 表5示出了通过靶向随机诱变产生的PCI变体对凝血酶和APC的抑制的二级速率常数。示出了标准偏差。示出WT和P2KP1' PCI的常数用于比较。*PCI的P2KP1' 变体对凝血酶抑制的速率常数是估计值,这是因为在初始抑制后,反应似乎未到达完全抑制,这可能是由于丝氨酸蛋白酶抑制剂向下穿梭于(shuttled down)底物途径或共价丝氨酸蛋白酶抑制剂:蛋白酶抑制复合物的解离。

[0232] 表6示出了FL α_1 AT Pitts C232S及其P2KP1' K变体对fXIa抑制的二级速率常数。示出了APC抑制用于比较(来自表1)。示出了标准偏差。

[0233] 表7示出了通过靶向随机诱变确定的PCI变体(相对于凝血酶抑制对APC抑制特异的)的RCL序列的一部分。所示出的序列来自于初始实验,其中评价了88个变体。以粗体示出了在该实验中不同的P4、P2和P1' 残基。示出了WT PCI和P2KP1' K PCI序列用于比较。

[0234] 表8示出了通过靶向随机诱变确定的PCI变体(相对于凝血酶抑制对APC抑制特异的)的RCL序列的一部分。所示出的序列来自于较大的实验,其中评价了460个变体。以粗体示出了在该实验中不同的P4、P2和P1' 残基。示出了WT PCI和P2KP1' K PCI序列用于比较。

[0235] 表9示出了通过靶向随机诱变确定的 α_1 AT变体(相对于凝血酶抑制对APC抑制特异的)的RCL序列的一部分。与WT α_1 AT和 α_1 AT Pitts两者相比,示出了序列。以粗体示出了P2和P1' 残基,用下划线显示P1残基。前缀示出了特定突变体的文库来源,其中表示为P2.nr.的突变体来自于P2变体文库,P1'.nr.来自于P1' 变体文库,并且标记为1-5.nr.的突变体来自于P2P1' 变体文库的板(plate)1-5。

[0236] 表10示出了通过靶向随机诱变确定的 α_1 AT变体(对APC比对凝血酶更特异的)子集对凝血酶和APC的抑制的二级速率常数。提供了标准偏差。提供了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K和FL α_1 AT Pitts C232S对凝血酶和APC的抑制的二级速率常数以用于比较。

[0237] 表11示出了PT和aPTT测定结果以研究在FL α_1 AT Pitts C232S背景中,通过随机诱变的命中物(hits)对促凝蛋白酶的抑制。使用1/4稀释的血浆进行PT试验以提高试验的灵敏度,并且除了对FL α_1 AT Pitts C232SP2RP1' C所示的反应重复2次外,其它重复3次,示出的误差为标准偏差。aPTT试验是单次实验,不示出误差。对于PT和aPTT两者,仅缓冲液作对照,其中将缓冲液(TBS)而不是蛋白加入至血浆。相对于对照,PT或aPTT中的提高是促凝蛋白酶抑制的指示。对于PT和aPTT试验两者,以5 μ M浓度使用丝氨酸蛋白酶抑制剂突变体。出于比较,P2K和P1' K突变体示出为3次重复的平均值。如表1和3中抑制速率常数所示,这些突变体显示出对APC比对凝血酶高的特异性,但是显著抑制fXa。因此,对于凝血酶以外的促凝蛋白酶的抑制,它们是优良的对比。ND表示未确定。

[0238] 表12示出了来自靶向随机诱变的 α_1 AT变体对fXa抑制的二级速率常数。本文评价的突变体表现出相对于凝血酶对APC的特异性、显著的APC抑制并且表现出无PT延长。大部分还表现出仅较少aPTT延长。由于这些特征,选择它们用于进一步分析。出于比较,还示出了FL α_1 AT Pitts C232S和FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的fXa抑制(来自表3)。

[0239] 表13示出了通过合并来自合理的和随机的诱变的信息发现的 α_1 AT的另外两种突变体的表征的总结。示出了FL α_1 AT Pitts C232S和FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K C232S用于比较(数据来自表1和3以及图5A和图5B)。P2RP1' Q和P2KP1' Q的aPTT是4次单独测量的平均值,示出的误差为标准偏差。括号中示出了对于具有缓冲液的血浆获得的值,再次以标准

偏差示出误差。对Pitts和P2KP1' K所示的aPTT是至少3次单独测量的结果,所示误差为标准偏差。括号中所示的值是对于具有缓冲液的血浆获得的值,以标准偏差示出误差。使用5 μ M 丝氨酸蛋白酶抑制剂的最最终浓度,获得了所有aPTT。该浓度的FL α_1 AT Pitts C232S使得血浆不可凝。所示300s的值是试验的截止值。以标准误差示出变体对凝血酶、APC和fXa抑制的二级速率常数。

[0240] 实验

[0241] 图1示出了该级联中的丝氨酸蛋白酶抑制剂的凝血级联和调控作用。两种途径导致凝血级联激活,外源级联(或者组织因子途径)和内源途径(接触激活途径)。激活的主要生理学途径认为是外源途径。在该途径中,在破损的血管表面暴露组织因子(TF)。然后,TF可以结合fVIIa和fVII。TF:fVIIa激活fVII以及TF:fVII自发激活为TF:fVIIa。TF:fVIIa将fX激活为fXa,并且这将凝血酶原激活为凝血酶(fIIa)(凝血级联的主要蛋白酶)。凝血酶通过蛋白酶激活受体(PAR)的裂解激活血小板并且将纤维蛋白原裂解为纤维蛋白。纤维蛋白通过fXIIIa交联,fXIIIa自身通过凝血酶激活以形成稳定的纤维蛋白凝块。另外,凝血酶激活正反馈机制以加强其自身形成。它将fVIII激活为fVIIIa,将fV激活为fVa。fVIIIa结合至fIXa以形成内源X酶(tenase)(Xase)复合物。内源X酶激活更多的fX。fXa可以结合至fVa以形成凝血酶原酶(促凝血球蛋白,prothrombinase)。凝血酶原酶将凝血酶原激活为凝血酶并在凝血开始后导致产生大部分凝血酶。除了凝血酶的正反馈机制,凝血酶也可以通过负反馈机制关闭其自身激活。当凝血酶结合其辅因子凝血调节蛋白(TM)时,凝血酶:TM复合物可以将蛋白C(PC)激活为活化蛋白C(APC)。APC裂解fVIIIa和fVa两者并使其失活,从而有效地切断了凝血酶的产生。丝氨酸蛋白酶抑制剂是凝血级联的重要抑制剂。图1示出了丝氨酸蛋白酶抑制剂、蛋白C抑制物(PCI)、抗凝血酶(ATIII)、肝素辅因子II(HCII)和 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 AT)的抑制作用。

[0242] 以下我们描述丝氨酸蛋白酶抑制剂向APC的特异性抑制剂的转化以用作出血性疾病(如,血友病)的治疗中的促凝剂(治疗、预防、旁路或协同)。本文所述的对于PCI和 α_1 AT两者的修饰示出为这样的原理的证据,即这些蛋白中小的改变可以用于产生特异性的APC抑制剂。

[0243] PCI首先被描述为APC的生理学抑制剂,并因此用作这些研究的起点(Suzuki et al,1983;1984)。然而,PCI是混杂的并且还抑制凝血酶、凝血酶:TM、fXIIa、fXa和TF:fVIIa(Elisen et al,1998;Mosnier et al,2001;Suzuki et al,1984;Fortenberry et al,2011;Meijers et al,1988)。因此,PCI可以用作促凝血剂和抗凝血剂两者。PCI的活性通过与糖胺聚糖,如肝素和硫酸乙酰肝素的结合进行调节(Pratt&Church,1992;Pratt et al,1992;Li&Huntington,2008)。有关PCI在凝血级联中作用的概述,参见图1。

[0244] α_1 AT是嗜中性白细胞弹性酶的天然抑制剂(Kalsheker,1989)。不同于凝血级联中,在P1具有Arg或Leu中任一个的其它丝氨酸蛋白酶抑制剂, α_1 AT相反具有Met。这使其成为凝血蛋白酶的非常差的抑制剂。尽管如此,由于血浆中 α_1 AT的高浓度,认为 α_1 AT在生理学程度上显著抑制APC(Heeb&Griffin,1988)。P1残基的诱变发生表明在P1处Arg或Leu的使用显著改善了 α_1 AT对凝血蛋白酶的抑制(Heeb et al,1990)。通过导致重度出血性疾病的 α_1 AT的Pittsburgh(M358R(P1R);Pitts)变体,举例说明了这种情况(Owen et al,1983)。

[0245] 为了开发相对于促凝蛋白酶对APC抑制特异的丝氨酸蛋白酶抑制剂,将PCI和 α_1 AT

Pittsburgh(P1R, α_1 AT Pitts)用作模板丝氨酸蛋白酶抑制剂骨架(scaffold)。本研究中使用的所有蛋白使用pETSUM0表达载体(invitrogen)从大肠杆菌(*Escherichia coli*)培养物(Rosetta2(DE3)pLysS,novagen)表达,并使用Ni-色谱法、阴离子交换色谱法的组合并且就PCI来说,使用肝素亲和色谱法进行纯化。随后,通过SUM0蛋白酶裂解除去SUM0-标签,并且对于 α_1 AT Pittsburgh(Pitts,P1R)通过串联的Ni-阴离子交换色谱法和对于PCI通过串联的阴离子交换-肝素色谱法除去标签。PCI构建体(construct)是N-末端截短的,起始于Ala22(A22,根据成熟蛋白质序列编号,从前肽起始)。 α_1 AT Pitts(P1R)构建体是全长的(FL)并且具有另外的C232S突变,从而在表达和纯化期间消除分子间的二硫键形成及其它修饰(Yamasaki et al,2011)。由于所使用的表达载体, α_1 AT Pitts构建体具有Ser(S)而不是Glu(E)作为其第1个残基。预期C232S和E1S突变不改变 α_1 AT的活性。

[0246] 将Lys残基在不同位置引入到PCI和 α_1 AT Pittsburgh的RCL中,并测试获得的突变体对凝血酶和APC的抑制。在本研究初期,抑制剂并未筛选或测试到它们对其它凝血蛋白酶的抑制,前提是一旦消除凝血酶抑制而有利于APC抑制,如果它对其它凝血蛋白酶具有显著的残留的抑制活性,则可以潜在地另外修饰抑制剂。根据Schechter-Berger对于丝氨酸蛋白酶抑制剂的术语表(Schechter&Berger,1967)对RCL残基编号。

[0247] 相对于蛋白酶,使用过量的丝氨酸蛋白酶抑制剂,在假一级条件(准一级条件,pseudo-first condition)下测量凝血酶和APC抑制的速率常数(表1)。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶一起培育不同时间长度,并且通过对蛋白酶加入过量发色底物(对于凝血酶,S2238,并且对于APC,S2366)确定残余活性。然后,通过追踪405nm的吸光度来测量残余蛋白酶活性。残余蛋白酶活性随时间的曲线提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(slope)(使用线性回归模型拟合)。示出了斜率的标准偏差。

[0248] 对于表1所示的所有变体,在P2和P1'引入的赖氨酸突变可以有效地提高提高PCI和 α_1 AT相对于凝血酶对APC的特异性。通常,在所有情况下,大大降低了凝血酶抑制。对于所有突变体,APC抑制也降低,但几乎不能达到相同的程度。两种丝氨酸蛋白酶抑制剂初始对凝血酶的抑制比对APC更好。这对所测试的所有突变体相反。

[0249] 不同于 α_1 AT,PCI结合肝素并且这种结合显著增加了其对凝血酶和APC的抑制(Pratt&Church,1992)。因此,我们测试了在肝素存在的情况下P1'K和P2KP1'K PCI突变体对凝血酶和APC的抑制以观察表1中所示的特异性的交换是否将持续。相对于蛋白酶,使用过量的PCI在假一级条件下测量速率常数。在实验之前,将PCI与等摩尔浓度的未分级肝素预培育30min。将PCI:肝素和蛋白酶一起培育不同的时间长度,并且通过对于与聚凝胺混合以结合肝素的蛋白酶加入过量发色底物来确定某些时间点之后的残余活性。残余蛋白酶活性随时间的曲线提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(使用线性回归模型拟合)。示出了斜率的标准偏差。P2KP1'K PCI对凝血酶抑制的计算值是来自残余凝血酶活性相对于时间的图的起始斜率的估计值,这是因为该图表明未实现完全抑制。这可能是由于底物途径或复合物分离。表2示出了二级速率常数。就不存在肝素的情况下的抑制来说,不同于WT蛋白,PCI的P1'K和P2KP1'K突变体相对于凝血酶,对APC是特异的(表2)。

[0250] 这些实验表明在存在和不存在辅因子的情况下,在丝氨酸蛋白酶抑制剂RCL中仅

引入一个或两个修饰足以消除或大大降低凝血酶的抑制。尽管降低了APC抑制,但其仍显著,特别是对于在存在肝素的情况下, α_1 AT的变体和PCI变体来说。然而,PCI和 α_1 AT Pitts的特异性不限于凝血酶和APC。这两种丝氨酸蛋白酶抑制剂还抑制另一种促凝蛋白酶fXa。为了不抑制凝血,我们的变体还需要相对于fXa对APC特异。因此,我们还确定了PCI和 α_1 AT以及它们的变体对fXa的抑制速率常数(表3)。相对于蛋白酶,使用过量的丝氨酸蛋白酶抑制剂在假一级条件下测量速率常数。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶一起培育不同时间长度,并且通过对蛋白酶加入过量发色底物(S2222)来确定残余活性。残余蛋白酶活性随时间的图提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(使用线性回归模型拟合)。示出了斜率的标准偏差(表3)。

[0251] 如先前对凝血酶所发现的,WT PCI对fXa的抑制比对APC更好。 α_1 AT Pitts对APC的抑制比对fXa更好,但是fXa的抑制仍显著。对于P1' K PCI、P2K α_1 AT Pitts和P1' K α_1 AT Pitts,fXa的抑制仍显著(表3)。与fXa相比, α_1 AT Pitts和PCI的P2KP1' K变体两者均对APC高度特异,其缺少fXa抑制或fXa抑制可忽略,并因此认为它们是先导候选(lead candidate)。PCI的P1' K变体引起关注,这是因为在不存在肝素的情况下,它对fXa的抑制非常缓慢。肝素的存在显著加快了APC抑制速率,其可以潜在地使特异性比值倾斜以有利于APC。

[0252] 将首先讨论PCI先导化合物(lead compound),然后讨论 α_1 AT先导化合物。

[0253] 为了研究A22 P2KP1' K PCI在更复杂的血浆系统中的性质并排除对促凝蛋白酶的任何不利影响,实施凝血酶原时间试验(PT)。该试验测量了在通过外源途径引起凝血后直至血浆中凝块形成的时间。A22 WT PCI表现出凝血时间小幅增加,而P2KP1' K表现出更小的提高,这与对促凝蛋白酶的抑制活性降低一致(图2)。

[0254] 另外,我们想排除PCI突变体对凝血的接触激活途径的任何影响。为了达到该目的,对fXIa的抑制测量了抑制速率常数,并进行了aPTT试验。该试验类似于PT试验,除了它测量由内源途径引起的凝血。

[0255] 相对于蛋白酶,使用过量的丝氨酸蛋白酶抑制剂在假一级条件下测量PCI和P2KP1' K变体对fXIa的抑制的抑制二级速率常数。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶一起培育不同时间长度,并且通过对蛋白酶加入过量发色底物(S2366)来确定残余活性。残余蛋白酶活性随时间的图提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(使用线性回归模型拟合)。给出了斜率的标准偏差。在实验过程中,A22 P2KP1' K PCI的fXIa抑制未完成,这可能是由于蛋白酶对丝氨酸蛋白酶抑制剂的裂解造成的。与WT相比,P2KP1' K突变体表现出对fXIa的抑制降低较大并且对APC的特异性比对fXIa更大(表4)。

[0256] aPTT试验表明WT PCI是接触激活途径的有效抑制剂,这可能是由于fXIa或fXIIa的抑制造成的(图3)。P2KP1' K突变体在aPTT中表现出小幅提高。然而,由于接触激活途径主要通过fIXa激活来激活凝血,因此在血友病患者中很小程度的接触激活抑制很可能是无意义的,这是因为它们在接触激活(fIX)的主要靶标或其辅因子(fVIII)中是缺乏的。

[0257] 因此,到目前为止本文所示结果表明对于开发用于血友病治疗的旁路剂,A22 P1' K PCI和A22 P2KP1' K PCI两者是有希望的APC-特异性先导化合物。

[0258] 为了产生相对于凝血酶,对APC特异的其它PCI突变体,对PCI骨架使用了靶向随机

诱变策略。靶标残基为P4、P2和P1'。随机方法基于通过在96-孔形式中PCI表达之后,测试细菌裂解液的抑制活性来对APC抑制和抵抗凝血酶抑制进行选择。

[0259] 使用理性诱变产生的最特异的PCI突变体A22 P2KP1' K PCI并结合测试以上列出的对于特异性的测试标定试验。将WT PCI用作另外的对照。通过将细菌裂解液培育一段时间,使得A22 WT PCI表现出完全抑制和从该时间点延长的潜伏期以便再次对轻微抑制进行选择来实现对凝血酶抑制的阴性选择。校准APC抑制的阳性选择,从而WT和P2KP1' K PCI两者属于APC抑制活性的中间范围,这样我们将能够确定抑制的提高以及降低。

[0260] 在初始试验中,对凝血酶和APC抑制活性筛选了88个变体。使培养物在96-孔板中生长、诱导并且表达蛋白。通过加入裂解缓冲液使细胞裂解,并且通过将裂解液与蛋白酶培育1h(凝血酶)和30min(APC)测试裂解液对凝血酶和APC的抑制活性。然后,通过将发色底物加入到蛋白酶中读取残余蛋白酶活性。将A22 WT PCI和A22 P2KP1' K PCI用作对照。将与P2KP1' K PCI相比具有更高或相等的残余凝血酶活性和较低或相等的残余APC活性的任何裂解液认为是有希望的APC-特异性候选。这些序列如表7所示。以粗体示出了P4、P2和P1'位置。

[0261] 以初步方式表征来自该组实验的具有最大的APC抑制活性的突变体(D8; P4QP2RP1' N),并且其表现出相比凝血酶,对APC的更特异性的抑制,尽管使用了不同于P2KP1' K(表5)的突变。这表明将有可能在丝氨酸蛋白酶抑制剂RCL中做出其它突变,它将具有与已描述的突变等价的作用。

[0262] 为了产生更大的数据组,在阳性和阴性选择试验两者中筛选了另外460个突变体。使培养物在5个96-孔板中生长、诱导并表达蛋白。通过加入裂解缓冲液使细胞裂解,并且通过将裂解液与蛋白酶培育1h(凝血酶)和30min(APC)测试裂解液对凝血酶和APC的抑制活性。然后,通过向蛋白酶中加入发色底物(凝血酶,S2238;APC,S2366)来读取残留蛋白酶活性。将A22 WT PCI和A22 P2KP1' K PCI用作对照。将与P2KP1' K PCI相比具有更高或相等的残留凝血酶活性和较低或相等的残留APC活性的任何裂解液认为是有希望的APC-特异性候选。根据该数据组,挑选集落并对与P2KP1' K相比表现出更好的APC抑制和较低或相等的凝血酶抑制的丝氨酸蛋白酶抑制剂进行测序,并且在相同测试中对这些再次测试(retest)(重复3次)以验证这些的确是真正的命中物而不是假阳性。从该再次测试中,从初始筛选中存在的17个突变体中筛选出一组15个突变体,并确定它们对APC的抑制比P2KP1' K更好或相等,并且对凝血酶的抑制较差或相等(表8)。表8中表现出了再次测试后为阳性的变体序列。有趣地,随机诱变确认了P2和P1'位置中带正电荷的残基的有益作用。然而,还发现了替代的RCL组成。

[0263] 相对于蛋白酶,使用过量的丝氨酸蛋白酶抑制剂在假一级条件下测量随机诱变的PCI变体对凝血酶和APC抑制的二级速率常数。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶一起培育不同的时间长度,并且通过对蛋白酶加入过量发色底物来确定残留活性。残留的蛋白酶活性随时间的图提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(使用线性回归模型拟合)。示出了WT和P2KP1' K用于比较。表5示出了速率常数。示出的误差为斜率的标准偏差。

[0264] 由随机诱变发生试验中所选的突变体中的一些初步表征表明所选突变体至少与P2KP1' K PCI是功能等价的,并且一些具有轻微改善的APC抑制速率(表5)。这些实验强烈表

明P2KP1' K不是可以用于产生APC-特异性丝氨酸蛋白酶抑制剂的仅有的成分。

[0265] 基于来自表1和表3中所示的速率常数的 α_1 AT Pitts的主要先导化合物为FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K。表现出该突变体不抑制凝血酶并仅缓慢抑制fXa,但保留了APC抑制(表1和表3)。

[0266] 为了研究该突变体在更复杂的血浆系统中的性质并排除对促凝蛋白酶的任何不利影响,实施了凝血酶原时间试验(PT)。该试验测量了在通过外源途径引起凝血后直至凝块形成的时间。如所期望的,抗凝血剂 α_1 AT Pitts表现出凝血时间增加,这是由于凝血酶和fXa的抑制造成的(图4)。相反, α_1 AT Pitts的P2KP1' K突变体表现出凝血时间未增加,并因此在该试验中不干扰正常凝血。

[0267] 到目前为止,数据表明在外源(组织因子)途径或者常见凝血途径中, α_1 AT Pitts的P2KP1' K突变体不干扰促凝蛋白酶。另外,我们想要确定FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K是否影响内源(接触激活)途径。相对于蛋白酶,使用过量的丝氨酸蛋白酶抑制剂在假一级条件下测量FL α_1 AT Pitts C232S和P2KP1' K变体对fXIa抑制的二级速率常数。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶一起培育不同时间长度,并且通过对蛋白酶加入过量发色底物(S2366)来确定残留活性。残留蛋白酶活性随时间的图提供了表观速率常数 k_{obs} 。二级速率常数 k_2 是 k_{obs} 相对于丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度的图的斜率(使用线性回归模型拟合)。给出了斜率的标准偏差。

[0268] 在接触激活途径期间激活fXI,并且通过激活fIX进入常见的凝血途径。另外,一旦由凝血酶起始凝血,则fXI激活。FL α_1 AT Pitts C232S显著抑制fXIa,然而,这种抑制对FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K大大降低(表6)。

[0269] 由于检测到 α_1 AT Pitts的P2KP1' K突变体对fXIa的抑制程度低,并且为了确定对fXIIa的任何可能的不利影响,我们还进行了aPTT试验。该试验类似于PT试验,除了它测量由凝血的内源途径引起的凝血。因此,aPTT可以用于检测对fXIa和凝血的接触激活途径的任何不利影响。在该试验中,除了与 $0.67\mu\text{M}$ 丝氨酸蛋白酶抑制剂的一个反应凝固之外,在试验时间内与FL α_1 AT Pitts C232S一起孵育的血浆不凝(图5A)。FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K表现出凝血时间小幅增加,但是不存在剂量依赖性增加(图5B)。这表明FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的fXIa抑制活性可能过缓从而不能显著影响接触激活途径。另外,接触激活途径通过激活fIXa来激活凝血级联。由于血友病患者缺乏fIX或其必需的辅因子fVIII中的任一种,因此血友病患者中接触激活途径的小幅的抑制作用可能是最小的。

[0270] 为研究血浆系统中 α_1 AT Pitts的P2KP1' K突变体是否能够抑制APC,我们使用了改进的凝血酶产生试验(TGA)。在存在和不存在重组可溶性凝血调节蛋白(TM)的情况下,在人汇集的(human pooled)正常血浆(NP)中测量凝血酶产生。从HEK-EBNA表达系统中表达和纯化该TM,并且其包含了可溶性胞外区。TM通常不存在于TGA中,这是因为在生理学上,它是存在于内皮膜上并且很大程度上缺少血浆的跨膜蛋白。因此,在正常的TGA或使用血浆的其它凝血试验(如PT和aPTT试验)中,没有PC途径激活。向试验中加入TM使得能够PC激活并借此可能提供更真实的凝血酶体内产生情况。在来自George King Biomedical的汇集的正常人血浆(NP)中进行图6A-图6D和图7A-图7D中所示的试验。通过加入 CaCl_2 和TF/磷脂(RB低TF和磷脂试剂,Technoclone)以通过外源途径激活凝血引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过使用Technothrombin标定试剂盒(Technoclone)

将荧光单位对已知的凝血酶浓度进行标定,将荧光单位转化为凝血酶浓度。

[0271] 向汇集的正常血浆中加入TM以浓度依赖性方式降低了凝血酶产生。根据该实验,我们选择了两种TM浓度来将凝血酶产生下调至中等水平(1.25nM TM最终试验浓度)或低水平(10nM TM最终试验浓度)。在连续试验中使用这些浓度以评价FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K在血浆中抑制APC的能力。

[0272] 向正常人血浆(NP)中以所有使用的浓度加入的FL α_1 AT Pitts C232S降低了凝血酶的产生,这可能是由于凝血酶以及fXa的抑制所造成的(图6A-图6D)。相反,在不存在TM的情况下,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K对NP无影响(图7A)。然而,在存在TM的情况下,FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1' K剂量依赖性地恢复(挽救, rescue)凝血酶产生(图7B-图7D)。该作用是FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K对APC的特异性抑制的结果。

[0273] 为了在fVIII-或fIX-缺乏的血浆中进行相同的实验,必需提高用于起始试验的组织因子(TF)的量,这是因为在基线条件(仅RB引发),在因子缺乏的血浆中无可检测的凝血酶产生。为了证明TF增加对凝血酶产生的影响,除了添加在基线条件用于引发试验的RB试剂外,反应添加了不同稀释的TF试剂(Dade Innovin, Siemens)。生产商未公开Innovin试剂中TF的浓度,然而先前测量已表现出它为约7.36nM(Duckers et al, 2010)。在人NP、fVIII-缺乏(HA)和fIX-缺乏(HB)的血浆中,提高TF引发物(trigger)缩短了滞后时间(lag-time)并且增加了峰值凝血酶和内源性凝血酶能力(ETP)两者。根据这些实验,我们在最终反应中选择1:4000的Innovin稀释以引发凝血酶产生。由于需要向试验中加入磷脂,因此加入了含有磷脂和TF两者的RB试剂。

[0274] 由于因子-缺乏的血浆的使用要求修改试验参数,因此通过加入1:4,000的Innovin,在人HA血浆中对人正常汇集的血浆重复TM滴定实验。在来自George King Biomedical的人fVIII-缺乏血浆(小于1%的fVIII活性)中进行试验。通过加入CaCl₂和/或TF/磷脂(RB低TF和/或磷脂试剂, Technoclone)以及1:4,000最终稀释的Dade Innovin (Siemens)以通过外源途径激活凝血引发凝血。通过荧光底物(Z-Gly-Gly-Arg-AMC)的裂解来测量凝血酶产生。通过针对已知的凝血酶浓度校准荧光单位,使用Technothrombin标定参考试剂盒(Technoclone)将荧光单位转化为凝血酶浓度。在fVIII-缺乏的血浆(HA)的凝血酶产生试验(TGA)中,发现凝血调节蛋白(TM)降低凝血酶产生。

[0275] 根据该实验,选择1.25nM和5nM用于后续实验。所使用的高TM浓度低于用于NP的浓度,这主要是因为所使用的试验条件中在HA血浆中的总凝血酶产生较低。

[0276] FL α_1 AT Pitts C232S和FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K对HA和HB血浆的影响与汇集的NP的结果相当。在HA(fVIII-缺乏)和HB血浆(fIX-缺乏)两者中,在存在和不存在TM的情况下,FL α_1 AT Pitts抑制凝血酶产生(图8)。在fVIII-和fIX-缺乏的血浆中,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K可以挽回TM对凝血酶产生的影响,并且在不存在TM的情况下,没有影响(图9A-图9D和图10A-图10D)。这表明在因子-缺乏的血浆中,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K可以抑制APC并且具有促凝影响。这表示它可以潜在地促进凝块形成并降低血友病患者中的出血。将通过蛋白C系统对体内凝血酶产生减少的相对贡献来确定这种促凝影响的幅度。本文所示的体外实验不可以用于预测这种突变体的可能体内效力,然而它们的确表现出在复杂的血浆系统中,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K可以抑制APC并且不防碍促凝途径,并且这些影响与fIX和fVIII的存在与否无关。

[0277] 为了验证我们的体外数据,我们想要使用血友病的体内小鼠模型。然而,为了验证人 α_1 AT对小鼠血浆的影响与人血浆中所见的影响相当,我们首先在小鼠血浆中进行了TGA。这是使用修改的TGA方案进行的(Bunce et al,2011;Ivanciu et al,2011)。这些修改是必需的,这是由于小鼠血浆中抑制性蛋白质浓度的提高妨碍了标准条件下的TGA试验(Tchaikovski et al,2007;Bunce et al,2011;Ivanciu et al,2011)。与人系统相当,在试验的基线条件下,在HB小鼠血浆中没有凝血酶产生。因此,我们进行了以不同的Innovin浓度升高的滴定。选择1:12,000的Innovin浓度用于后续试验。

[0278] 由于无鼠科TM可用,因此我们使用了在人血浆TGA中所使用的可溶性人TM以促进小鼠TGA试验中APC的形成。观察人TM在HB小鼠血浆中的任何影响所需的浓度比人血浆中观察到的高约100倍。这可以由以下观察结果解释:人TM进入小鼠表现出降低的激活鼠PC的能力(Raife et al,2011)。这表明对于促进鼠PC激活,人TM不如鼠TM有效。在后续实验中使用了750nM的人TM浓度。

[0279] 然后,加入不同浓度的FL α_1 AT Pitts C232S和FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K以确定在TM存在和不存在的两种情况下小鼠HB血浆中的条件,从而比较小鼠血浆中这些突变体的影响与人血浆中先前的TGA结果。

[0280] 如人血浆所示,在不存在TM的情况下,FL α_1 AT Pitts C232S降低了小鼠HB血浆中凝血酶的产生(图11A)。然而,在存在TM的情况下,在最低的 α_1 AT浓度,存在凝血酶产生的部分恢复(图11B)。这可能潜在地是由于与在人中所见的速率相比,FL α_1 AT Pitts对鼠凝血酶和鼠APC的抑制的相对速率的差异所造成的,从而在凝血酶抑制之前抑制了产生的APC。当FL α_1 AT Pitts C232S的浓度提高至所有APC都被抑制的水平时,凝血酶也受到抑制。这可以解释图11B中所示的结果,但是并未进一步研究。如人血浆中一样,FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K恢复了通过HB小鼠血浆中TM的加入导致的凝血酶产生的下调(图11D)。然而,当在不存在TM的情况下将FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K加入到HB小鼠血浆中时,还观察到了凝血酶产生的提高(图11C)。有可能的是这种影响与用于这些实验的血液采集方法有关。为了采集血浆,将尾部横切并将血液采集到柠檬酸盐中。然后,将其旋转沉淀并移出血浆并冷冻。对血液采集施加的损伤导致凝血系统的激活并可能导致在实验之前在血浆中产生APC。另外,小鼠在其血浆中不具有PCI(Zechmeister-Machhart et al,1996),这可能增加了APC的循环半衰期,从而在TGA试验前它不失活。目前不能排除的替代解释是小鼠血浆中的脱靶(off-target)促凝作用。然而,由于在人血浆中未观察到这种影响,因此这包括小鼠特异性抗凝血蛋白酶的抑制。

[0281] 为了研究FL α_1 AT Pitts C232SP2KP1'K的潜在的体内影响并确定其是否可以潜在地用作血友病的预防剂或治疗,我们使用了两种体内小鼠试验:尾部剪裁模型和提睾肌微动脉激光损伤模型。所使用的小鼠为雄性,在BALB/c背景中的fIX敲除的小鼠(Lin et al,1997;Ivanciu et al,2011)。

[0282] 在尾部剪裁试验中,通过尾静脉注射蛋白或缓冲液,并且在5min孵育期之后,将尾部以3mm的直径横切并置于37℃水浴中的14ml 37℃盐溶液中。采集血液10min并通过在575nm测量吸光度来测量红血球溶胞之后的总血红蛋白,从而定量所导致的失血(Ivanciu et al,2011)。通过制作标准曲线来计算体积失血,其中以与尾部剪裁样品类似的方式处理通过尾部横切采集的已知体积的血液。在红血球溶胞后,确定575nm的吸光值,并对体积失

血作图以产生标准曲线。尾部剪裁试验表现出FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的有效的促凝作用(图12)。以15mg/kg的剂量,HB小鼠的失血恢复至注射PBS的WT小鼠的水平(图12)。较低剂量的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K还表现出相对于HB小鼠出血减少的趋势,尽管这不是统计学显著的。FL α_1 AT Pitts C232S表明在7.5mg/kg,对失血无显著影响。

[0283] 用于评价促凝剂的另一体内模型是活体提睾肌微动脉激光致损伤模型(Falati et al, 2002)。在该系统中,将插管插入小鼠颈静脉以使得能够注入治疗性蛋白以及针对纤维蛋白和血小板的荧光标记的抗体。然后,将睾外提肌展开用于成像。对激光致小动脉损伤之后的凝块形成成像,并使用荧光显微定量。

[0284] 对于整体定性评价,将损伤分为三类:无凝块(未检测到荧光),血小板凝块(仅血小板可见,这些凝块通常不稳定并且在成像过程中溶解)和血小板+纤维蛋白(血小板和纤维蛋白荧光两者均可见并且凝块在成像过程中保持稳定)。这表明随着FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K的浓度提高,在稳定的血小板和纤维蛋白凝块形成中存在剂量依赖性增加(图13)。对所有图像定量血小板和纤维蛋白荧光。计算每个时间点的中值并在图14中对结果作图。不考虑这些数据对图13分配的种类,这些数据包括来自所有图像的定量。中值图表明对照或FL α_1 AT Pitts C232S注入的小鼠并未表现出凝块形成,而高和低剂量的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K在损伤位点均表现出血小板凝聚和纤维蛋白沉积。就血小板凝聚而言,两剂量间无检测到的差异。对于纤维蛋白,FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K存在纤维蛋白沉积的剂量依赖性增加,而对于对照或FL α_1 AT Pitts C232S注入小鼠,则无纤维蛋白(图14)。

[0285] 总的来说,这些结果表明FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K在血友病的体外试验和体内模型中具有促凝作用。体内实验均在血友病B小鼠模型中进行,然而,在人血浆中的TGA结果(图9A-图9D和图10A-图10D)以及所提议的FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K作用机制表明FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K促凝作用应独立于fIX或fVIII缺乏和因此可以用于血友病A和血友病B。体内观察到的促凝作用足以将出血降低至对WT小鼠所见的相同水平(图12),这表明抑制APC的丝氨酸蛋白酶抑制剂可以用于治疗出血性疾病,并且不仅作为现有治疗的预防剂或佐剂。

[0286] 还对 α_1 AT骨架使用了靶向随机诱变策略以研究 α_1 AT骨架上可能的其它APC特异性突变体。

[0287] 在FL α_1 AT Pitts C232S背景下产生了三种单独的 α_1 AT变体文库:一个在P2处随机化,一个在P1'处随机化并且第三个文库在P2和P1'处随机化。将获得的质粒文库转化至Rosetta2(DE3) pLysS表达株并在96孔板中表达蛋白。将细菌裂解,并试验裂解液的凝血酶和APC抑制

[0288] 对于单变体文库,每个文库试验88个集落。对于双(P2P1')变体文库,试验460个集落。在所有试验板上作为参考表达FL α_1 AT Pitts和FL α_1 AT Pitts P2KP1' K(先导APC特异性变体)。与P2KP1' K α_1 AT相比,将具有较高或相等的APC抑制活性(较低或相等的残留APC活性)和较低或相等的凝血酶抑制活性(较高或相等的残留凝血酶活性)的变体视为相对于凝血酶对APC特异的变体的候选。挑选候选变体的亚组并在相同装置中再次试验以验证第一次筛选的结果。然后,对在两次试验中表现出类似特性的突变体进行测序。表9示出了获得的序列。为了验证该试验挑选变体的能力,在大肠杆菌(E.coli)中大规模表达并纯化了表9

中鉴别的相对于凝血酶对APC特异的9个变体。然后,对每个突变体确定相对于凝血酶和APC的抑制二级速率常数。结果如表10所示。这些结果确认不同于FL α_1 AT Pitts C232S变体,所有测试变体对APC的特异性比对凝血酶更高。

[0289] 在 α_1 AT Pitts骨架中,在P2和P1'位置,某些类型的残基是有利的(表9)。主要通过P2和P1'处存在的大的极性残基(Q、N、Y)、大的疏水性残基(W)或带正电荷的残基(R、H、K)来赋予特异性。在这些位置观察到的其它残基包括C、A、T、S和V。在双变体文库中,这些中等至小的残基在其他位置伴有补充的大的带正电荷的残基(R、K)或者大的极性残基(Y、N、Q),其可能对特异性交换(specificity swap)具有更大影响。然而,也可能存在这些突变的协同作用,特别是当P1'为R时。P1' R表现出在单变体文库筛选中的不同结果,并且可能具有一些残留凝血酶抑制活性。已知P2 P对底物的凝血酶裂解是重要的(Gallwitz et al, 2012)。简单除去与P1'处特异性交换突变相连的该残基的可以足以产生具有很少残留凝血酶抑制活性的APC特异性抑制剂。特别地,P2处的T可能对其自身具有一些影响,这是因为在P1'处其伴侣残基(partnering residue)中(Q、N、Y、R),在单个残基P1'变体文库中仅鉴别出R自身足以导致特异性交换。

[0290] 有趣地,在 α_1 AT Pitts对照周围聚集的非特异性突变体示出为主要是 α_1 AT Pitts。所有均保留了P2 P,这表明P2 P在维持凝血酶抑制活性中的重要性。P1'是更可变的,这与P1'变体文库中的突变体分布一致。与P2和P1'文库中变体的分布相比,凝血酶似乎对P1'比对P2突变更耐受。然而,在双变体文库中有利的残基的出现(在单变体文库中不存在)表明这些残基对特异性的影响可以是协同的并且双突变可以比单突变在提高特异性方面更有效。

[0291] 以上提供的随机诱变结果表明除了已鉴别的赖氨酸突变体之外,有可能产生相对于凝血酶,对APC表现出特异性的突变体。到目前为止,使用了随机诱变测量,假定一旦获得了优于凝血酶的特异性,则这些突变体还将表现出相对于其它促凝蛋白酶,对APC的一定程度的特异性。为了测试该假设,测试了表10中随机突变的PT和aPTT。表11示出了这些结果。不同于先前对FL α_1 AT Pitts C232S所示,所述突变体对PT均无显著影响(图4)。这表明:突变体基本上丧失了它们对促凝蛋白酶的抑制活性。然而,aPTT对抑制剂的存在更敏感。因此,aPTT的测量可以为较小的残留抑制提供更准确的说明。先前的实验(图5A-图5B)表明FL α_1 AT Pitts C232S使得aPTT试验中的血浆不可凝。相反,本文评价的突变体中仅有1个表现出这种作用(P2TP1' N)。一些突变体,如P2KP1' H和P2KP1' N仅表现出相对短的aPTT延长,并因此是潜在关注的。

[0292] 根据这些结果,我们选择了四个突变体:P2R、P2QP1' K、P2KP1' H和P2KP1' N(均在Pitts, P1R背景下)。这些表现出相对于凝血酶,对APC的高抑制(表10),并且对于一些还表现出低aPTT延长(P2KP1' H和P2KP1' N)。由于它们不延长PT,因此它们不可能抑制TF:fVIIa。aPTT延长的最可能的候选将是fXIa或fXa的抑制。在这些中,fXa抑制将最大程度抑制凝血初期,并因此认为是对于成功的抑制剂的更显著的障碍。因此,如上所述确定了这4个突变体对fXa抑制的抑制常数(表12)。P2R表现出显著的fXa抑制,这可能是其aPTT延长的原因。其他三个突变体表现出较低的fXa抑制,但是这些突变体中无一与先前鉴别的P2KP1' K突变体一样特异。尽管如此,由于P2KP1' N、P2QP1' K和P2KP1' H相对于凝血酶和fXa,对APC表现出特异性,因此P2KP1' N、P2QP1' K和P2KP1' H代表了用于进一步开发的其它有希望的候选。另

外,相对于先前所述的P2KP1' K突变体,它们对APC的抑制增加了约2倍。这种更快速的抑制可能部分补偿稍微降低的特异性。

[0293] 然而,这些结果表明相对于凝血酶,对APC特异性的选择不完全足以设计这样的抑制剂,其相对于fXa及其它促凝蛋白酶也表现出对APC特异性。因此,进一步延伸了随机诱变策略。对fXa再次筛选了突变体(因为相对于凝血酶,对APC的特异性先前已经选择的突变体)并且所选突变体具有降低的fXa抑制,同时维持低凝血酶抑制和APC抑制。

[0294] 从该另外的筛选中鉴别了另外4个突变体。这些均具有P1R突变,并且另外具有P2RP1' A、P2RP1' Q、P2WP1' I或P2WP1' H。为了验证这些突变体的特异性,仅使用1个丝氨酸蛋白酶抑制剂浓度并测试其凝血酶和fXa抑制来进行初始实验。由于基于突变体的低凝血酶和fXa抑制选择突变体,因此在该阶段不考虑APC抑制。将丝氨酸蛋白酶抑制剂和蛋白酶孵育不同时间,并且在指明的时间点,通过加入过量发色底物终止反应。将残留蛋白酶活性除以初始蛋白酶活性并将该值的自然对数对时间作图(图15)。将该线的斜率除以丝氨酸蛋白酶抑制剂的浓度,从而给出了抑制的二级速率常数的估计值。这些试验表明尽管所有突变体几乎不抑制凝血酶,其中最快速的抑制剂P2WP1' H具有约 $50.3\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 的二级速率常数(与FL α_1 AT Pitts C232S的抑制常数 $2.928\times 10^5\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 相比)。然而,P2RP1' A、P2WP1' I和P2WP1' H表现出显著的fXa抑制。与FL α_1 AT Pitts C232S(相比于FL α_1 AT Pitts C232S的 $4.13\times 10^4\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,P2RP1' A为 $4,070.1\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)相比,对于这些突变体,二级速率常数仅降低约10倍。然而,P2RP1' A、P2WP1' I和P2WP1' H彼此之间表现出类似的fXa抑制。

[0295] 仅1个突变体对凝血酶和fXa两者表现出显著的选择性。除Pitts (P1R) 突变之外,该突变体具有P2RP1' Q。由于其选择性,它对于更深入的研究是有趣的。先前的随机和合理的诱变研究结果表明R和K残基相当类似地发挥作用。由于根据本文所示结果预期具有类似性质,因此在P1R背景下,我们因此还产生了P2KP1' Q突变体。表13示出了两个突变体的抑制常数和aPTT(如前所述进行实验)测量结果。示出P2KP1' K突变体用于比较。P2KP1' Q和P2RP1' Q两者均表现出极低的凝血酶和fXa抑制。另外,对aPTT几乎也没有任何影响。APC抑制是显著的,与P2KP1' K相比仅稍微降低。因此,这两种突变体将预期与P2KP1' K类似地发挥作用并可以作为其它潜在有希望的替代分子用于进一步开发。

[0296] 我们评价了FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K对鼠凝血酶和APC的抑制。凝血酶和APC获得自重组来源。相对于血浆形式,所使用的蛋白酶是截短的,对于APC其仅包含EGF2-蛋白酶域(无Gla结构域APC),并且对于凝血酶其仅包含蛋白酶结构域。因此,我们还测试了这些蛋白酶的人的形式以确保任何差异是由于种间差异,而不是构建体差异所造成的。通过SDS-PAGE,人和鼠凝血酶表现出与FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1' K之间无或极低的反应性,表明在该方面,模型系统的结果将与人系统相关。与人血浆APC的 $(14.88\pm 1.87)\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 相比,对于人的无Gla结构域(Gla-domainless)APC,抑制的二级速率常数为 $(8.14\pm 0.58)\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,对于鼠Gla-domainless APC为 $(3.80\pm 0.37)\times 10^3\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 。这些结果提供了以下指示:尽管小鼠模型中突变体的反应性将可能低于人中的反应性,即相同影响可能需要更高的相对剂量,但是就蛋白酶抑制来说,影响可能是类似的。

[0297] 所提供的数据表现为原理论证:丝氨酸蛋白酶抑制剂骨架仅使用个别突变就可以用于产生特异性APC抑制剂,这些抑制剂可以在体外和体内二者中具有促凝活性并且因此表现出作为促凝剂用于出血性疾病(如,血友病)的治疗和预防的希望。

[0298] 参考文献

- [0299] Berntorp E(2009)Haemophilia 15:3-10
- [0300] Bertina RM,et al(1994)Nature 369:64-67
- [0301] Bohn RL et al(2004)Haemophilia 10:63-68
- [0302] Bolton-Maggs PHB&Pasi KJ(2003)Lancet 361:1801-1809
- [0303] Brettler DB(1996)Baillieres Clin.Haema tol.9:319-329
- [0304] Brummel-Ziedins KE et al(2011)J.Thromb.Haemost.9:2262-2267
- [0305] Bunce MW et al(2011).Blood 117:290-298
- [0306] Butenas S et al(2006)J.Thromb.Haemost.4:2411-2416
- [0307] Carrell R et al(1985)Trends in Biochemical Sciences 10:20-24
- [0308] ChuansumritA et al(2000)Haemophilia 6:61-65
- [0309] De Nanteuil G et al(2006)J.Med.Chem.49:5047-5050
- [0310] Di Minno MND et al(2010)Haemophilia16:e190201
- [0311] DiMichele D(2007)J.Haematol.138:305-315
- [0312] Duckers C et al(2010)Blood 11.5:879-886
- [0313] Elisen MGLM et al(1998)Blood 91:1542-1547
- [0314] Escobar MA(2010)Haemophi.lia 16 Supp33:29-34
- [0315] Escobar M&Sallah S et al(2013)J.Thromb.Haemost.11,1449-1453.
- [0316] Falati S et al(2002)Nat.Med.8:1175-1181
- [0317] Fortenberry YM et al(2011)J.Thromb.Haemost.9:861-863
- [0318] Franchini M&Lippi G(2010)Thrombosis Research 125:119-123
- [0319] Fukudome K et al(1996)J.Biol.Chem.271:17491-17498
- [0320] Gallwitz et al(2012)PLoS ONE 7(2):e31756
- [0321] Gettins PGW(2002)Chem.Rev.102:4751-4803
- [0322] Gringeri A et al(2003)Blood 102:2358-2363
- [0323] Haya S et al(2007)Haemophilia 13 Suppl 5:52-60
- [0324] Heeb MJ&Griffin JH(1988)J.Biol.Chem.263:11613-11616
- [0325] Heeb MJ et al(1990)J.Biol.Chem.265:2365-2369
- [0326] Hopkins et al(1993)Biochemistry 32;7650-7657
- [0327] Hua B et al(2009)Haematologica 94:881-884
- [0328] Huntington JA et al(2000)Nature 407:923-926
- [0329] Irving et al(2000)Genome Res.10;1845-1864
- [0330] Ivanciu L et al(2011)Nat.Biotechnol.29:1028-1033
- [0331] Kalsheker N(1989)Biosci,Rep.9:129-138
- [0332] Laurell CB et al(1977)Clin Sci Mol Med 52:457-461
- [0333] Laurell M et al(1990)Blood 76:2290-2295
- [0334] Lee M et al(2006)Haemophilia 12Suppl 3:1-7
- [0335] Li W&Huntington JA(2008)J.Biol.Chem.283:36039-36045
- [0336] Li W et al(2008)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.105:4661-4666

- [0337] Lin HF et al(1997)Blood 90:3962-3966
- [0338] Lowe,G.D.&Ludlam,C.A. (2008)J.Thromb.Haemost.6,1982-1983.
- [0339] Lu D et al(1996)Blood 87:4708-4717
- [0340] Mannucci PM(2003)J.Thromb.Haemost.1:1349-1355
- [0341] Mannucci PM(2008)Haemophilia 14Suppl 3:10-18
- [0342] Mather T et al(1996)EMBO J 15:6822-6831
- [0343] Meijers JC et al 1988)Biochemistry 27:4231-4237
- [0344] Mosnier LO et al(2001)Thromb.Haemost.86:1057-1064
- [0345] Nagel K.et al(2011)Haemophilia,17,872-874.
- [0346] Negrier C et al(2006)Haemophilia 12 Suppl 6:48-52-discussion 52-3
- [0347] Owen MC et al(1983)N.Engl.J.Med.309:694-698
- [0348] Pratt CW&Church FC(1992)J.Biol.Chem.267:8789-8794
- [0349] Pratt CW et al(1992)J.Biol.Chem.267:8795-8801
- [0350] Raife TJ et al(2011)Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.31:2509-2517
- [0351] Schechter I et al(1967)Biochem Biophys Res Comm 27:157-162
- [0352] Stearns-Kurosawa DJ et al(1996)PNAs.U.S.A.93:10212-10216
- [0353] Suzuki K et al(1983)J.Biol.Chem.258:163-168
- [0354] Suzuki K et al(1984)Journal of Biochemistry 95:187-195
- [0355] Tagariello,G et al(2009)Blood,114,779-784.
- [0356] Tchaikovski SN et al(2007)J.Thromb.Haemost.5:2079-2086
- [0357] Teitel JM(1999)Haemophilia 5Suppl 3:43-49
- [0358] Teitel,JM&Sholzberg,M(2013)Blood Reviews27103-109
- [0359] Turecek PL,et al(2004)Haemophilia 10Suppl2:3-9
- [0360] Ullman M et al(2006)Haemophilia 12Suppl 6:74-9;discussion 79-80
- [0361] World Federation of Hemophilia(2011)2010WFH Global Survey Report
- [0362] Yamasaki M et al(2011)EMBO Rep.12:1011-1017
- [0363] Zechmeister-Machhart M et al(1996)Immunopharmacology 32:96-98

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	凝血酶	APC	APC/凝血酶抑制倍数
A22 WT PCI	28.21 ± 1.51	0.68 ± 0.032	0.02
A22 P1'K PCI	0.022 ± 0.0024	0.88 ± 0.074	40
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0.03^*$	0.28 ± 0.013	9.3
FL α_1 AT Pitts C232S	292.76 ± 17.60	108.16 ± 7.086	0.4
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	0.051 ± 0.0028	64.82 ± 7.14	1,271
FL α_1 AT Pitts C232S P1'K	0.17 ± 0.017	95.66 ± 13.70	563
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	4 h 后无抑制	15.14 ± 1.68	无凝血酶抑制

[0365] 表1

[0366]

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	凝血酶+肝素	APC+肝素	APC/凝血酶抑制倍数
A22 WT PCI	1310.32 ± 218.72	564.47 ± 71.29	0.4
A22 P1'K PCI	0.017 ± 0.0019	321.54 ± 31.94	18914
A22 P2KP1'K PCI	$0.11 \pm 0.040^*$	146.38 ± 18.85	1331.7

[0367] 表2

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)		
变体	fXa	APC/fXa 抑制倍数
A22 WT PCI	10.31 ± 0.73	0.07
A22 P1'K PCI	0.52 ± 0.079	1.7
A22 P2KP1'K PCI	无可检测的抑制	无 fXa 抑制
FL α_1 AT Pitts C232S	41.33 ± 2.36	2.6
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	3.93 ± 0.31	16.5
FL α_1 AT Pitts C232S P1'K	4.89 ± 0.16	19.6
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	0.12 ± 0.010	126.2

[0369] 表3

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	fXIa	APC	APC/fXIa 的抑制
A22 WT PCI	8.59 ± 0.43	0.68 ± 0.032	0.08
A22 P2KP1'K PCI	0.023 ± 0.0052	0.28 ± 0.013	12.2

[0371] 表4

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	凝血酶	APC	APC/凝血酶的抑制
A22 WT PCI	28.21 ± 1.51	0.68 ± 0.032	0.02
A22 P2KP1'K PCI	$\sim 0.03^*$	0.28 ± 0.013	9.3
A22 D8 PCI (P4QP2RP1'N)	0.084 ± 0.0016	1.00 ± 0.15	11.9
A22 4.H11 PCI (P4KP2RP1'H)	0.021 ± 0.0012	0.45 ± 0.15	21.4
A22 2.B10 PCI (P4SP2LP1'K)	0.016 ± 0.00090	0.43 ± 0.0086	26.9
A22 5.E12 PCI (P4HP2RP1'V)	0.023 ± 0.0021	0.26 ± 0.035	11.3

[0373] 表5

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	fXIa	APC	APC/fXIa 的抑制
FL α_1 AT Pitts C232S	398.88 ± 13.012	108.16 ± 7.086	0.3
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	0.47 ± 0.037	15.14 ± 1.68	32.2

[0375] 表6

[0376]

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
E7	T	I	S	T	H	R	R	A	R	L
E10	T	I	R	T	Q	R	V	A	R	L
E11	T	I	T	T	L	R	Y	A	R	L
D8	T	I	Q	T	R	R	N	A	R	L
H11	T	I	A	T	Q	R	Y	A	R	L

[0377]

表7

[0378]

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
WT	T	I	F	T	F	R	S	A	R	L
P2KP1'K	T	I	F	T	K	R	K	A	R	L
2.B10	T	I	S	T	L	R	K	A	R	L
3.B11	T	I	F	T	F	R	R	A	R	L
3.C3	T	I	V	T	R	R	I	A	R	L
3.E8	T	I	F	T	R	R	K	A	R	L
3.G10	T	I	C	T	L	R	K	A	R	L
3.G11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
3.H11	T	I	W	T	W	R	N	A	R	L
4.E4	T	I	K	T	D	R	M	A	R	L
4.F7	T	I	F	T	V	R	K	A	R	L
4.F10	T	I	R	T	R	R	I	A	R	L
4.H7	T	I	G	T	I	R	R	A	R	L
4.H11	T	I	K	T	R	R	H	A	R	L
5.D2	T	I	T	T	R	R	V	A	R	L
5.E7	T	I	L	T	R	R	I	A	R	L
5.E12	T	I	H	T	R	R	V	A	R	L

[0379]

表8

[0380]

	P6	P5	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
α_1 AT WT	L	E	A	I	P	M	S	I	P	P
α_1 AT Pitts	L	E	A	I	P	R	S	I	P	P
P2.G11	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P2.F10	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.D8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
P2.G8	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.E7	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.D10	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.G4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P2.F4	L	E	A	I	R	R	S	I	P	P
P1'.H8	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P

P1'.A11	L	E	A	I	P	R	R	I	P	P
P1'.F10	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
P1'.F9	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
P1'.F4	L	E	A	I	P	R	E	I	P	P
4.G9	L	E	A	I	T	R	N	I	P	P
4.G4	L	E	A	I	Q	R	K	I	P	P
3.E5	L	E	A	I	R	R	A	I	P	P
3.B6	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
3.B2	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
3.A10	L	E	A	I	T	R	Y	I	P	P
2.H1	L	E	A	I	R	R	H	I	P	P
2.C6	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
1.H10	L	E	A	I	V	R	R	I	P	P
1.B11	L	E	A	I	R	R	C	I	P	P
1.A12	L	E	A	I	K	R	H	I	P	P
2.E5	L	E	A	I	T	R	R	I	P	P
3.G9	L	E	A	I	Y	R	R	I	P	P
3.F4	L	E	A	I	A	R	R	I	P	P
3.C9	L	E	A	I	C	R	K	I	P	P
2.H5	L	E	A	I	K	R	N	I	P	P
2.E7	L	E	A	I	W	R	N	I	P	P
1.B2	L	E	A	I	S	R	R	I	P	P
5.C12	L	E	A	I	H	R	N	I	P	P
5.A6	L	E	A	I	R	R	N	I	P	P
4.E1	L	E	A	I	P	R	K	I	P	P
4.C12	L	E	A	I	N	R	N	I	P	P
3.F8	L	E	A	I	T	R	M	I	P	P
3.C10	L	E	A	I	T	R	H	I	P	P
2.E8	L	E	A	I	K	R	S	I	P	P
1.H9	L	E	A	I	T	R	Q	I	P	P

[0381] 表9

[0382]

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)			
变体	凝血酶	APC	APC/凝血酶的抑制
FL α_1 AT Pitts C232S	292.76 ± 17.60	108.16 ± 7.086	0.4
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	4 h 后无抑制	15.14 ± 1.68	无凝血酶抑制
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	0.042 ± 0.0024	61.12 ± 6.26	1455.2
FL α_1 AT Pitts C232S P1'R	0.68 ± 0.068	131.57 ± 13.32	193.5
FL α_1 AT Pitts C232S P1'E	0.15 ± 0.015	2.99 ± 0.29	19.9
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'N	0.27 ± 0.047	62.37 ± 2.46	231.0
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'Y	0.023 ± 0.0014	5.70 ± 0.83	247.8
FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1'K	0.0038 ± 0.0013	33.41 ± 6.36	8792.1
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'H	2 h 后无抑制	28.84 ± 3.05	无凝血酶抑制
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'N	0.015 ± 0.0026	37.80 ± 2.48	2520.0
FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1'C	0.034 ± 0.0094	24.55 ± 2.15	722.1

[0383] 表10

[0384]

变体	PT (s)	aPTT (s)
血浆	27.2 ± 0.8	60.3
FL α_1 AT Pitts C232S P2K	27.0 ± 0.5	107.2
FL α_1 AT Pitts C232S P1'K	27.1 ± 0.4	228.1
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	27.8 ± 0.4	111.6
FL α_1 AT Pitts C232S P1'R	28.1 ± 0.5	287
FL α_1 AT Pitts C232S P1'E	27.2 ± 0.4	84
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'N	29.5 ± 0.9	>300
FL α_1 AT Pitts C232S P2TP1'Y	28.3 ± 0.8	185.4
FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1'K	27.9 ± 0.3	111.5
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'H	27.4 ± 0.9	77.8
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'N	27.8 ± 0.3	81.9
FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1'C	28.5 ± 0.6	ND

[0385] 表11

[0386]

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)		
变体	fXa	APC/fXa 的抑制
FL α_1 AT Pitts C232S	41.33 ± 2.36	2.6
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	0.12 ± 0.010	126.2
FL α_1 AT Pitts C232S P2R	4.79 ± 0.58	12.8
FL α_1 AT Pitts C232S P2QP1'K	1.082 ± 0.15	30.9
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'H	0.62 ± 0.040	46.5
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'N	0.91 ± 0.13	41.5

[0387] 表12

抑制的二级速率常数 ($\text{mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)				aPTT (s)
变体	凝血酶	APC	fXa	
FL α_1 AT Pitts C232S	292.76 $\pm$ 17.60	108.16 $\pm$ 7.086	41.33 $\pm$ 2.36	>300 (55.0 $\pm$ 3.8)
[0388] FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'K	4 h 后无抑制	15.14 $\pm$ 1.87	0.12 $\pm$ 0.010	62.1 $\pm$ 4.2 (55.0 $\pm$ 3.8)
FL α_1 AT Pitts C232S P2RP1'Q	0.0054 $\pm$ 0.0011	8.30 $\pm$ 1.11	0.13 $\pm$ 0.0067	55.1 $\pm$ 2.8 (49.3 $\pm$ 2.5)
FL α_1 AT Pitts C232S P2KP1'Q	0.0029 $\pm$ 0.0015	9.00 $\pm$ 0.67	0.17 $\pm$ 0.010	53.9 $\pm$ 3.0 (49.3 $\pm$ 2.5)

[0389] 表13

[0390] 序列

[0391] 1 mqlflllclv llspqgaslh rhhpremkkv vedlhvgatv apssrrdftf dlyralasaa
 61 psqniffspv sismslaml lgagsstkmq ileglglnlq kssekelhrq fqqlqelnq
 121 prdgfqlslg nalftdlvvd lqdtffvsamk tlyladtftpt nfrdsagamk qindyvakqt
 181 kgkivdllkn ldsnavvimv nyiffkakwe tsfnhkgqtq qdfyvtsetv vrvpmsred
 241 qyhylldrnl scrvvgvpyq gnatalfilp segkmqgven glsektlrkw lkmfkkqrle
 301 lylpkfsieg syqlekvlp lqisnvtftsh adlsgisnhs niqvsemvhk avvevdesgt
 361 raaaatgtif **tfrsarl**nsq rlvfnrpfm fivdnnilfl gkvnrp

[0392] SEQ ID NO:1蛋白C抑制物(PCI)

[0393] 成熟蛋白质,包括前肽,对应于残基20至406。信号序列对应于残基1-19。前肽对应于残基20-25。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线。

[0394] 1 mermlpllal gllaagfcpa vlchpnspld eenltqenqd rgthvdlgla sanvdfafsl
 61 ykqlvlkapd knvifspisi stalafslg ahnttlteil kglkfnltet seaeihqsfg
 121 hllrtlnqss delqlsmgna mfvkeqlsl drftedakrl ygseafatdf qdsaaakkli
 181 ndyvkngtrg kitdlikdld sqtmmlvny iffkakwemp fdpqgthqsr fylskkkwvm
 241 vpmmlshlt ipyfrdeels ctvvelkytg nasalfilpd qdkmeeveam llpetlkrwr
 301 dslefregie lylpkfsisr dynlndillq lgieeaftsk adlsgitgar nlavsqvvhk
 361 avldvfeegt easaatavki **tllsal**vetr tivrfnrpfl miivptdtqn iffmkskvtnp
 421 kqa

[0395] SEQ ID NO:2 α -1-抗胰凝乳蛋白酶

[0396] 成熟蛋白质对应于残基26至423。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0397] 1 masrltlltl lllllagdra ssnpnatsss sqdpeslqdr gegkvattvi skmlfvepil
 61 evsslpttns ttnsatkita nttdepttqp ttepttqpti qptqpttqlp tdsptqpttg
 121 sfcpgpvtlc sdleshstea vlqdalvdfs lklyhafsam kkvetnmafs pfsiaslltq
 181 vllgagentk tnlesilsyp kdftcvhqal kgfttkgvtv vsqifhspdl airdtfnas
 241 rtlysssprv lsnsdanle lintwvaknt nnkisrlls lpsdtrilvl naiylsakwk
 301 ttfdpkktm epfhfknsvi kvpmmskky pvahfidqtl kakvgqlqls hnslslvilp
 361 qnlkhrledm eqalspsvfk aimeklemsk fqptlltlpr ikvttsqdm simekleff
 421 fsydlnlcgl tedpdlqvsa mqhqtvllel etgveaaaaa **aisvart**llv fevqqpflfv
 481 lwdqghkfpv fmgrvydpra

[0398] SEQ ID NO:3C1-酯酶抑制剂

[0399] 成熟蛋白质对应于残基23-500。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0400] 1 mallwglvl swscldgpcv vspvsamep lgrqltsqpn qeqvslptll klgnqepggg
 61 talkspgvc srdpteqth rlaramaft adlflsvagt stcpnlilsp lsvalalshl
 121 algaqnhtlq rlqqlvhags gpplhllsr lcqdlpggaf rlaarmylqk gfpikedfle
 181 qseqlfgakp vsltgkqedd laninqwvke ategkqefl sglpdettvll llnaihfggf
 241 wrnkfdpslt qrdsfhldeq ftvpvemmqa rtyplrwfll eqpeiqvahf pfknnmsfv
 301 lvpthfewnv sqvlanlswd tlhpllvwer ptkvrlpkly lkhqmdlvat lsqglglf
 361 qapdlrgise qslvsvgvqh qstlelsevg veaaaatsiam**srmsl**ssfs vnrpflffif
 421 edttglplfv gsvrnpnpsa prelkeqqds pgnkdflqsl kgfprgdklf gpdlklvppm
 481 eedypqfgsp k

[0401] SEQ ID NO:4 α_2 -抗血纤维蛋白酶

[0402] 成熟蛋白质对应于残基28-491。用于胰凝乳蛋白酶抑制的RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体,用于血纤维蛋白酶(plasmin)抑制的残基加下划线。

[0403] 1 mysnvigtvt sqkrkvyls llligfwdcv tchgspvdi takprdi pmciyrspek
61 katedegseq kipeatnrrv welskansrf attfyqhlad skndndnifl splsisstafa
121 mtklgaacndt lqqlmevfkf dtisektsdq ihffaklnc rlyrkankss klvsanrlfg
181 dksltfnety qdiselvyga klqpldfken aeqsraaiaink wvsnktegri tdvipseain
241 eltvllvnt iyfkgllwksk fspentrkel fykadgescs asmmqgegkf ryrrvaegtq
301 vlelfpkgdd itmvlilpkp ekslakveke ltpevlqewl deleemmlvv hmpfrfriedg
361 fslkeqlqdm glvdlfspek sklpgivaeg rddilyvsdaf hkaflevnee gseaaastav
421 viagrslnpn rvtfkanrpf lvfirevpln tiifmgrvan pcvk

[0404] SEQ ID NO:5抗凝血酶(ATIII)

[0405] 成熟蛋白质对应于残基33-464。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0406] 1 mkhslnalli fliitsawgg skgpldqlek ggetaqsadp qweqlnnknl smpllpadfh
61 kentvtndwi pegeedddyl dlekifsedd dyidivdsis vsptdsdvs gnilqlfhgk
121 sriqrlniln akfafnlrv lkdqvntrfdn ifiapvgist amgmislglk getheqvhsi
181 lhfkdfvns skyeitihn lfrklthrlf rrfngytlrs vndlyiqkqf pilldfkktkv
241 reyyfaaeqi adfsdpafis ktannhimklt kglikdalen idpatqmmil nciyfkgsww
301 nkfpvemthn hnfrlnerev vkvsmmqtkg nflaandqel dcdilqleyv ggismliivvp
361 hkmsgmktle aqltprvver wqksmtnrtr evllpkfkle knynlveslk lmgirmldfk
421 ngnmagisdq riaidlkhq gtitvneegt qattvtvtvgf mplstqvrft vdrpflliy
481 ehrtscillfm grvanpsrs

[0407] SEQ ID NO:6肝素辅因子II

[0408] 成熟蛋白质对应于残基20-499。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0409] 1 mpssvswgil llaglcclvp vslaedpqqd aaqktdtshh dqdhptfnki tponlaefafs
61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamls gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihgfg
121 qellrtlnqp dsqqlttgn glflsegkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdtteakkq
181 indyvekgtg gkivdlvkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdtee dfhvdqvttv
241 kvpmmkrlgm fniqhckkls swvllmkylg nataiffilpd egklqlhene lthdiitkfl
301 enedrrsas hlpklsitgt ydlksvlgql gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka
361 vltidekgte aagamflea ai pmsippevkf nkpfvflmie qntksplfmq kvvnptqk

[0410] SEQ ID NO:7 α_1 -抗胰蛋白酶(α_1 AT)

[0411] 成熟蛋白质对应于残基25-418。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0412] 1 mhlidyllll lvglalshg qlhvehdges csnsshqql etgegspslk iapanadfaf
61 rfyyliaset pgkniffspl sisaayamls lgacshsrsg ileglgfnlt elsesdvhrq
121 fghllhtlnl pghgletrvg saflshnlk flakflndtm avyeaklfht nfydtvgtiq
181 lindhvkket rgkivdlvse lkkdvlmvlv nyiyfkalwe kpfissrttp kdfyvdentt
241 vrvpmmlqdg ehhwylhdry lpcsvlrmdy kgdatvffil pnqgkmreie evltpemlmr
301 wnnllkrnf ykklehlhpk fsisgsyvld qilprlgftd lfskwadlsg itkqqkleas
361 ksfhkatldv deagteaaaa tsfa ikffsa qtnrhilrnf rpflvifst stqsvlflgk
421 vvdptkp

[0413] SEQ ID NO:8激肽释放酶结合蛋白

[0414] 成熟蛋白质对应于残基21-427。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

[0415] 1 mqmispaltcl vlglalvfge gsavhhppsy vahlasdfgv rvfqvvaqas kdrnvvfspy
61 gvasvlamlq lttggetqqq iqaamgfkid dkgmapalrh lykelmgpwn kdeisttdai
121 fvqrdklvq gfmphffrlf rstvkqvdfs everarfiin dwvktthtkgm isnllgkgav
181 dqltrlvlvn alyfngqwk pfpdssthr lfhksdgstv svpmmaqtnk fnytefttpd
241 ghyydilelp yhgdtlsmfi aapyekvpl saltnilsaq lishwkgnmt rlprllvlpk
301 fsletevdlr kplenlgmt mfrqfqadft slsdqeplhv aqalqkvkie vnesgtvass
361 staviv vsarm apeeimdrp flfvvrhnpt qtvlfmgqvm ep

[0416] SEQ ID NO:9纤溶酶原激活物抑制剂

[0417] 成熟蛋白质对应于残基24-402。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

1 mkvvpsllls vllaqvwlvp glapspqspe tpapqngtsr vvqapkeeee deqeaseeka
61 seeekawlma srqqlakets nfgfslrki smrhdgmvf spfgmslamt glmlgatgpt
121 etqikrglhl qalkptkpgl lpslfkglre tlsrnlelgl tqgsfafihk dfdvketffn
[0418] 181 lskryfdtec vpmnfrnasq akrlnmhyin ketrqkipkl fdeinpetkl ilvdyilfkq
241 kwltfpdpvf tevdtfhldk yktikvpmmy gagkfastfd knfrchvkl pyqgnatmlv
301 vlmekmgdhl aledylttdl vetwlrnmkt rnmevffpkf kldqkyemhe llrqmgirri
361 fspfadlsel satgrnlqvs rvlqrtviev dergteavag ilseitaysm ppvikvdrpf
421 hfmiyeetsg mllflgrvvv ptll

[0419] SEQ ID NO:10蛋白质Z-依赖性抑制剂

[0420] 成熟蛋白质对应于残基22-444。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

1 mnwhlplfll asvtlpsics hfnplsleel gsntgiqvfn qivksrphdn ivisphgias
61 vlglqlqgad grtkkqlamv mrygvngvgk ilkkinkaiv skknkdi tv anavfvknas
121 eievfpvtrn kdvfqcevrn vnfedpasac dsinawvkne trdmidnlls pdlidgvltr
[0421] 181 lvlvnavyfk glwksrfqpe ntkkrtfvaa dgksyqvpml aqlsvfrcgs tsapndlwyn
241 fielpyhges ismlialpte sstplsaiip histktidsw msimvpkrvq vilpkftava
301 qtdlkeplkv lgitdmfdss kanfakittg senlhvshil qkakiev sed gtkasaatta
361 iliarssppw fivdrpfllf irhnptgavl fmqqinkp

[0422] SEQ ID NO:11蛋白酶连接素1

[0423] 成熟蛋白质对应于残基20-398-同种型a (isoform a)。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线

1 mpssvswgil llaqlcclvp vslaedpqqd aaqktdtshh dqdhptfnki tpnlaefafs
61 lyrqlahqsn stniffspvs iatafamls1 gtkadthdei leglnfnlte ipeaqihgef
121 qellrtlnqp dsqqlttgn glflseglkl vdkfledvkk lyhseaftvn fgdteeakkq
[0424] 181 indyvekgtq gkivdlvkel drdtvfalvn yiffkgkwer pfevkdttee dfhvdqvttv
241 kvpmumkrlgm fnighckkls swvllmkylg nataiffldp egklqhlene lthdiitkfl
301 enedrrsas1 hlpklsitgt ydlksvlqgl gitkvfsnga dlsgvteeap lklskavhka
361 vltidekgte aagamflea ai krkippevkf nkpfvflmie qntksplfmg kvvnptqk

[0425] SEQ ID NO:12 α_1 AT骨架中修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂

[0426] 成熟蛋白质对应于残基25-418。RCL的残基P4、P2、P1和P1' 为粗体并加下划线。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	剑桥实业有限公司														
[0003]	<120>	用于出血性疾病治疗的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂														
[0004]	<130>	NRS/CP7089444														
[0005]	<140>	US 15/971,692														
[0006]	<141>	2018-05-04														
[0007]	<150>	PCT/EP2014/077783														
[0008]	<151>	2014-12-15														
[0009]	<150>	GB 1322091.8														
[0010]	<151>	2013-12-13														
[0011]	<160>	93														
[0012]	<170>	PatentIn 3.3版														
[0013]	<210>	1														
[0014]	<211>	406														
[0015]	<212>	PRT														
[0016]	<213>	智人														
[0017]	<400>	1														
[0018]	Met	Gln	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Ser	Pro	Gln	Gly
[0019]	1				5					10					15	
[0020]	Ala	Ser	Leu	His	Arg	His	His	Pro	Arg	Glu	Met	Lys	Lys	Arg	Val	Glu
[0021]					20					25					30	
[0022]	Asp	Leu	His	Val	Gly	Ala	Thr	Val	Ala	Pro	Ser	Ser	Arg	Arg	Asp	Phe
[0023]					35					40					45	
[0024]	Thr	Phe	Asp	Leu	Tyr	Arg	Ala	Leu	Ala	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Gln	Asn
[0025]					50					55					60	
[0026]	Ile	Phe	Phe	Ser	Pro	Val	Ser	Ile	Ser	Met	Ser	Leu	Ala	Met	Leu	Ser
[0027]	65									70					75	
[0028]	Leu	Gly	Ala	Gly	Ser	Ser	Thr	Lys	Met	Gln	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly
[0029]										85					90	
[0030]	Leu	Asn	Leu	Gln	Lys	Ser	Ser	Glu	Lys	Glu	Leu	His	Arg	Gly	Phe	Gln
[0031]										100					105	
[0032]	Gln	Leu	Leu	Gln	Glu	Leu	Asn	Gln	Pro	Arg	Asp	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser
[0033]										115					120	
[0034]	Leu	Gly	Asn	Ala	Leu	Phe	Thr	Asp	Leu	Val	Val	Asp	Leu	Gln	Asp	Thr
[0035]										130					135	
[0036]	Phe	Val	Ser	Ala	Met	Lys	Thr	Leu	Tyr	Leu	Ala	Asp	Thr	Phe	Pro	Thr
[0037]										145					150	
[0038]	Asn	Phe	Arg	Asp	Ser	Ala	Gly	Ala	Met	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val

[0039]		165		170		175
[0040]	Ala Lys Gln Thr Lys Gly Lys Ile Val Asp Leu Leu Lys Asn Leu Asp					
[0041]		180		185		190
[0042]	Ser Asn Ala Val Val Ile Met Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys					
[0043]		195		200		205
[0044]	Trp Glu Thr Ser Phe Asn His Lys Gly Thr Gln Glu Gln Asp Phe Tyr					
[0045]		210		215		220
[0046]	Val Thr Ser Glu Thr Val Val Arg Val Pro Met Met Ser Arg Glu Asp					
[0047]	225		230		235	240
[0048]	Gln Tyr His Tyr Leu Leu Asp Arg Asn Leu Ser Cys Arg Val Val Gly					
[0049]		245		250		255
[0050]	Val Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Ala Leu Phe Ile Leu Pro Ser Glu					
[0051]		260		265		270
[0052]	Gly Lys Met Gln Gln Val Glu Asn Gly Leu Ser Glu Lys Thr Leu Arg					
[0053]		275		280		285
[0054]	Lys Trp Leu Lys Met Phe Lys Lys Arg Gln Leu Glu Leu Tyr Leu Pro					
[0055]		290		295		300
[0056]	Lys Phe Ser Ile Glu Gly Ser Tyr Gln Leu Glu Lys Val Leu Pro Ser					
[0057]	305		310		315	320
[0058]	Leu Gly Ile Ser Asn Val Phe Thr Ser His Ala Asp Leu Ser Gly Ile					
[0059]		325		330		335
[0060]	Ser Asn His Ser Asn Ile Gln Val Ser Glu Met Val His Lys Ala Val					
[0061]		340		345		350
[0062]	Val Glu Val Asp Glu Ser Gly Thr Arg Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr					
[0063]		355		360		365
[0064]	Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu Asn Ser Gln Arg Leu Val Phe					
[0065]		370		375		380
[0066]	Asn Arg Pro Phe Leu Met Phe Ile Val Asp Asn Asn Ile Leu Phe Leu					
[0067]	385		390		395	400
[0068]	Gly Lys Val Asn Arg Pro					
[0069]		405				
[0070]	<210> 2					
[0071]	<211> 423					
[0072]	<212> PRT					
[0073]	<213> 智人					
[0074]	<400> 2					
[0075]	Met Glu Arg Met Leu Pro Leu Leu Ala Leu Gly Leu Leu Ala Ala Gly					
[0076]	1	5		10		15
[0077]	Phe Cys Pro Ala Val Leu Cys His Pro Asn Ser Pro Leu Asp Glu Glu					

[0078]	20	25	30
[0079]	Asn Leu Thr Gln Glu Asn Gln Asp Arg Gly Thr His Val Asp Leu Gly		
[0080]	35	40	45
[0081]	Leu Ala Ser Ala Asn Val Asp Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Lys Gln Leu		
[0082]	50	55	60
[0083]	Val Leu Lys Ala Pro Asp Lys Asn Val Ile Phe Ser Pro Leu Ser Ile		
[0084]	65	70	75
[0085]	Ser Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Leu Gly Ala His Asn Thr Thr Leu		
[0086]	85	90	95
[0087]	Thr Glu Ile Leu Lys Gly Leu Lys Phe Asn Leu Thr Glu Thr Ser Glu		
[0088]	100	105	110
[0089]	Ala Glu Ile His Gln Ser Phe Gln His Leu Leu Arg Thr Leu Asn Gln		
[0090]	115	120	125
[0091]	Ser Ser Asp Glu Leu Gln Leu Ser Met Gly Asn Ala Met Phe Val Lys		
[0092]	130	135	140
[0093]	Glu Gln Leu Ser Leu Leu Asp Arg Phe Thr Glu Asp Ala Lys Arg Leu		
[0094]	145	150	155
[0095]	Tyr Gly Ser Glu Ala Phe Ala Thr Asp Phe Gln Asp Ser Ala Ala Ala		
[0096]	165	170	175
[0097]	Lys Lys Leu Ile Asn Asp Tyr Val Lys Asn Gly Thr Arg Gly Lys Ile		
[0098]	180	185	190
[0099]	Thr Asp Leu Ile Lys Asp Leu Asp Ser Gln Thr Met Met Val Leu Val		
[0100]	195	200	205
[0101]	Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Ala Lys Trp Glu Met Pro Phe Asp Pro Gln		
[0102]	210	215	220
[0103]	Asp Thr His Gln Ser Arg Phe Tyr Leu Ser Lys Lys Lys Trp Val Met		
[0104]	225	230	235
[0105]	Val Pro Met Met Ser Leu His His Leu Thr Ile Pro Tyr Phe Arg Asp		
[0106]	245	250	255
[0107]	Glu Glu Leu Ser Cys Thr Val Val Glu Leu Lys Tyr Thr Gly Asn Ala		
[0108]	260	265	270
[0109]	Ser Ala Leu Phe Ile Leu Pro Asp Gln Asp Lys Met Glu Glu Val Glu		
[0110]	275	280	285
[0111]	Ala Met Leu Leu Pro Glu Thr Leu Lys Arg Trp Arg Asp Ser Leu Glu		
[0112]	290	295	300
[0113]	Phe Arg Glu Ile Gly Glu Leu Tyr Leu Pro Lys Phe Ser Ile Ser Arg		
[0114]	305	310	315
[0115]	Asp Tyr Asn Leu Asn Asp Ile Leu Leu Gln Leu Gly Ile Glu Glu Ala		
[0116]	325	330	335

[0117]	Phe Thr Ser Lys Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr Gly Ala Arg Asn Leu
[0118]	340 345 350
[0119]	Ala Val Ser Gln Val Val His Lys Ala Val Leu Asp Val Phe Glu Glu
[0120]	355 360 365
[0121]	Gly Thr Glu Ala Ser Ala Ala Thr Ala Val Lys Ile Thr Leu Leu Ser
[0122]	370 375 380
[0123]	Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu
[0124]	385 390 395 400
[0125]	Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr Gln Asn Ile Phe Phe Met Ser Lys
[0126]	405 410 415
[0127]	Val Thr Asn Pro Lys Gln Ala
[0128]	420
[0129]	<210> 3
[0130]	<211> 500
[0131]	<212> PRT
[0132]	<213> 智人
[0133]	<400> 3
[0134]	Met Ala Ser Arg Leu Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ala
[0135]	1 5 10 15
[0136]	Gly Asp Arg Ala Ser Ser Asn Pro Asn Ala Thr Ser Ser Ser Ser Gln
[0137]	20 25 30
[0138]	Asp Pro Glu Ser Leu Gln Asp Arg Gly Glu Gly Lys Val Ala Thr Thr
[0139]	35 40 45
[0140]	Val Ile Ser Lys Met Leu Phe Val Glu Pro Ile Leu Glu Val Ser Ser
[0141]	50 55 60
[0142]	Leu Pro Thr Thr Asn Ser Thr Thr Asn Ser Ala Thr Lys Ile Thr Ala
[0143]	65 70 75 80
[0144]	Asn Thr Thr Asp Glu Pro Thr Thr Gln Pro Thr Thr Glu Pro Thr Thr
[0145]	85 90 95
[0146]	Gln Pro Thr Ile Gln Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gln Leu Pro Thr Asp
[0147]	100 105 110
[0148]	Ser Pro Thr Gln Pro Thr Thr Gly Ser Phe Cys Pro Gly Pro Val Thr
[0149]	115 120 125
[0150]	Leu Cys Ser Asp Leu Glu Ser His Ser Thr Glu Ala Val Leu Gly Asp
[0151]	130 135 140
[0152]	Ala Leu Val Asp Phe Ser Leu Lys Leu Tyr His Ala Phe Ser Ala Met
[0153]	145 150 155 160
[0154]	Lys Lys Val Glu Thr Asn Met Ala Phe Ser Pro Phe Ser Ile Ala Ser
[0155]	165 170 175

[0156]	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Leu	Gly	Ala	Gly	Glu	Asn	Thr	Lys	Thr	Asn
[0157]				180					185					190		
[0158]	Leu	Glu	Ser	Ile	Leu	Ser	Tyr	Pro	Lys	Asp	Phe	Thr	Cys	Val	His	Gln
[0159]				195					200					205		
[0160]	Ala	Leu	Lys	Gly	Phe	Thr	Thr	Lys	Gly	Val	Thr	Ser	Val	Ser	Gln	Ile
[0161]				210					215					220		
[0162]	Phe	His	Ser	Pro	Asp	Leu	Ala	Ile	Arg	Asp	Thr	Phe	Val	Asn	Ala	Ser
[0163]				225					230					235		240
[0164]	Arg	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ser	Ser	Pro	Arg	Val	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Asp
[0165]					245					250					255	
[0166]	Ala	Asn	Leu	Glu	Leu	Ile	Asn	Thr	Trp	Val	Ala	Lys	Asn	Thr	Asn	Asn
[0167]				260						265					270	
[0168]	Lys	Ile	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Thr	Arg	Leu	Val
[0169]				275						280					285	
[0170]	Leu	Leu	Asn	Ala	Ile	Tyr	Leu	Ser	Ala	Lys	Trp	Lys	Thr	Thr	Phe	Asp
[0171]				290						295					300	
[0172]	Pro	Lys	Lys	Thr	Arg	Met	Glu	Pro	Phe	His	Phe	Lys	Asn	Ser	Val	Ile
[0173]				305							315					320
[0174]	Lys	Val	Pro	Met	Met	Asn	Ser	Lys	Lys	Tyr	Pro	Val	Ala	His	Phe	Ile
[0175]					325						330					335
[0176]	Asp	Gln	Thr	Leu	Lys	Ala	Lys	Val	Gly	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	His	Asn
[0177]				340						345					350	
[0178]	Leu	Ser	Leu	Val	Ile	Leu	Val	Pro	Gln	Asn	Leu	Lys	His	Arg	Leu	Glu
[0179]				355						360					365	
[0180]	Asp	Met	Glu	Gln	Ala	Leu	Ser	Pro	Ser	Val	Phe	Lys	Ala	Ile	Met	Glu
[0181]				370						375					380	
[0182]	Lys	Leu	Glu	Met	Ser	Lys	Phe	Gln	Pro	Thr	Leu	Leu	Thr	Leu	Pro	Arg
[0183]				385							395					400
[0184]	Ile	Lys	Val	Thr	Thr	Ser	Gln	Asp	Met	Leu	Ser	Ile	Met	Glu	Lys	Leu
[0185]					405						410					415
[0186]	Glu	Phe	Phe	Asp	Phe	Ser	Tyr	Asp	Leu	Asn	Leu	Cys	Gly	Leu	Thr	Glu
[0187]				420						425					430	
[0188]	Asp	Pro	Asp	Leu	Gln	Val	Ser	Ala	Met	Gln	His	Gln	Thr	Val	Leu	Glu
[0189]				435						440					445	
[0190]	Leu	Thr	Glu	Thr	Gly	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Ser	Ala	Ile	Ser	Val
[0191]				450						455					460	
[0192]	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Val	Phe	Glu	Val	Gln	Gln	Pro	Phe	Leu	Phe	Val
[0193]				465						470					475	480
[0194]	Leu	Trp	Asp	Gln	Gln	His	Lys	Phe	Pro	Val	Phe	Met	Gly	Arg	Val	Tyr

[0195]		485		490		495
[0196]	Asp Pro Arg Ala					
[0197]		500				
[0198]	<210> 4					
[0199]	<211> 491					
[0200]	<212> PRT					
[0201]	<213> 智人					
[0202]	<400> 4					
[0203]	Met Ala Leu Leu Trp Gly Leu Leu Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Gln					
[0204]	1	5		10		15
[0205]	Gly Pro Cys Ser Val Phe Ser Pro Val Ser Ala Met Glu Pro Leu Gly					
[0206]		20		25		30
[0207]	Arg Gln Leu Thr Ser Gly Pro Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Thr					
[0208]		35		40		45
[0209]	Leu Leu Lys Leu Gly Asn Gln Glu Pro Gly Gly Gln Thr Ala Leu Lys					
[0210]		50		55		60
[0211]	Ser Pro Pro Gly Val Cys Ser Arg Asp Pro Thr Pro Glu Gln Thr His					
[0212]	65	70		75		80
[0213]	Arg Leu Ala Arg Ala Met Met Ala Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ser Leu					
[0214]		85		90		95
[0215]	Val Ala Gln Thr Ser Thr Cys Pro Asn Leu Ile Leu Ser Pro Leu Ser					
[0216]		100		105		110
[0217]	Val Ala Leu Ala Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Ala Gln Asn His Thr					
[0218]		115		120		125
[0219]	Leu Gln Arg Leu Gln Gln Val Leu His Ala Gly Ser Gly Pro Cys Leu					
[0220]		130		135		140
[0221]	Pro His Leu Leu Ser Arg Leu Cys Gln Asp Leu Gly Pro Gly Ala Phe					
[0222]	145	150		155		160
[0223]	Arg Leu Ala Ala Arg Met Tyr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Ile Lys Glu					
[0224]		165		170		175
[0225]	Asp Phe Leu Glu Gln Ser Glu Gln Leu Phe Gly Ala Lys Pro Val Ser					
[0226]		180		185		190
[0227]	Leu Thr Gly Lys Gln Glu Asp Asp Leu Ala Asn Ile Asn Gln Trp Val					
[0228]		195		200		205
[0229]	Lys Glu Ala Thr Glu Gly Lys Ile Gln Glu Phe Leu Ser Gly Leu Pro					
[0230]		210		215		220
[0231]	Glu Asp Thr Val Leu Leu Leu Leu Asn Ala Ile His Phe Gln Gly Phe					
[0232]	225	230		235		240
[0233]	Trp Arg Asn Lys Phe Asp Pro Ser Leu Thr Gln Arg Asp Ser Phe His					

[0234]		245		250		255
[0235]	Leu Asp Glu Gln Phe Thr Val Pro Val Glu Met Met Gln Ala Arg Thr					
[0236]		260		265		270
[0237]	Tyr Pro Leu Arg Trp Phe Leu Leu Glu Gln Pro Glu Ile Gln Val Ala					
[0238]		275		280		285
[0239]	His Phe Pro Phe Lys Asn Asn Met Ser Phe Val Val Leu Val Pro Thr					
[0240]		290		295		300
[0241]	His Phe Glu Trp Asn Val Ser Gln Val Leu Ala Asn Leu Ser Trp Asp					
[0242]	305		310		315	320
[0243]	Thr Leu His Pro Pro Leu Val Trp Glu Arg Pro Thr Lys Val Arg Leu					
[0244]		325		330		335
[0245]	Pro Lys Leu Tyr Leu Lys His Gln Met Asp Leu Val Ala Thr Leu Ser					
[0246]		340		345		350
[0247]	Gln Leu Gly Leu Gln Glu Leu Phe Gln Ala Pro Asp Leu Arg Gly Ile					
[0248]		355		360		365
[0249]	Ser Glu Gln Ser Leu Val Val Ser Gly Val Gln His Gln Ser Thr Leu					
[0250]		370		375		380
[0251]	Glu Leu Ser Glu Val Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala					
[0252]	385		390		395	400
[0253]	Met Ser Arg Met Ser Leu Ser Ser Phe Ser Val Asn Arg Pro Phe Leu					
[0254]		405		410		415
[0255]	Phe Phe Ile Phe Glu Asp Thr Thr Gly Leu Pro Leu Phe Val Gly Ser					
[0256]		420		425		430
[0257]	Val Arg Asn Pro Asn Pro Ser Ala Pro Arg Glu Leu Lys Glu Gln Gln					
[0258]		435		440		445
[0259]	Asp Ser Pro Gly Asn Lys Asp Phe Leu Gln Ser Leu Lys Gly Phe Pro					
[0260]		450		455		460
[0261]	Arg Gly Asp Lys Leu Phe Gly Pro Asp Leu Lys Leu Val Pro Pro Met					
[0262]	465		470		475	480
[0263]	Glu Glu Asp Tyr Pro Gln Phe Gly Ser Pro Lys					
[0264]		485		490		
[0265]	<210>	5				
[0266]	<211>	464				
[0267]	<212>	PRT				
[0268]	<213>	智人				
[0269]	<400>	5				
[0270]	Met Tyr Ser Asn Val Ile Gly Thr Val Thr Ser Gly Lys Arg Lys Val					
[0271]	1		5		10	15
[0272]	Tyr Leu Leu Ser Leu Leu Leu Ile Gly Phe Trp Asp Cys Val Thr Cys					

[0312]	Gln Glu Trp Leu Asp Glu Leu Glu Glu Met Met Leu Val Val His Met
[0313]	340 345 350
[0314]	Pro Arg Phe Arg Ile Glu Asp Gly Phe Ser Leu Lys Glu Gln Leu Gln
[0315]	355 360 365
[0316]	Asp Met Gly Leu Val Asp Leu Phe Ser Pro Glu Lys Ser Lys Leu Pro
[0317]	370 375 380
[0318]	Gly Ile Val Ala Glu Gly Arg Asp Asp Leu Tyr Val Ser Asp Ala Phe
[0319]	385 390 395 400
[0320]	His Lys Ala Phe Leu Glu Val Asn Glu Glu Gly Ser Glu Ala Ala Ala
[0321]	405 410 415
[0322]	Ser Thr Ala Val Val Ile Ala Gly Arg Ser Leu Asn Pro Asn Arg Val
[0323]	420 425 430
[0324]	Thr Phe Lys Ala Asn Arg Pro Phe Leu Val Phe Ile Arg Glu Val Pro
[0325]	435 440 445
[0326]	Leu Asn Thr Ile Ile Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro Cys Val Lys
[0327]	450 455 460
[0328]	<210> 6
[0329]	<211> 499
[0330]	<212> PRT
[0331]	<213> 智人
[0332]	<400> 6
[0333]	Met Lys His Ser Leu Asn Ala Leu Leu Ile Phe Leu Ile Ile Thr Ser
[0334]	1 5 10 15
[0335]	Ala Trp Gly Gly Ser Lys Gly Pro Leu Asp Gln Leu Glu Lys Gly Gly
[0336]	20 25 30
[0337]	Glu Thr Ala Gln Ser Ala Asp Pro Gln Trp Glu Gln Leu Asn Asn Lys
[0338]	35 40 45
[0339]	Asn Leu Ser Met Pro Leu Leu Pro Ala Asp Phe His Lys Glu Asn Thr
[0340]	50 55 60
[0341]	Val Thr Asn Asp Trp Ile Pro Glu Gly Glu Glu Asp Asp Asp Tyr Leu
[0342]	65 70 75 80
[0343]	Asp Leu Glu Lys Ile Phe Ser Glu Asp Asp Asp Tyr Ile Asp Ile Val
[0344]	85 90 95
[0345]	Asp Ser Leu Ser Val Ser Pro Thr Asp Ser Asp Val Ser Ala Gly Asn
[0346]	100 105 110
[0347]	Ile Leu Gln Leu Phe His Gly Lys Ser Arg Ile Gln Arg Leu Asn Ile
[0348]	115 120 125
[0349]	Leu Asn Ala Lys Phe Ala Phe Asn Leu Tyr Arg Val Leu Lys Asp Gln
[0350]	130 135 140

[0351]	Val Asn Thr Phe Asp Asn Ile Phe Ile Ala Pro Val Gly Ile Ser Thr
[0352]	145 150 155 160
[0353]	Ala Met Gly Met Ile Ser Leu Gly Leu Lys Gly Glu Thr His Glu Gln
[0354]	165 170 175
[0355]	Val His Ser Ile Leu His Phe Lys Asp Phe Val Asn Ala Ser Ser Lys
[0356]	180 185 190
[0357]	Tyr Glu Ile Thr Thr Ile His Asn Leu Phe Arg Lys Leu Thr His Arg
[0358]	195 200 205
[0359]	Leu Phe Arg Arg Asn Phe Gly Tyr Thr Leu Arg Ser Val Asn Asp Leu
[0360]	210 215 220
[0361]	Tyr Ile Gln Lys Gln Phe Pro Ile Leu Leu Asp Phe Lys Thr Lys Val
[0362]	225 230 235 240
[0363]	Arg Glu Tyr Tyr Phe Ala Glu Ala Gln Ile Ala Asp Phe Ser Asp Pro
[0364]	245 250 255
[0365]	Ala Phe Ile Ser Lys Thr Asn Asn His Ile Met Lys Leu Thr Lys Gly
[0366]	260 265 270
[0367]	Leu Ile Lys Asp Ala Leu Glu Asn Ile Asp Pro Ala Thr Gln Met Met
[0368]	275 280 285
[0369]	Ile Leu Asn Cys Ile Tyr Phe Lys Gly Ser Trp Val Asn Lys Phe Pro
[0370]	290 295 300
[0371]	Val Glu Met Thr His Asn His Asn Phe Arg Leu Asn Glu Arg Glu Val
[0372]	305 310 315 320
[0373]	Val Lys Val Ser Met Met Gln Thr Lys Gly Asn Phe Leu Ala Ala Asn
[0374]	325 330 335
[0375]	Asp Gln Glu Leu Asp Cys Asp Ile Leu Gln Leu Glu Tyr Val Gly Gly
[0376]	340 345 350
[0377]	Ile Ser Met Leu Ile Val Val Pro His Lys Met Ser Gly Met Lys Thr
[0378]	355 360 365
[0379]	Leu Glu Ala Gln Leu Thr Pro Arg Val Val Glu Arg Trp Gln Lys Ser
[0380]	370 375 380
[0381]	Met Thr Asn Arg Thr Arg Glu Val Leu Leu Pro Lys Phe Lys Leu Glu
[0382]	385 390 395 400
[0383]	Lys Asn Tyr Asn Leu Val Glu Ser Leu Lys Leu Met Gly Ile Arg Met
[0384]	405 410 415
[0385]	Leu Phe Asp Lys Asn Gly Asn Met Ala Gly Ile Ser Asp Gln Arg Ile
[0386]	420 425 430
[0387]	Ala Ile Asp Leu Phe Lys His Gln Gly Thr Ile Thr Val Asn Glu Glu
[0388]	435 440 445
[0389]	Gly Thr Gln Ala Thr Thr Val Thr Thr Val Gly Phe Met Pro Leu Ser

[0390]	450	455	460
[0391]	Thr Gln Val Arg Phe Thr Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Leu Ile Tyr		
[0392]	465	470	475 480
[0393]	Glu His Arg Thr Ser Cys Leu Leu Phe Met Gly Arg Val Ala Asn Pro		
[0394]	485	490	495
[0395]	Ser Arg Ser		
[0396]	<210> 7		
[0397]	<211> 418		
[0398]	<212> PRT		
[0399]	<213> 智人		
[0400]	<400> 7		
[0401]	Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys		
[0402]	1 5 10 15		
[0403]	Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala		
[0404]	20 25 30		
[0405]	Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn		
[0406]	35 40 45		
[0407]	Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln		
[0408]	50 55 60		
[0409]	Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser		
[0410]	65 70 75 80		
[0411]	Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr		
[0412]	85 90 95		
[0413]	His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro		
[0414]	100 105 110		
[0415]	Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn		
[0416]	115 120 125		
[0417]	Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu		
[0418]	130 135 140		
[0419]	Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys		
[0420]	145 150 155 160		
[0421]	Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu		
[0422]	165 170 175		
[0423]	Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys		
[0424]	180 185 190		
[0425]	Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu		
[0426]	195 200 205		
[0427]	Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val		
[0428]	210 215 220		

[0429]	Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val																
[0430]	225					230					235						240
[0431]	Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys																
[0432]						245					250						255
[0433]	Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala																
[0434]						260					265						270
[0435]	Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu																
[0436]						275					280						285
[0437]	Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp																
[0438]	290										295						300
[0439]	Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr																
[0440]	305										310						320
[0441]	Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe																
[0442]						325					330						335
[0443]	Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys																
[0444]						340					345						350
[0445]	Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly																
[0446]						355					360						365
[0447]	Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile																
[0448]	370										375						380
[0449]	Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu																
[0450]	385										390						400
[0451]	Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr																
[0452]						405					410						415
[0453]	Gln Lys																
[0454]	<210> 8																
[0455]	<211> 427																
[0456]	<212> PRT																
[0457]	<213> 智人																
[0458]	<400> 8																
[0459]	Met His Leu Ile Asp Tyr Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Leu Leu Ala																
[0460]	1					5					10						15
[0461]	Leu Ser His Gly Gln Leu His Val Glu His Asp Gly Glu Ser Cys Ser																
[0462]						20					25						30
[0463]	Asn Ser Ser His Gln Gln Ile Leu Glu Thr Gly Glu Gly Ser Pro Ser																
[0464]						35					40						45
[0465]	Leu Lys Ile Ala Pro Ala Asn Ala Asp Phe Ala Phe Arg Phe Tyr Tyr																
[0466]	50										55						60
[0467]	Leu Ile Ala Ser Glu Thr Pro Gly Lys Asn Ile Phe Phe Ser Pro Leu																

[0468]	65	70	75	80
[0469]	Ser Ile Ser Ala Ala Tyr Ala Met Leu Ser Leu Gly Ala Cys Ser His			
[0470]		85	90	95
[0471]	Ser Arg Ser Gln Ile Leu Glu Gly Leu Gly Phe Asn Leu Thr Glu Leu			
[0472]		100	105	110
[0473]	Ser Glu Ser Asp Val His Arg Gly Phe Gln His Leu Leu His Thr Leu			
[0474]		115	120	125
[0475]	Asn Leu Pro Gly His Gly Leu Glu Thr Arg Val Gly Ser Ala Leu Phe			
[0476]		130	135	140
[0477]	Leu Ser His Asn Leu Lys Phe Leu Ala Lys Phe Leu Asn Asp Thr Met			
[0478]	145	150	155	160
[0479]	Ala Val Tyr Glu Ala Lys Leu Phe His Thr Asn Phe Tyr Asp Thr Val			
[0480]		165	170	175
[0481]	Gly Thr Ile Gln Leu Ile Asn Asp His Val Lys Lys Glu Thr Arg Gly			
[0482]		180	185	190
[0483]	Lys Ile Val Asp Leu Val Ser Glu Leu Lys Lys Asp Val Leu Met Val			
[0484]		195	200	205
[0485]	Leu Val Asn Tyr Ile Tyr Phe Lys Ala Leu Trp Glu Lys Pro Phe Ile			
[0486]		210	215	220
[0487]	Ser Ser Arg Thr Thr Pro Lys Asp Phe Tyr Val Asp Glu Asn Thr Thr			
[0488]	225	230	235	240
[0489]	Val Arg Val Pro Met Met Leu Gln Asp Gln Glu His His Trp Tyr Leu			
[0490]		245	250	255
[0491]	His Asp Arg Tyr Leu Pro Cys Ser Val Leu Arg Met Asp Tyr Lys Gly			
[0492]		260	265	270
[0493]	Asp Ala Thr Val Phe Phe Ile Leu Pro Asn Gln Gly Lys Met Arg Glu			
[0494]		275	280	285
[0495]	Ile Glu Glu Val Leu Thr Pro Glu Met Leu Met Arg Trp Asn Asn Leu			
[0496]		290	295	300
[0497]	Leu Arg Lys Arg Asn Phe Tyr Lys Lys Leu Glu Leu His Leu Pro Lys			
[0498]	305	310	315	320
[0499]	Phe Ser Ile Ser Gly Ser Tyr Val Leu Asp Gln Ile Leu Pro Arg Leu			
[0500]		325	330	335
[0501]	Gly Phe Thr Asp Leu Phe Ser Lys Trp Ala Asp Leu Ser Gly Ile Thr			
[0502]		340	345	350
[0503]	Lys Gln Gln Lys Leu Glu Ala Ser Lys Ser Phe His Lys Ala Thr Leu			
[0504]		355	360	365
[0505]	Asp Val Asp Glu Ala Gly Thr Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Phe Ala			
[0506]		370	375	380

[0507]	Ile	Lys	Phe	Phe	Ser	Ala	Gln	Thr	Asn	Arg	His	Ile	Leu	Arg	Phe	Asn
[0508]	385					390				395					400	
[0509]	Arg	Pro	Phe	Leu	Val	Val	Ile	Phe	Ser	Thr	Ser	Thr	Gln	Ser	Val	Leu
[0510]					405					410					415	
[0511]	Phe	Leu	Gly	Lys	Val	Val	Asp	Pro	Thr	Lys	Pro					
[0512]					420					425						
[0513]	<210>	9														
[0514]	<211>	402														
[0515]	<212>	PRT														
[0516]	<213>	智人														
[0517]	<400>	9														
[0518]	Met	Gln	Met	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu
[0519]	1			5					10					15		
[0520]	Val	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	His	His	Pro	Pro	Ser	Tyr	Val	Ala
[0521]				20					25					30		
[0522]	His	Leu	Ala	Ser	Asp	Phe	Gly	Val	Arg	Val	Phe	Gln	Gln	Val	Ala	Gln
[0523]				35					40					45		
[0524]	Ala	Ser	Lys	Asp	Arg	Asn	Val	Val	Phe	Ser	Pro	Tyr	Gly	Val	Ala	Ser
[0525]		50					55					60				
[0526]	Val	Leu	Ala	Met	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Gly	Glu	Thr	Gln	Gln	Gln
[0527]	65				70					75				80		
[0528]	Ile	Gln	Ala	Ala	Met	Gly	Phe	Lys	Ile	Asp	Asp	Lys	Gly	Met	Ala	Pro
[0529]					85					90				95		
[0530]	Ala	Leu	Arg	His	Leu	Tyr	Lys	Glu	Leu	Met	Gly	Pro	Trp	Asn	Lys	Asp
[0531]				100					105					110		
[0532]	Glu	Ile	Ser	Thr	Thr	Asp	Ala	Ile	Phe	Val	Gln	Arg	Asp	Leu	Lys	Leu
[0533]				115					120					125		
[0534]	Val	Gln	Gly	Phe	Met	Pro	His	Phe	Phe	Arg	Leu	Phe	Arg	Ser	Thr	Val
[0535]		130						135					140			
[0536]	Lys	Gln	Val	Asp	Phe	Ser	Glu	Val	Glu	Arg	Ala	Arg	Phe	Ile	Ile	Asn
[0537]	145					150					155					160
[0538]	Asp	Trp	Val	Lys	Thr	His	Thr	Lys	Gly	Met	Ile	Ser	Asn	Leu	Leu	Gly
[0539]					165					170					175	
[0540]	Lys	Gly	Ala	Val	Asp	Gln	Leu	Thr	Arg	Leu	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Leu
[0541]					180					185					190	
[0542]	Tyr	Phe	Asn	Gly	Gln	Trp	Lys	Thr	Pro	Phe	Pro	Asp	Ser	Ser	Thr	His
[0543]					195					200				205		
[0544]	Arg	Arg	Leu	Phe	His	Lys	Ser	Asp	Gly	Ser	Thr	Val	Ser	Val	Pro	Met
[0545]		210						215					220			

[0546]	Met	Ala	Gln	Thr	Asn	Lys	Phe	Asn	Tyr	Thr	Glu	Phe	Thr	Thr	Pro	Asp
[0547]	225					230					235					240
[0548]	Gly	His	Tyr	Tyr	Asp	Ile	Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	His	Gly	Asp	Thr	Leu
[0549]					245					250						255
[0550]	Ser	Met	Phe	Ile	Ala	Ala	Pro	Tyr	Glu	Lys	Glu	Val	Pro	Leu	Ser	Ala
[0551]				260					265					270		
[0552]	Leu	Thr	Asn	Ile	Leu	Ser	Ala	Gln	Leu	Ile	Ser	His	Trp	Lys	Gly	Asn
[0553]			275					280					285			
[0554]	Met	Thr	Arg	Leu	Pro	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Lys	Phe	Ser	Leu	Glu
[0555]	290						295					300				
[0556]	Thr	Glu	Val	Asp	Leu	Arg	Lys	Pro	Leu	Glu	Asn	Leu	Gly	Met	Thr	Asp
[0557]	305					310					315					320
[0558]	Met	Phe	Arg	Gln	Phe	Gln	Ala	Asp	Phe	Thr	Ser	Leu	Ser	Asp	Gln	Glu
[0559]				325					330						335	
[0560]	Pro	Leu	His	Val	Ala	Gln	Ala	Leu	Gln	Lys	Val	Lys	Ile	Glu	Val	Asn
[0561]				340					345					350		
[0562]	Glu	Ser	Gly	Thr	Val	Ala	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Val	Ile	Val	Ser	Ala
[0563]			355					360					365			
[0564]	Arg	Met	Ala	Pro	Glu	Glu	Ile	Ile	Met	Asp	Arg	Pro	Phe	Leu	Phe	Val
[0565]	370						375					380				
[0566]	Val	Arg	His	Asn	Pro	Thr	Gly	Thr	Val	Leu	Phe	Met	Gly	Gln	Val	Met
[0567]	385					390					395					400
[0568]	Glu	Pro														
[0569]	<210>	10														
[0570]	<211>	444														
[0571]	<212>	PRT														
[0572]	<213>	智人														
[0573]	<400>	10														
[0574]	Met	Lys	Val	Val	Pro	Ser	Leu	Leu	Leu	Ser	Val	Leu	Leu	Ala	Gln	Val
[0575]	1				5					10					15	
[0576]	Trp	Leu	Val	Pro	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Pro	Gln	Ser	Pro	Glu	Thr	Pro
[0577]				20					25					30		
[0578]	Ala	Pro	Gln	Asn	Gln	Thr	Ser	Arg	Val	Val	Gln	Ala	Pro	Lys	Glu	Glu
[0579]			35					40					45			
[0580]	Glu	Glu	Asp	Glu	Gln	Glu	Ala	Ser	Glu	Glu	Lys	Ala	Ser	Glu	Glu	Glu
[0581]	50						55					60				
[0582]	Lys	Ala	Trp	Leu	Met	Ala	Ser	Arg	Gln	Gln	Leu	Ala	Lys	Glu	Thr	Ser
[0583]	65					70					75					80
[0584]	Asn	Phe	Gly	Phe	Ser	Leu	Leu	Arg	Lys	Ile	Ser	Met	Arg	His	Asp	Gly

[0585]		85		90		95
[0586]	Asn Met Val Phe Ser Pro Phe Gly Met Ser Leu Ala Met Thr Gly Leu					
[0587]		100		105		110
[0588]	Met Leu Gly Ala Thr Gly Pro Thr Glu Thr Gln Ile Lys Arg Gly Leu					
[0589]		115		120		125
[0590]	His Leu Gln Ala Leu Lys Pro Thr Lys Pro Gly Leu Leu Pro Ser Leu					
[0591]		130		135		140
[0592]	Phe Lys Gly Leu Arg Glu Thr Leu Ser Arg Asn Leu Glu Leu Gly Leu					
[0593]		145		150		155
[0594]	Thr Gln Gly Ser Phe Ala Phe Ile His Lys Asp Phe Asp Val Lys Glu					
[0595]		165		170		175
[0596]	Thr Phe Phe Asn Leu Ser Lys Arg Tyr Phe Asp Thr Glu Cys Val Pro					
[0597]		180		185		190
[0598]	Met Asn Phe Arg Asn Ala Ser Gln Ala Lys Arg Leu Met Asn His Tyr					
[0599]		195		200		205
[0600]	Ile Asn Lys Glu Thr Arg Gly Lys Ile Pro Lys Leu Phe Asp Glu Ile					
[0601]		210		215		220
[0602]	Asn Pro Glu Thr Lys Leu Ile Leu Val Asp Tyr Ile Leu Phe Lys Gly					
[0603]		225		230		235
[0604]	Lys Trp Leu Thr Pro Phe Asp Pro Val Phe Thr Glu Val Asp Thr Phe					
[0605]		245		250		255
[0606]	His Leu Asp Lys Tyr Lys Thr Ile Lys Val Pro Met Met Tyr Gly Ala					
[0607]		260		265		270
[0608]	Gly Lys Phe Ala Ser Thr Phe Asp Lys Asn Phe Arg Cys His Val Leu					
[0609]		275		280		285
[0610]	Lys Leu Pro Tyr Gln Gly Asn Ala Thr Met Leu Val Val Leu Met Glu					
[0611]		290		295		300
[0612]	Lys Met Gly Asp His Leu Ala Leu Glu Asp Tyr Leu Thr Thr Asp Leu					
[0613]		305		310		315
[0614]	Val Glu Thr Trp Leu Arg Asn Met Lys Thr Arg Asn Met Glu Val Phe					
[0615]		325		330		335
[0616]	Phe Pro Lys Phe Lys Leu Asp Gln Lys Tyr Glu Met His Glu Leu Leu					
[0617]		340		345		350
[0618]	Arg Gln Met Gly Ile Arg Arg Ile Phe Ser Pro Phe Ala Asp Leu Ser					
[0619]		355		360		365
[0620]	Glu Leu Ser Ala Thr Gly Arg Asn Leu Gln Val Ser Arg Val Leu Gln					
[0621]		370		375		380
[0622]	Arg Thr Val Ile Glu Val Asp Glu Arg Gly Thr Glu Ala Val Ala Gly					
[0623]		385		390		395
						400

[0624]	Ile	Leu	Ser	Glu	Ile	Thr	Ala	Tyr	Ser	Met	Pro	Pro	Val	Ile	Lys	Val
[0625]					405					410					415	
[0626]	Asp	Arg	Pro	Phe	His	Phe	Met	Ile	Tyr	Glu	Glu	Thr	Ser	Gly	Met	Leu
[0627]					420					425					430	
[0628]	Leu	Phe	Leu	Gly	Arg	Val	Val	Asn	Pro	Thr	Leu	Leu				
[0629]					435					440						
[0630]	<210>	11														
[0631]	<211>	398														
[0632]	<212>	PRT														
[0633]	<213>	智人														
[0634]	<400>	11														
[0635]	Met	Asn	Trp	His	Leu	Pro	Leu	Phe	Leu	Leu	Ala	Ser	Val	Thr	Leu	Pro
[0636]	1				5					10					15	
[0637]	Ser	Ile	Cys	Ser	His	Phe	Asn	Pro	Leu	Ser	Leu	Glu	Glu	Leu	Gly	Ser
[0638]					20					25					30	
[0639]	Asn	Thr	Gly	Ile	Gln	Val	Phe	Asn	Gln	Ile	Val	Lys	Ser	Arg	Pro	His
[0640]					35					40					45	
[0641]	Asp	Asn	Ile	Val	Ile	Ser	Pro	His	Gly	Ile	Ala	Ser	Val	Leu	Gly	Met
[0642]					50					55					60	
[0643]	Leu	Gln	Leu	Gly	Ala	Asp	Gly	Arg	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	Met	Val
[0644]	65									70					75	
[0645]	Met	Arg	Tyr	Gly	Val	Asn	Gly	Val	Gly	Lys	Ile	Leu	Lys	Lys	Ile	Asn
[0646]					85					90					95	
[0647]	Lys	Ala	Ile	Val	Ser	Lys	Lys	Asn	Lys	Asp	Ile	Val	Thr	Val	Ala	Asn
[0648]					100					105					110	
[0649]	Ala	Val	Phe	Val	Lys	Asn	Ala	Ser	Glu	Ile	Glu	Val	Pro	Phe	Val	Thr
[0650]					115					120					125	
[0651]	Arg	Asn	Lys	Asp	Val	Phe	Gln	Cys	Glu	Val	Arg	Asn	Val	Asn	Phe	Glu
[0652]					130					135					140	
[0653]	Asp	Pro	Ala	Ser	Ala	Cys	Asp	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Val	Lys	Asn	Glu
[0654]	145									150					155	
[0655]	Thr	Arg	Asp	Met	Ile	Asp	Asn	Leu	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ile	Asp	Gly
[0656]					165					170					175	
[0657]	Val	Leu	Thr	Arg	Leu	Val	Leu	Val	Asn	Ala	Val	Tyr	Phe	Lys	Gly	Leu
[0658]					180					185					190	
[0659]	Trp	Lys	Ser	Arg	Phe	Gln	Pro	Glu	Asn	Thr	Lys	Lys	Arg	Thr	Phe	Val
[0660]					195					200					205	
[0661]	Ala	Ala	Asp	Gly	Lys	Ser	Tyr	Gln	Val	Pro	Met	Leu	Ala	Gln	Leu	Ser
[0662]					210					215					220	

[0663]	Val Phe Arg Cys Gly Ser Thr Ser Ala Pro Asn Asp Leu Trp Tyr Asn
[0664]	225 230 235 240
[0665]	Phe Ile Glu Leu Pro Tyr His Gly Glu Ser Ile Ser Met Leu Ile Ala
[0666]	245 250 255
[0667]	Leu Pro Thr Glu Ser Ser Thr Pro Leu Ser Ala Ile Ile Pro His Ile
[0668]	260 265 270
[0669]	Ser Thr Lys Thr Ile Asp Ser Trp Met Ser Ile Met Val Pro Lys Arg
[0670]	275 280 285
[0671]	Val Gln Val Ile Leu Pro Lys Phe Thr Ala Val Ala Gln Thr Asp Leu
[0672]	290 295 300
[0673]	Lys Glu Pro Leu Lys Val Leu Gly Ile Thr Asp Met Phe Asp Ser Ser
[0674]	305 310 315 320
[0675]	Lys Ala Asn Phe Ala Lys Ile Thr Thr Gly Ser Glu Asn Leu His Val
[0676]	325 330 335
[0677]	Ser His Ile Leu Gln Lys Ala Lys Ile Glu Val Ser Glu Asp Gly Thr
[0678]	340 345 350
[0679]	Lys Ala Ser Ala Ala Thr Thr Ala Ile Leu Ile Ala Arg Ser Ser Pro
[0680]	355 360 365
[0681]	Pro Trp Phe Ile Val Asp Arg Pro Phe Leu Phe Phe Ile Arg His Asn
[0682]	370 375 380
[0683]	Pro Thr Gly Ala Val Leu Phe Met Gly Gln Ile Asn Lys Pro
[0684]	385 390 395
[0685]	<210> 12
[0686]	<211> 418
[0687]	<212> PRT
[0688]	<213> 人工序列
[0689]	<220>
[0690]	<223> 合成的序列: α 1AT骨架中的修饰的丝氨酸蛋白酶抑制剂
[0691]	<400> 12
[0692]	Met Pro Ser Ser Val Ser Trp Gly Ile Leu Leu Leu Ala Gly Leu Cys
[0693]	1 5 10 15
[0694]	Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
[0695]	20 25 30
[0696]	Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
[0697]	35 40 45
[0698]	Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
[0699]	50 55 60
[0700]	Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
[0701]	65 70 75 80

[0702]	Ile	Ala	Thr	Ala	Phe	Ala	Met	Leu	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Ala	Asp	Thr
[0703]					85					90					95	
[0704]	His	Asp	Glu	Ile	Leu	Glu	Gly	Leu	Asn	Phe	Asn	Leu	Thr	Glu	Ile	Pro
[0705]					100					105					110	
[0706]	Glu	Ala	Gln	Ile	His	Glu	Gly	Phe	Gln	Glu	Leu	Leu	Arg	Thr	Leu	Asn
[0707]					115					120					125	
[0708]	Gln	Pro	Asp	Ser	Gln	Leu	Gln	Leu	Thr	Thr	Gly	Asn	Gly	Leu	Phe	Leu
[0709]					130					135					140	
[0710]	Ser	Glu	Gly	Leu	Lys	Leu	Val	Asp	Lys	Phe	Leu	Glu	Asp	Val	Lys	Lys
[0711]					145					150					155	
[0712]	Leu	Tyr	His	Ser	Glu	Ala	Phe	Thr	Val	Asn	Phe	Gly	Asp	Thr	Glu	Glu
[0713]					165					170					175	
[0714]	Ala	Lys	Lys	Gln	Ile	Asn	Asp	Tyr	Val	Glu	Lys	Gly	Thr	Gln	Gly	Lys
[0715]					180					185					190	
[0716]	Ile	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Phe	Ala	Leu
[0717]					195					200					205	
[0718]	Val	Asn	Tyr	Ile	Phe	Phe	Lys	Gly	Lys	Trp	Glu	Arg	Pro	Phe	Glu	Val
[0719]					210					215					220	
[0720]	Lys	Asp	Thr	Glu	Glu	Glu	Asp	Phe	His	Val	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Val
[0721]					225					230					235	
[0722]	Lys	Val	Pro	Met	Met	Lys	Arg	Leu	Gly	Met	Phe	Asn	Ile	Gln	His	Cys
[0723]					245					250					255	
[0724]	Lys	Lys	Leu	Ser	Ser	Trp	Val	Leu	Leu	Met	Lys	Tyr	Leu	Gly	Asn	Ala
[0725]					260					265					270	
[0726]	Thr	Ala	Ile	Phe	Phe	Leu	Pro	Asp	Glu	Gly	Lys	Leu	Gln	His	Leu	Glu
[0727]					275					280					285	
[0728]	Asn	Glu	Leu	Thr	His	Asp	Ile	Ile	Thr	Lys	Phe	Leu	Glu	Asn	Glu	Asp
[0729]					290					295					300	
[0730]	Arg	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	His	Leu	Pro	Lys	Leu	Ser	Ile	Thr	Gly	Thr
[0731]					305					310					315	
[0732]	Tyr	Asp	Leu	Lys	Ser	Val	Leu	Gly	Gln	Leu	Gly	Ile	Thr	Lys	Val	Phe
[0733]					325					330					335	
[0734]	Ser	Asn	Gly	Ala	Asp	Leu	Ser	Gly	Val	Thr	Glu	Glu	Ala	Pro	Leu	Lys
[0735]					340					345					350	
[0736]	Leu	Ser	Lys	Ala	Val	His	Lys	Ala	Val	Leu	Thr	Ile	Asp	Glu	Lys	Gly
[0737]					355					360					365	
[0738]	Thr	Glu	Ala	Ala	Gly	Ala	Met	Phe	Leu	Glu	Ala	Ile	Lys	Arg	Lys	Ile
[0739]					370					375					380	
[0740]	Pro	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Lys	Pro	Phe	Val	Phe	Leu	Met	Ile	Glu

[0741]	385	390	395	400
[0742]	Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr			
[0743]		405	410	415
[0744]	Gln Lys			
[0745]	<210> 13			
[0746]	<211> 10			
[0747]	<212> PRT			
[0748]	<213> 人工序列			
[0749]	<220>			
[0750]	<223> 合成的亲和标签			
[0751]	<400> 13			
[0752]	Met Arg Gly Ser His His His His His His			
[0753]	1	5	10	
[0754]	<210> 14			
[0755]	<211> 8			
[0756]	<212> PRT			
[0757]	<213> 人工序列			
[0758]	<220>			
[0759]	<223> 合成的亲和标签			
[0760]	<400> 14			
[0761]	Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys			
[0762]	1	5		
[0763]	<210> 15			
[0764]	<211> 15			
[0765]	<212> PRT			
[0766]	<213> 人工序列			
[0767]	<220>			
[0768]	<223> 合成的亲和标签			
[0769]	<400> 15			
[0770]	Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Arg Gln His Met Asp Ser			
[0771]	1	5	10	15
[0772]	<210> 16			
[0773]	<211> 5			
[0774]	<212> PRT			
[0775]	<213> 人工序列			
[0776]	<220>			
[0777]	<223> 合成的亲和标签			
[0778]	<400> 16			
[0779]	Arg Arg Arg Arg Arg			

[0780]	1	5
[0781]	<210>	17
[0782]	<211>	6
[0783]	<212>	PRT
[0784]	<213>	人工序列
[0785]	<220>	
[0786]	<223>	合成的亲和标签
[0787]	<400>	17
[0788]	Arg Arg Arg Arg Arg Arg	
[0789]	1	5
[0790]	<210>	18
[0791]	<211>	4
[0792]	<212>	PRT
[0793]	<213>	人工序列
[0794]	<220>	
[0795]	<223>	合成的亲和标签
[0796]	<400>	18
[0797]	His His His His	
[0798]	1	
[0799]	<210>	19
[0800]	<211>	5
[0801]	<212>	PRT
[0802]	<213>	人工序列
[0803]	<220>	
[0804]	<223>	合成的亲和标签
[0805]	<400>	19
[0806]	His His His His His	
[0807]	1	5
[0808]	<210>	20
[0809]	<211>	6
[0810]	<212>	PRT
[0811]	<213>	人工序列
[0812]	<220>	
[0813]	<223>	合成的亲和标签
[0814]	<400>	20
[0815]	His His His His His His	
[0816]	1	5
[0817]	<210>	21
[0818]	<211>	7

[0819]	<212>	PRT
[0820]	<213>	人工序列
[0821]	<220>	
[0822]	<223>	合成的亲和标签
[0823]	<400>	21
[0824]	His His His His His His His	
[0825]	1	5
[0826]	<210>	22
[0827]	<211>	8
[0828]	<212>	PRT
[0829]	<213>	人工序列
[0830]	<220>	
[0831]	<223>	合成的亲和标签
[0832]	<400>	22
[0833]	His His His His His His His His	
[0834]	1	5
[0835]	<210>	23
[0836]	<211>	9
[0837]	<212>	PRT
[0838]	<213>	人工序列
[0839]	<220>	
[0840]	<223>	合成的亲和标签
[0841]	<400>	23
[0842]	His His His His His His His His His	
[0843]	1	5
[0844]	<210>	24
[0845]	<211>	10
[0846]	<212>	PRT
[0847]	<213>	人工序列
[0848]	<220>	
[0849]	<223>	合成的亲和标签
[0850]	<400>	24
[0851]	His His His His His His His His His His	
[0852]	1	5 10
[0853]	<210>	25
[0854]	<211>	4
[0855]	<212>	PRT
[0856]	<213>	人工序列
[0857]	<220>	

[0858]	<223>	合成的亲和标签
[0859]	<400>	25
[0860]	Cys Cys Cys Cys	
[0861]	1	
[0862]	<210>	26
[0863]	<211>	11
[0864]	<212>	PRT
[0865]	<213>	人工序列
[0866]	<220>	
[0867]	<223>	合成的亲和标签
[0868]	<400>	26
[0869]	Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe Phe	
[0870]	1	5 10
[0871]	<210>	27
[0872]	<211>	5
[0873]	<212>	PRT
[0874]	<213>	人工序列
[0875]	<220>	
[0876]	<223>	合成的亲和标签
[0877]	<400>	27
[0878]	Asp Asp Asp Asp Asp	
[0879]	1	5
[0880]	<210>	28
[0881]	<211>	6
[0882]	<212>	PRT
[0883]	<213>	人工序列
[0884]	<220>	
[0885]	<223>	合成的亲和标签
[0886]	<400>	28
[0887]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0888]	1	5
[0889]	<210>	29
[0890]	<211>	7
[0891]	<212>	PRT
[0892]	<213>	人工序列
[0893]	<220>	
[0894]	<223>	合成的亲和标签
[0895]	<400>	29
[0896]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	

[0897]	1	5	
[0898]	<210>	30	
[0899]	<211>	8	
[0900]	<212>	PRT	
[0901]	<213>	人工序列	
[0902]	<220>		
[0903]	<223>	合成的亲和标签	
[0904]	<400>	30	
[0905]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
[0906]	1	5	
[0907]	<210>	31	
[0908]	<211>	9	
[0909]	<212>	PRT	
[0910]	<213>	人工序列	
[0911]	<220>		
[0912]	<223>	合成的亲和标签	
[0913]	<400>	31	
[0914]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
[0915]	1	5	
[0916]	<210>	32	
[0917]	<211>	10	
[0918]	<212>	PRT	
[0919]	<213>	人工序列	
[0920]	<220>		
[0921]	<223>	合成的亲和标签	
[0922]	<400>	32	
[0923]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
[0924]	1	5	10
[0925]	<210>	33	
[0926]	<211>	11	
[0927]	<212>	PRT	
[0928]	<213>	人工序列	
[0929]	<220>		
[0930]	<223>	合成的亲和标签	
[0931]	<400>	33	
[0932]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp		
[0933]	1	5	10
[0934]	<210>	34	
[0935]	<211>	12	

[0936]	<212>	PRT
[0937]	<213>	人工序列
[0938]	<220>	
[0939]	<223>	合成的亲和标签
[0940]	<400>	34
[0941]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0942]	1	5 10
[0943]	<210>	35
[0944]	<211>	13
[0945]	<212>	PRT
[0946]	<213>	人工序列
[0947]	<220>	
[0948]	<223>	合成的亲和标签
[0949]	<400>	35
[0950]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0951]	1	5 10
[0952]	<210>	36
[0953]	<211>	14
[0954]	<212>	PRT
[0955]	<213>	人工序列
[0956]	<220>	
[0957]	<223>	合成的亲和标签
[0958]	<400>	36
[0959]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0960]	1	5 10
[0961]	<210>	37
[0962]	<211>	15
[0963]	<212>	PRT
[0964]	<213>	人工序列
[0965]	<220>	
[0966]	<223>	合成的亲和标签
[0967]	<400>	37
[0968]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0969]	1	5 10 15
[0970]	<210>	38
[0971]	<211>	16
[0972]	<212>	PRT
[0973]	<213>	人工序列
[0974]	<220>	

[0975]	<223>	合成的亲和标签
[0976]	<400>	38
[0977]	Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp	
[0978]	1	5 10 15
[0979]	<210>	39
[0980]	<211>	8
[0981]	<212>	PRT
[0982]	<213>	人工序列
[0983]	<220>	
[0984]	<223>	合成的亲和标签
[0985]	<400>	39
[0986]	Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys	
[0987]	1	5
[0988]	<210>	40
[0989]	<211>	10
[0990]	<212>	PRT
[0991]	<213>	人工序列
[0992]	<220>	
[0993]	<223>	合成的亲和标签
[0994]	<400>	40
[0995]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu	
[0996]	1	5 10
[0997]	<210>	41
[0998]	<211>	12
[0999]	<212>	PRT
[1000]	<213>	人工序列
[1001]	<220>	
[1002]	<223>	合成的亲和标签
[1003]	<400>	41
[1004]	Met Lys Ala Glu Phe Arg Arg Gln Glu Ser Asp Arg	
[1005]	1	5 10
[1006]	<210>	42
[1007]	<211>	12
[1008]	<212>	PRT
[1009]	<213>	人工序列
[1010]	<220>	
[1011]	<223>	合成的亲和标签
[1012]	<400>	42
[1013]	Met Arg Asp Ala Leu Asp Arg Leu Asp Arg Leu Ala	

[1014]	1	5	10
[1015]	<210>	43	
[1016]	<211>	10	
[1017]	<212>	PRT	
[1018]	<213>	智人	
[1019]	<400>	43	
[1020]	Thr Ile Phe Thr Phe Arg Ser Ala Arg Leu		
[1021]	1	5	10
[1022]	<210>	44	
[1023]	<211>	10	
[1024]	<212>	PRT	
[1025]	<213>	人工序列	
[1026]	<220>		
[1027]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列	
[1028]	<400>	44	
[1029]	Thr Ile Phe Thr Lys Arg Lys Ala Arg Leu		
[1030]	1	5	10
[1031]	<210>	45	
[1032]	<211>	10	
[1033]	<212>	PRT	
[1034]	<213>	人工序列	
[1035]	<220>		
[1036]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列	
[1037]	<400>	45	
[1038]	Thr Ile Ser Thr His Arg Arg Ala Arg Leu		
[1039]	1	5	10
[1040]	<210>	46	
[1041]	<211>	10	
[1042]	<212>	PRT	
[1043]	<213>	人工序列	
[1044]	<220>		
[1045]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列	
[1046]	<400>	46	
[1047]	Thr Ile Arg Thr Gln Arg Val Ala Arg Leu		
[1048]	1	5	10
[1049]	<210>	47	
[1050]	<211>	10	
[1051]	<212>	PRT	
[1052]	<213>	人工序列	

[1053]	<220>
[1054]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1055]	<400> 47
[1056]	Thr Ile Thr Thr Leu Arg Tyr Ala Arg Leu
[1057]	1 5 10
[1058]	<210> 48
[1059]	<211> 10
[1060]	<212> PRT
[1061]	<213> 人工序列
[1062]	<220>
[1063]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1064]	<400> 48
[1065]	Thr Ile Gln Thr Arg Arg Asn Ala Arg Leu
[1066]	1 5 10
[1067]	<210> 49
[1068]	<211> 10
[1069]	<212> PRT
[1070]	<213> 人工序列
[1071]	<220>
[1072]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1073]	<400> 49
[1074]	Thr Ile Ala Thr Gln Arg Tyr Ala Arg Leu
[1075]	1 5 10
[1076]	<210> 50
[1077]	<211> 10
[1078]	<212> PRT
[1079]	<213> 人工序列
[1080]	<220>
[1081]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1082]	<400> 50
[1083]	Thr Ile Ser Thr Leu Arg Lys Ala Arg Leu
[1084]	1 5 10
[1085]	<210> 51
[1086]	<211> 10
[1087]	<212> PRT
[1088]	<213> 人工序列
[1089]	<220>
[1090]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1091]	<400> 51

[1092]	Thr Ile Phe Thr Phe Arg Arg Ala Arg Leu
[1093]	1 5 10
[1094]	<210> 52
[1095]	<211> 10
[1096]	<212> PRT
[1097]	<213> 人工序列
[1098]	<220>
[1099]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1100]	<400> 52
[1101]	Thr Ile Val Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu
[1102]	1 5 10
[1103]	<210> 53
[1104]	<211> 10
[1105]	<212> PRT
[1106]	<213> 人工序列
[1107]	<220>
[1108]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1109]	<400> 53
[1110]	Thr Ile Phe Thr Arg Arg Lys Ala Arg Leu
[1111]	1 5 10
[1112]	<210> 54
[1113]	<211> 10
[1114]	<212> PRT
[1115]	<213> 人工序列
[1116]	<220>
[1117]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1118]	<400> 54
[1119]	Thr Ile Cys Thr Leu Arg Lys Ala Arg Leu
[1120]	1 5 10
[1121]	<210> 55
[1122]	<211> 10
[1123]	<212> PRT
[1124]	<213> 人工序列
[1125]	<220>
[1126]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1127]	<400> 55
[1128]	Thr Ile Trp Thr Trp Arg Asn Ala Arg Leu
[1129]	1 5 10
[1130]	<210> 56

[1131]	<211>	10
[1132]	<212>	PRT
[1133]	<213>	人工序列
[1134]	<220>	
[1135]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1136]	<400>	56
[1137]	Thr Ile Lys Thr Asp Arg Met Ala Arg Leu	
[1138]	1	5 10
[1139]	<210>	57
[1140]	<211>	10
[1141]	<212>	PRT
[1142]	<213>	人工序列
[1143]	<220>	
[1144]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1145]	<400>	57
[1146]	Thr Ile Phe Thr Val Arg Lys Ala Arg Leu	
[1147]	1	5 10
[1148]	<210>	58
[1149]	<211>	10
[1150]	<212>	PRT
[1151]	<213>	人工序列
[1152]	<220>	
[1153]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1154]	<400>	58
[1155]	Thr Ile Arg Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu	
[1156]	1	5 10
[1157]	<210>	59
[1158]	<211>	10
[1159]	<212>	PRT
[1160]	<213>	人工序列
[1161]	<220>	
[1162]	<223>	合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1163]	<400>	59
[1164]	Thr Ile Gly Thr Ile Arg Arg Ala Arg Leu	
[1165]	1	5 10
[1166]	<210>	60
[1167]	<211>	10
[1168]	<212>	PRT
[1169]	<213>	人工序列

[1170]	<220>
[1171]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1172]	<400> 60
[1173]	Thr Ile Lys Thr Arg Arg His Ala Arg Leu
[1174]	1 5 10
[1175]	<210> 61
[1176]	<211> 10
[1177]	<212> PRT
[1178]	<213> 人工序列
[1179]	<220>
[1180]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1181]	<400> 61
[1182]	Thr Ile Thr Thr Arg Arg Val Ala Arg Leu
[1183]	1 5 10
[1184]	<210> 62
[1185]	<211> 10
[1186]	<212> PRT
[1187]	<213> 人工序列
[1188]	<220>
[1189]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1190]	<400> 62
[1191]	Thr Ile Leu Thr Arg Arg Ile Ala Arg Leu
[1192]	1 5 10
[1193]	<210> 63
[1194]	<211> 10
[1195]	<212> PRT
[1196]	<213> 人工序列
[1197]	<220>
[1198]	<223> 合成的序列:PCI变体的RCL序列
[1199]	<400> 63
[1200]	Thr Ile His Thr Arg Arg Val Ala Arg Leu
[1201]	1 5 10
[1202]	<210> 64
[1203]	<211> 10
[1204]	<212> PRT
[1205]	<213> 智人
[1206]	<400> 64
[1207]	Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile Pro Pro
[1208]	1 5 10

[1209]	<210>	65
[1210]	<211>	10
[1211]	<212>	PRT
[1212]	<213>	人工序列
[1213]	<220>	
[1214]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1215]	<400>	65
[1216]	Leu Glu Ala Ile Pro Arg Ser Ile Pro Pro	
[1217]	1	5 10
[1218]	<210>	66
[1219]	<211>	10
[1220]	<212>	PRT
[1221]	<213>	人工序列
[1222]	<220>	
[1223]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1224]	<400>	66
[1225]	Leu Glu Ala Ile Lys Arg Ser Ile Pro Pro	
[1226]	1	5 10
[1227]	<210>	67
[1228]	<211>	10
[1229]	<212>	PRT
[1230]	<213>	人工序列
[1231]	<220>	
[1232]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1233]	<400>	67
[1234]	Leu Glu Ala Ile Arg Arg Ser Ile Pro Pro	
[1235]	1	5 10
[1236]	<210>	68
[1237]	<211>	10
[1238]	<212>	PRT
[1239]	<213>	人工序列
[1240]	<220>	
[1241]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1242]	<400>	68
[1243]	Leu Glu Ala Ile Pro Arg Glu Ile Pro Pro	
[1244]	1	5 10
[1245]	<210>	69
[1246]	<211>	10
[1247]	<212>	PRT

[1248]	<213>	人工序列
[1249]	<220>	
[1250]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1251]	<400>	69
[1252]	Leu Glu Ala Ile Pro Arg Arg Ile Pro Pro	
[1253]	1	5 10
[1254]	<210>	70
[1255]	<211>	10
[1256]	<212>	PRT
[1257]	<213>	人工序列
[1258]	<220>	
[1259]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1260]	<400>	70
[1261]	Leu Glu Ala Ile Pro Arg Lys Ile Pro Pro	
[1262]	1	5 10
[1263]	<210>	71
[1264]	<211>	10
[1265]	<212>	PRT
[1266]	<213>	人工序列
[1267]	<220>	
[1268]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1269]	<400>	71
[1270]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg Asn Ile Pro Pro	
[1271]	1	5 10
[1272]	<210>	72
[1273]	<211>	10
[1274]	<212>	PRT
[1275]	<213>	人工序列
[1276]	<220>	
[1277]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1278]	<400>	72
[1279]	Leu Glu Ala Ile Gln Arg Lys Ile Pro Pro	
[1280]	1	5 10
[1281]	<210>	73
[1282]	<211>	10
[1283]	<212>	PRT
[1284]	<213>	人工序列
[1285]	<220>	
[1286]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列

[1287]	<400>	73
[1288]	Leu Glu Ala Ile Arg Arg Ala Ile Pro Pro	
[1289]	1	5 10
[1290]	<210>	74
[1291]	<211>	10
[1292]	<212>	PRT
[1293]	<213>	人工序列
[1294]	<220>	
[1295]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1296]	<400>	74
[1297]	Leu Glu Ala Ile Ser Arg Arg Ile Pro Pro	
[1298]	1	5 10
[1299]	<210>	75
[1300]	<211>	10
[1301]	<212>	PRT
[1302]	<213>	人工序列
[1303]	<220>	
[1304]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1305]	<400>	75
[1306]	Leu Glu Ala Ile Lys Arg Asn Ile Pro Pro	
[1307]	1	5 10
[1308]	<210>	76
[1309]	<211>	10
[1310]	<212>	PRT
[1311]	<213>	人工序列
[1312]	<220>	
[1313]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1314]	<400>	76
[1315]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg Tyr Ile Pro Pro	
[1316]	1	5 10
[1317]	<210>	77
[1318]	<211>	10
[1319]	<212>	PRT
[1320]	<213>	人工序列
[1321]	<220>	
[1322]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1323]	<400>	77
[1324]	Leu Glu Ala Ile Arg Arg His Ile Pro Pro	
[1325]	1	5 10

[1326]	<210>	78
[1327]	<211>	10
[1328]	<212>	PRT
[1329]	<213>	人工序列
[1330]	<220>	
[1331]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1332]	<400>	78
[1333]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg Arg Ile Pro Pro	
[1334]	1	5 10
[1335]	<210>	79
[1336]	<211>	10
[1337]	<212>	PRT
[1338]	<213>	人工序列
[1339]	<220>	
[1340]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1341]	<400>	79
[1342]	Leu Glu Ala Ile Val Arg Arg Ile Pro Pro	
[1343]	1	5 10
[1344]	<210>	80
[1345]	<211>	10
[1346]	<212>	PRT
[1347]	<213>	人工序列
[1348]	<220>	
[1349]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1350]	<400>	80
[1351]	Leu Glu Ala Ile Arg Arg Cys Ile Pro Pro	
[1352]	1	5 10
[1353]	<210>	81
[1354]	<211>	10
[1355]	<212>	PRT
[1356]	<213>	人工序列
[1357]	<220>	
[1358]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1359]	<400>	81
[1360]	Leu Glu Ala Ile Lys Arg His Ile Pro Pro	
[1361]	1	5 10
[1362]	<210>	82
[1363]	<211>	10
[1364]	<212>	PRT

[1365]	<213>	人工序列
[1366]	<220>	
[1367]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1368]	<400>	82
[1369]	Leu Glu Ala Ile Tyr Arg Arg Ile Pro Pro	
[1370]	1	5 10
[1371]	<210>	83
[1372]	<211>	10
[1373]	<212>	PRT
[1374]	<213>	人工序列
[1375]	<220>	
[1376]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1377]	<400>	83
[1378]	Leu Glu Ala Ile Ala Arg Arg Ile Pro Pro	
[1379]	1	5 10
[1380]	<210>	84
[1381]	<211>	10
[1382]	<212>	PRT
[1383]	<213>	人工序列
[1384]	<220>	
[1385]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1386]	<400>	84
[1387]	Leu Glu Ala Ile Cys Arg Lys Ile Pro Pro	
[1388]	1	5 10
[1389]	<210>	85
[1390]	<211>	10
[1391]	<212>	PRT
[1392]	<213>	人工序列
[1393]	<220>	
[1394]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1395]	<400>	85
[1396]	Leu Glu Ala Ile Trp Arg Asn Ile Pro Pro	
[1397]	1	5 10
[1398]	<210>	86
[1399]	<211>	10
[1400]	<212>	PRT
[1401]	<213>	人工序列
[1402]	<220>	
[1403]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列

[1404]	<400>	86
[1405]	Leu Glu Ala Ile Ser Arg Arg Ile Pro Pro	
[1406]	1	5 10
[1407]	<210>	87
[1408]	<211>	10
[1409]	<212>	PRT
[1410]	<213>	人工序列
[1411]	<220>	
[1412]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1413]	<400>	87
[1414]	Leu Glu Ala Ile His Arg Asn Ile Pro Pro	
[1415]	1	5 10
[1416]	<210>	88
[1417]	<211>	10
[1418]	<212>	PRT
[1419]	<213>	人工序列
[1420]	<220>	
[1421]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1422]	<400>	88
[1423]	Leu Glu Ala Ile Arg Arg Asn Ile Pro Pro	
[1424]	1	5 10
[1425]	<210>	89
[1426]	<211>	10
[1427]	<212>	PRT
[1428]	<213>	人工序列
[1429]	<220>	
[1430]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1431]	<400>	89
[1432]	Leu Glu Ala Ile Pro Arg Lys Ile Pro Pro	
[1433]	1	5 10
[1434]	<210>	90
[1435]	<211>	10
[1436]	<212>	PRT
[1437]	<213>	人工序列
[1438]	<220>	
[1439]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1440]	<400>	90
[1441]	Leu Glu Ala Ile Asn Arg Asn Ile Pro Pro	
[1442]	1	5 10

[1443]	<210>	91
[1444]	<211>	10
[1445]	<212>	PRT
[1446]	<213>	人工序列
[1447]	<220>	
[1448]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1449]	<400>	91
[1450]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg Met Ile Pro Pro	
[1451]	1	5 10
[1452]	<210>	92
[1453]	<211>	10
[1454]	<212>	PRT
[1455]	<213>	人工序列
[1456]	<220>	
[1457]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1458]	<400>	92
[1459]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg His Ile Pro Pro	
[1460]	1	5 10
[1461]	<210>	93
[1462]	<211>	10
[1463]	<212>	PRT
[1464]	<213>	人工序列
[1465]	<220>	
[1466]	<223>	合成的序列: α 1 AT变体的RCL序列
[1467]	<400>	93
[1468]	Leu Glu Ala Ile Thr Arg Gln Ile Pro Pro	
[1469]	1	5 10

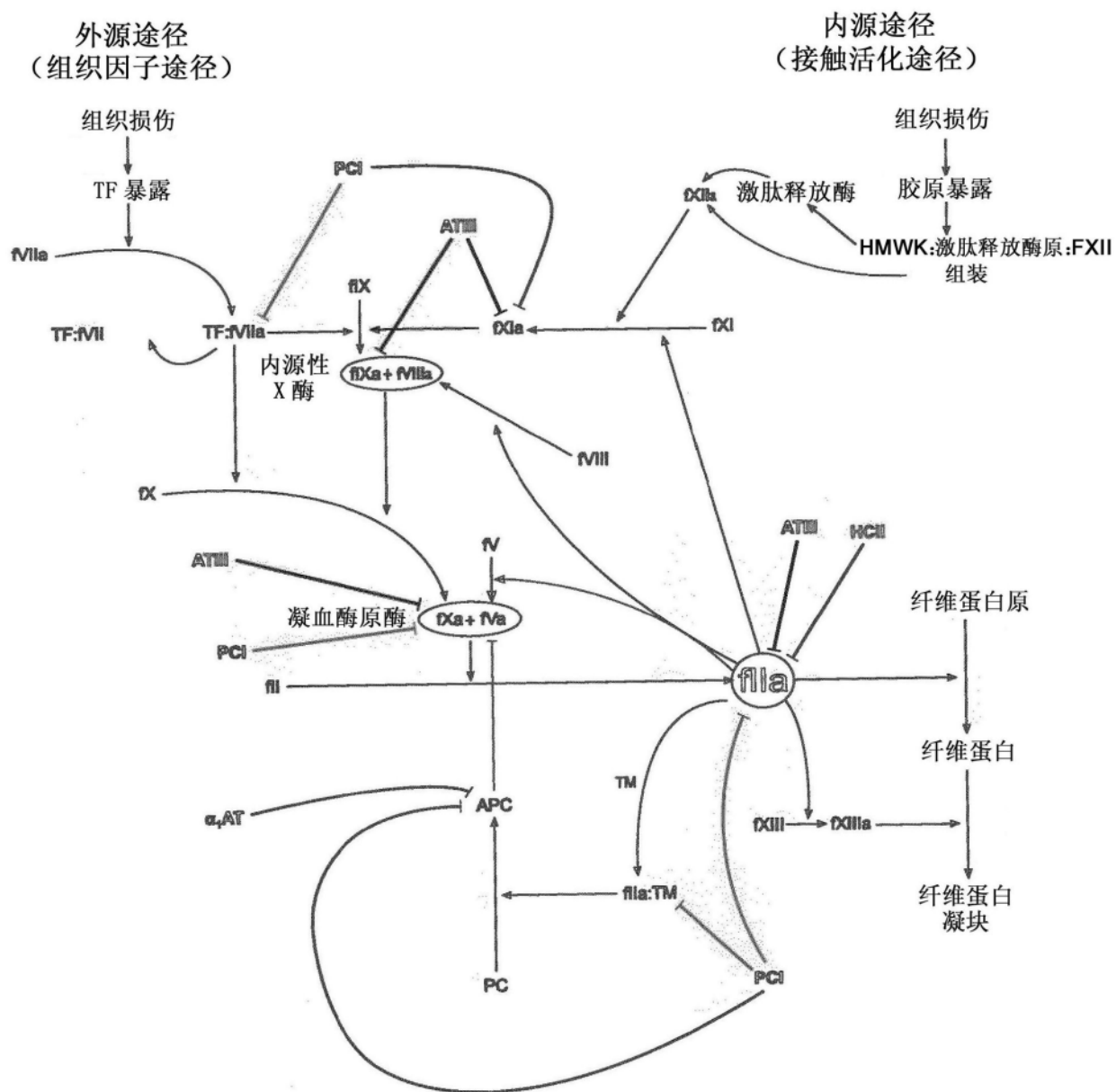


图1

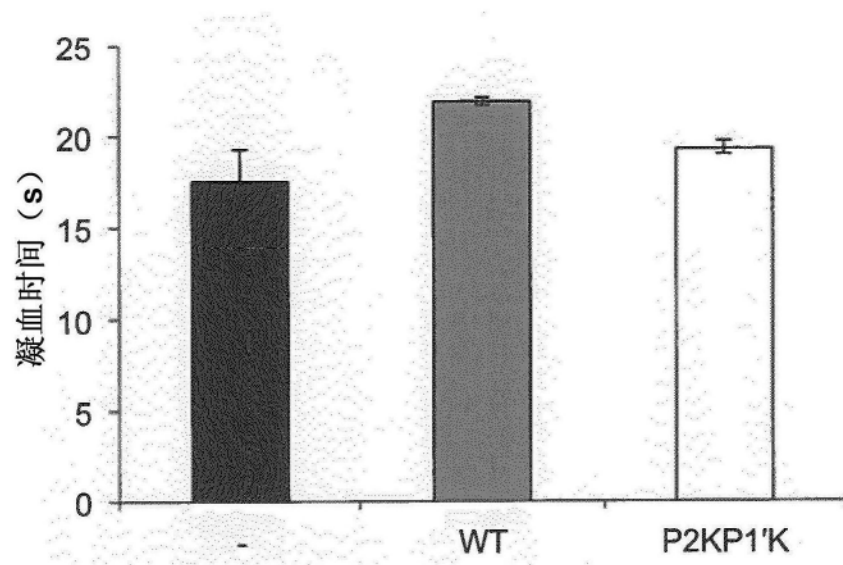


图2

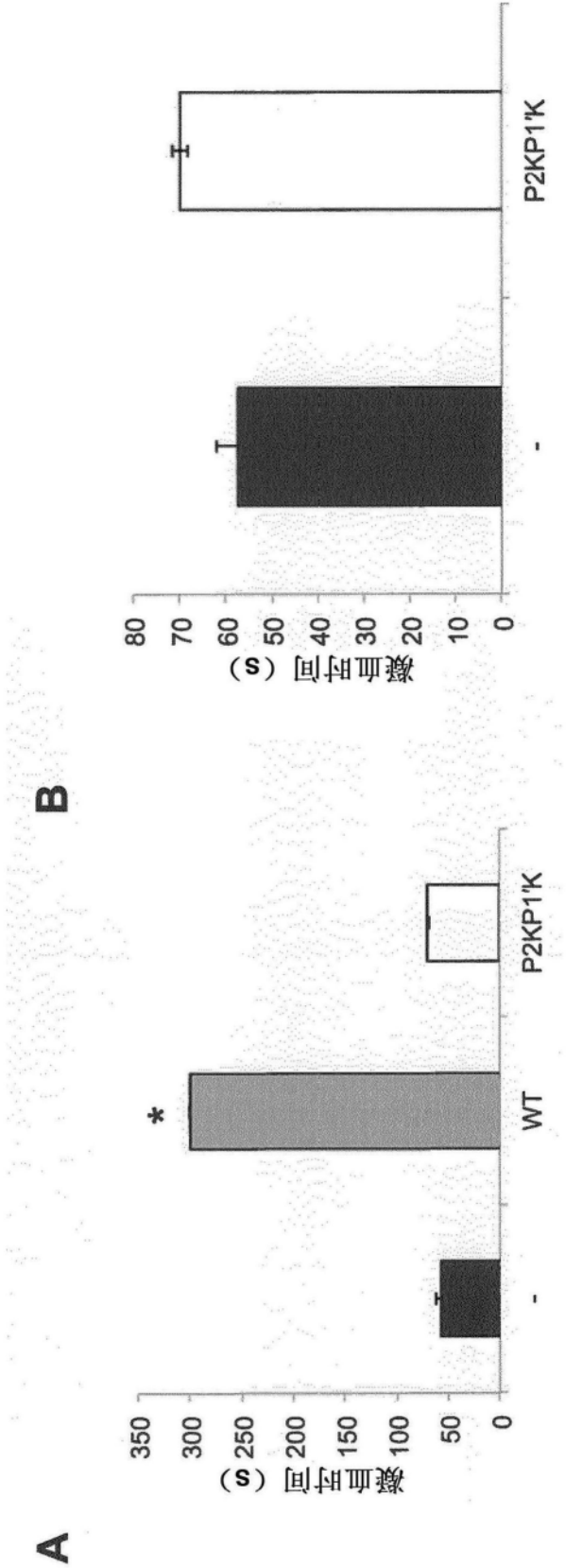


图3

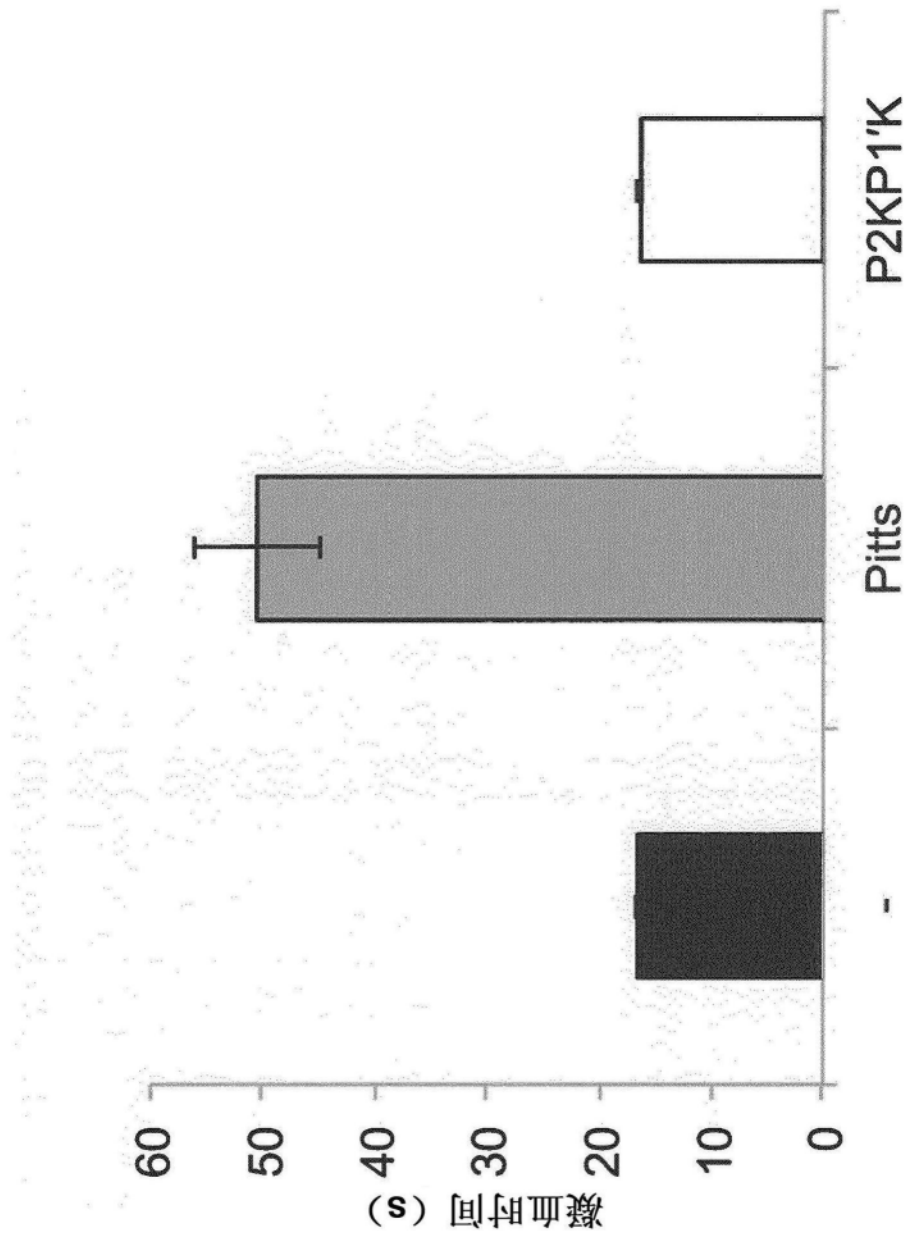


图4

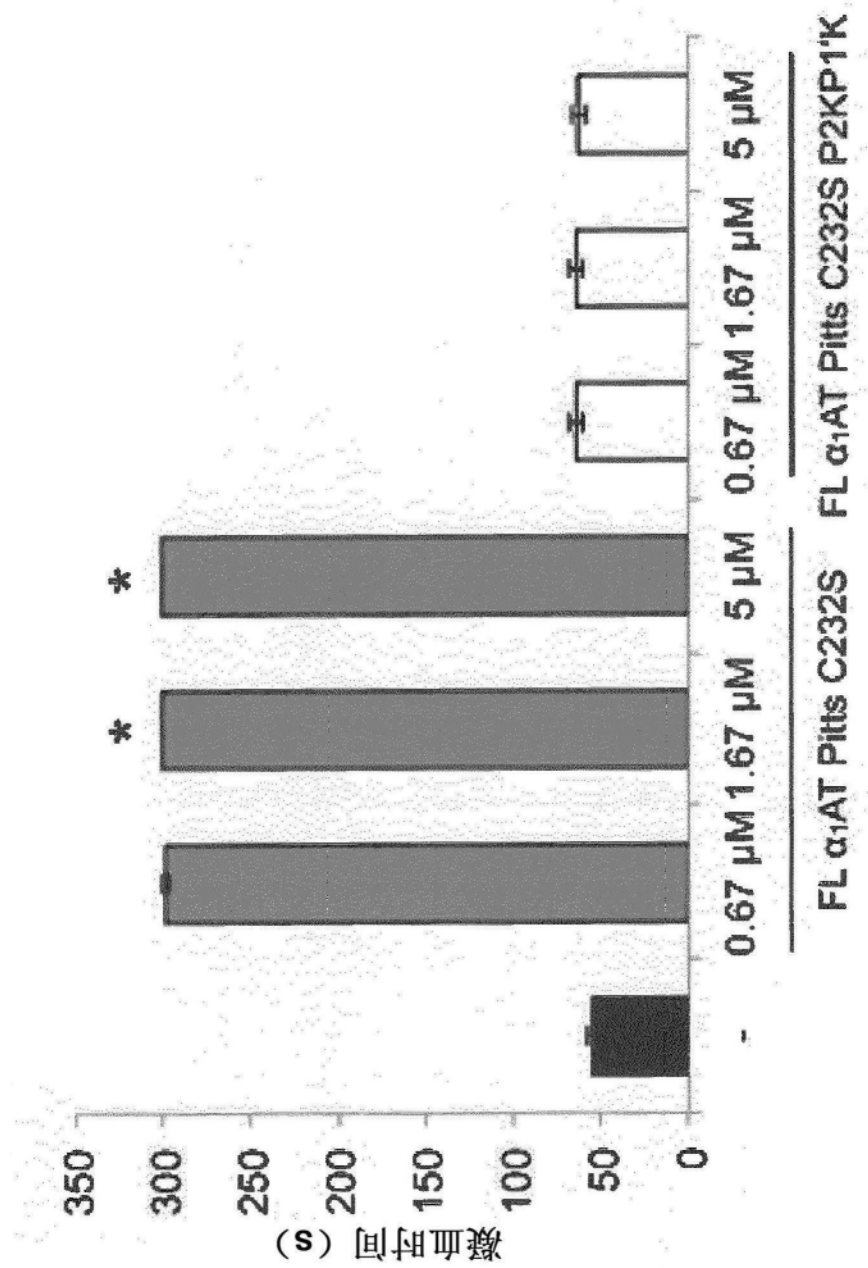


图5A

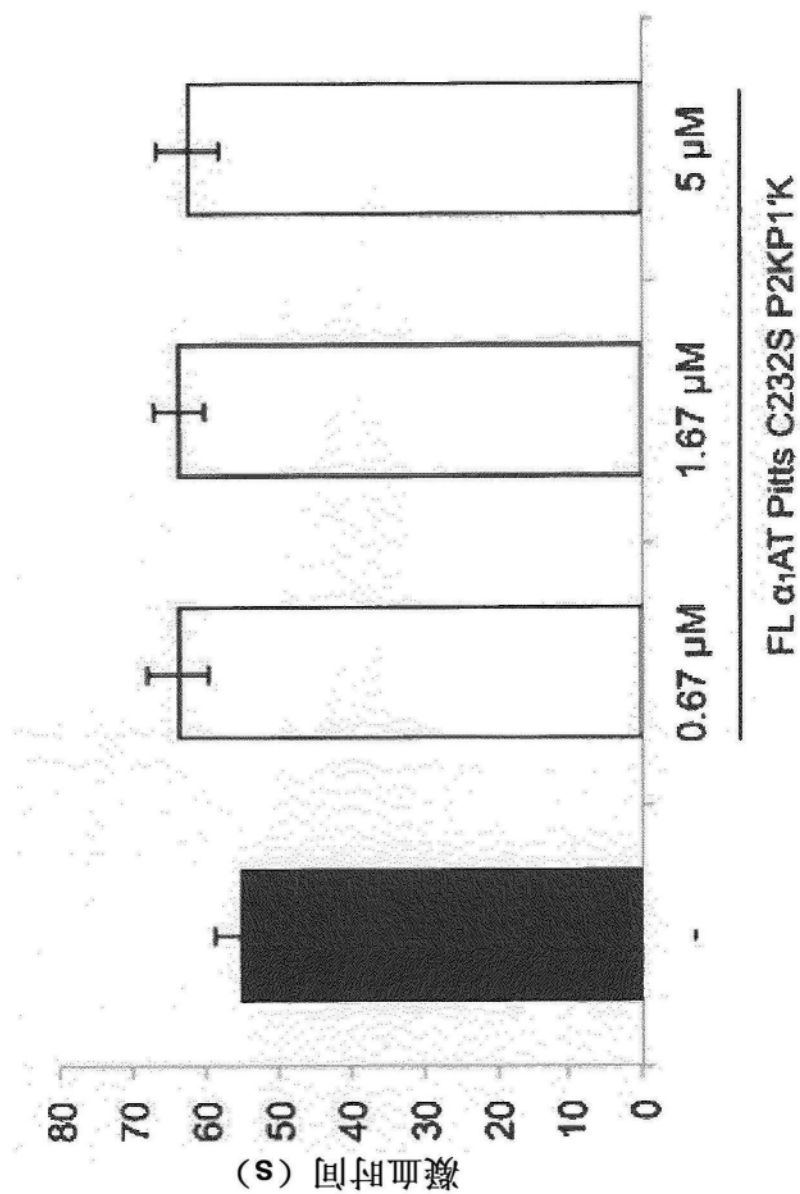


图5B

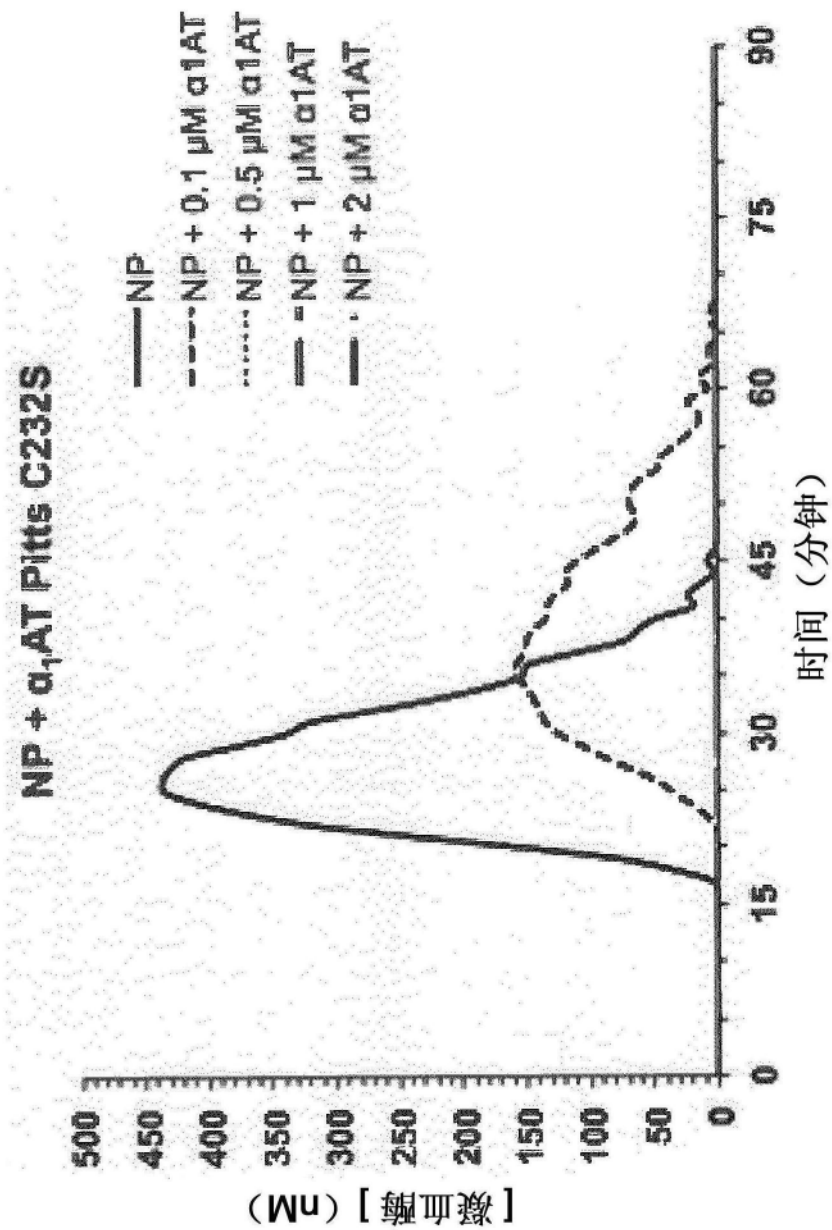


图6A

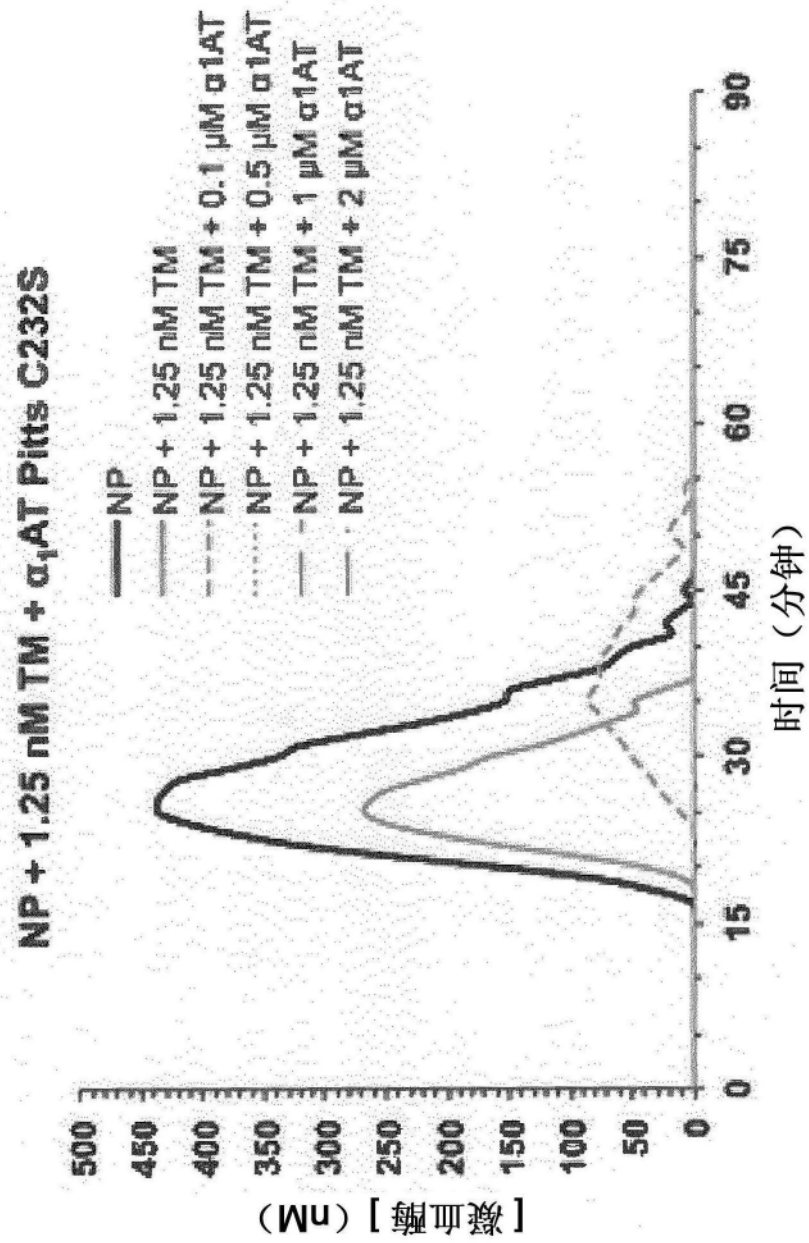


图6B

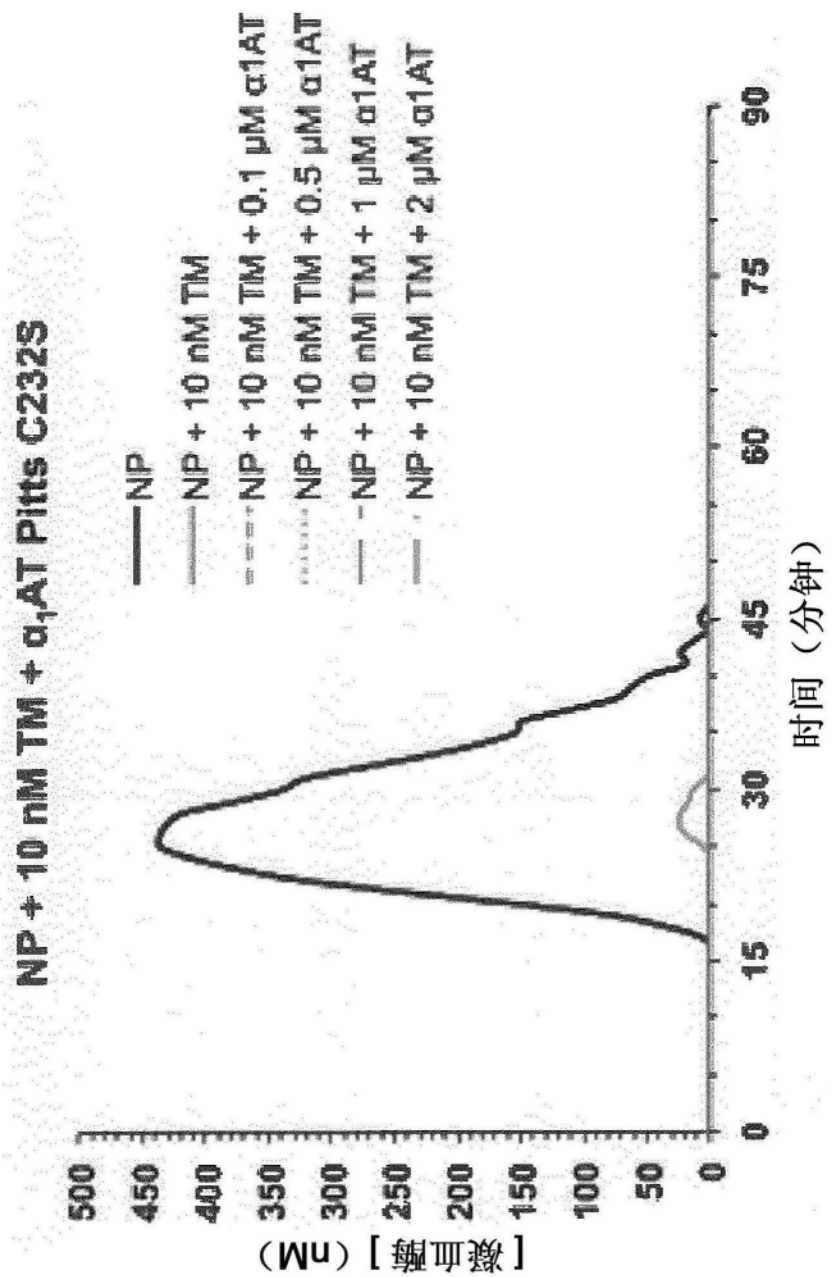


图6C

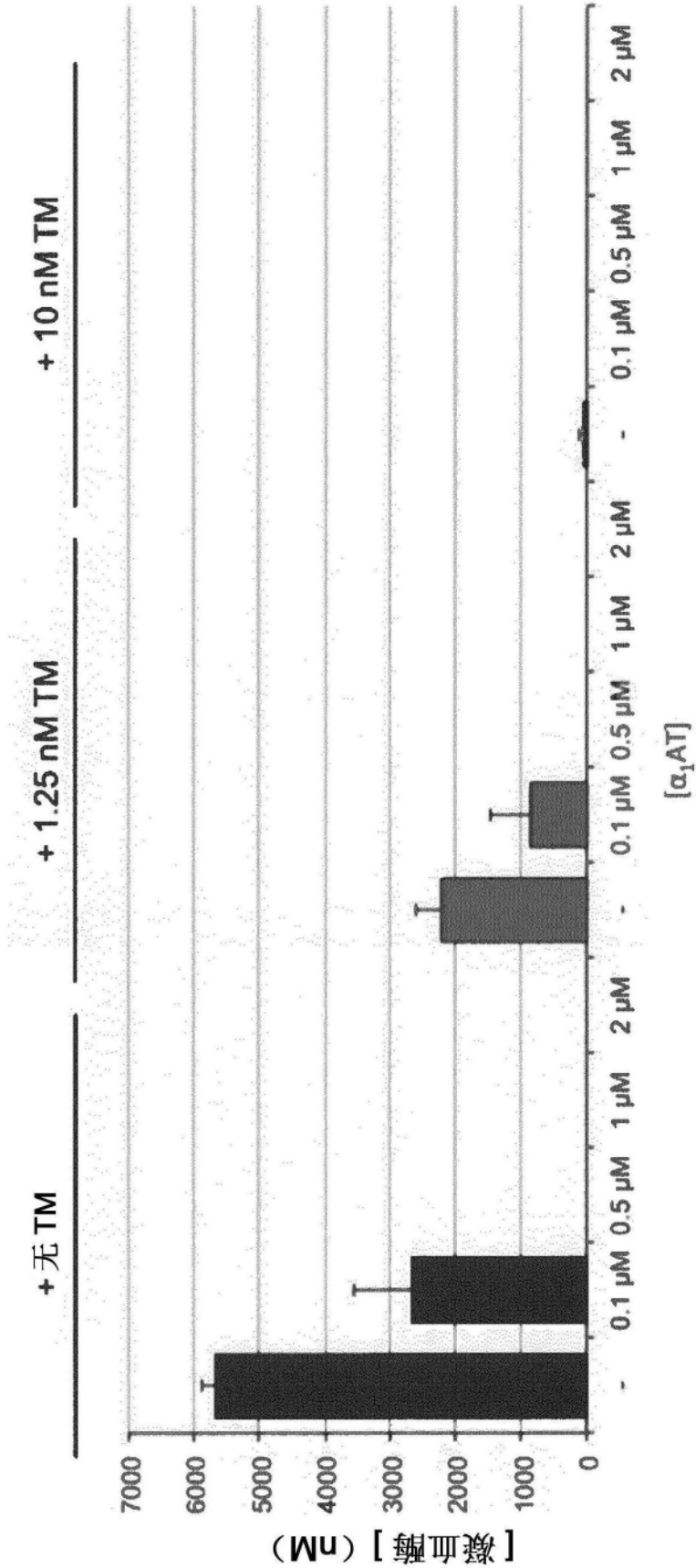


图6D

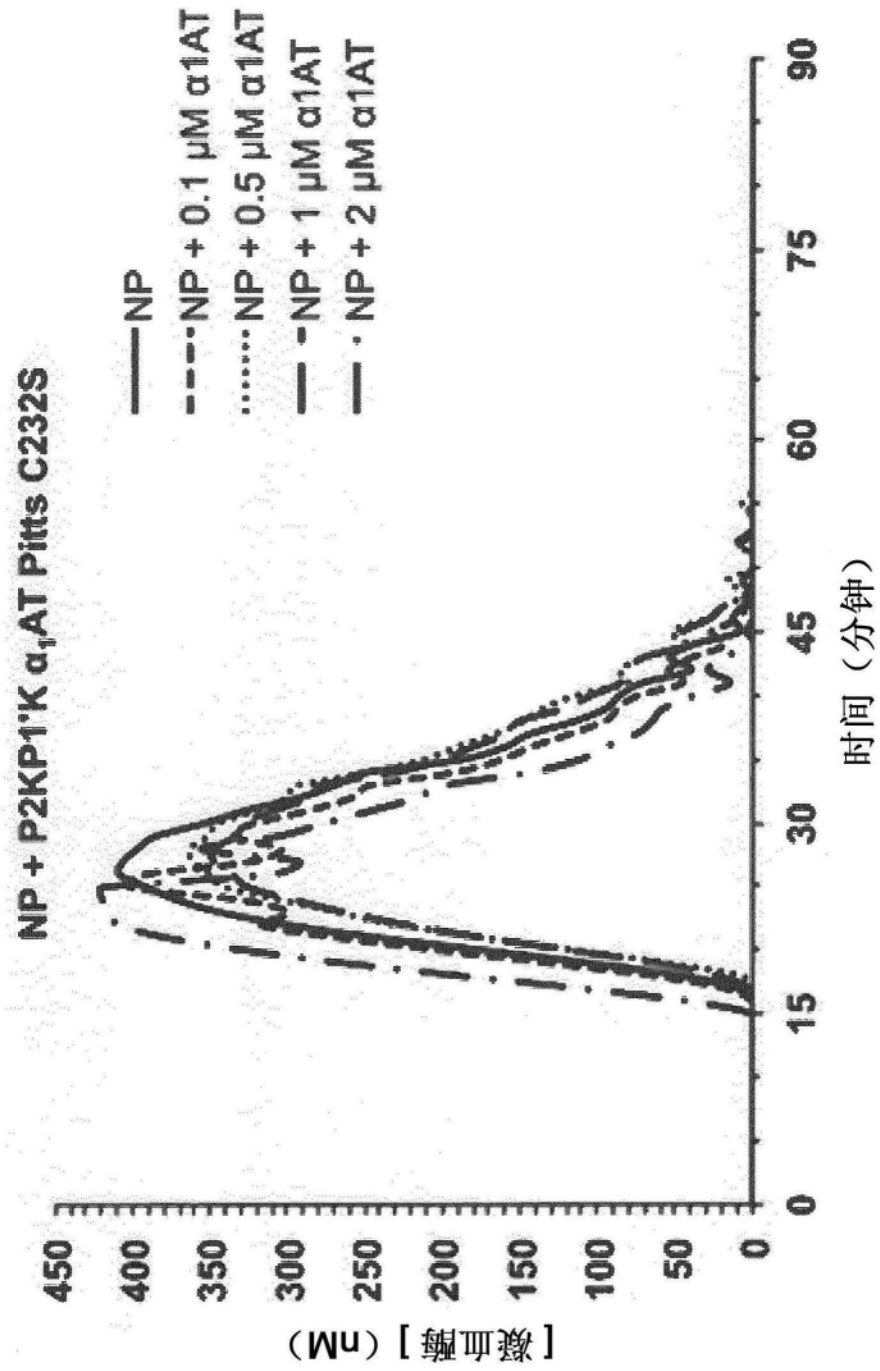


图7A

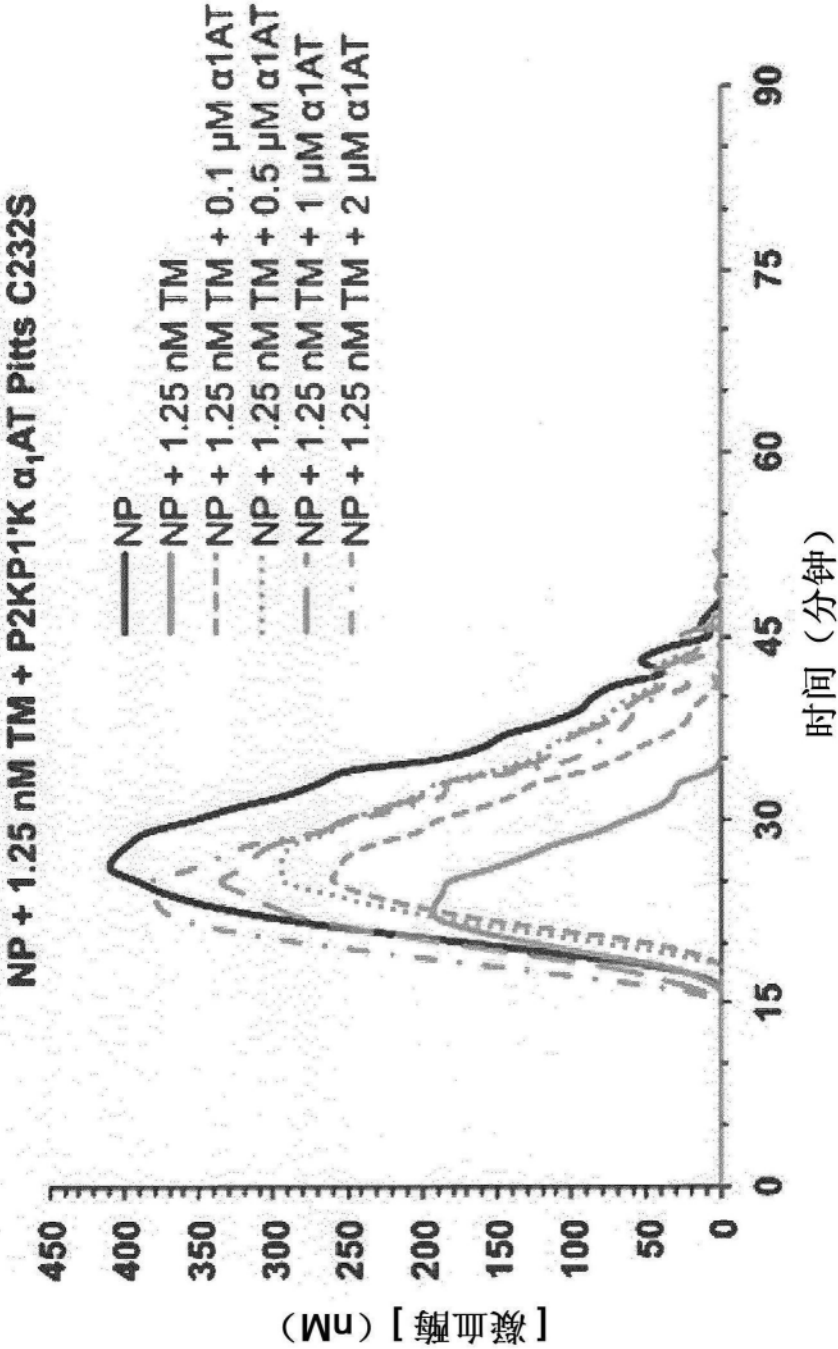


图7B

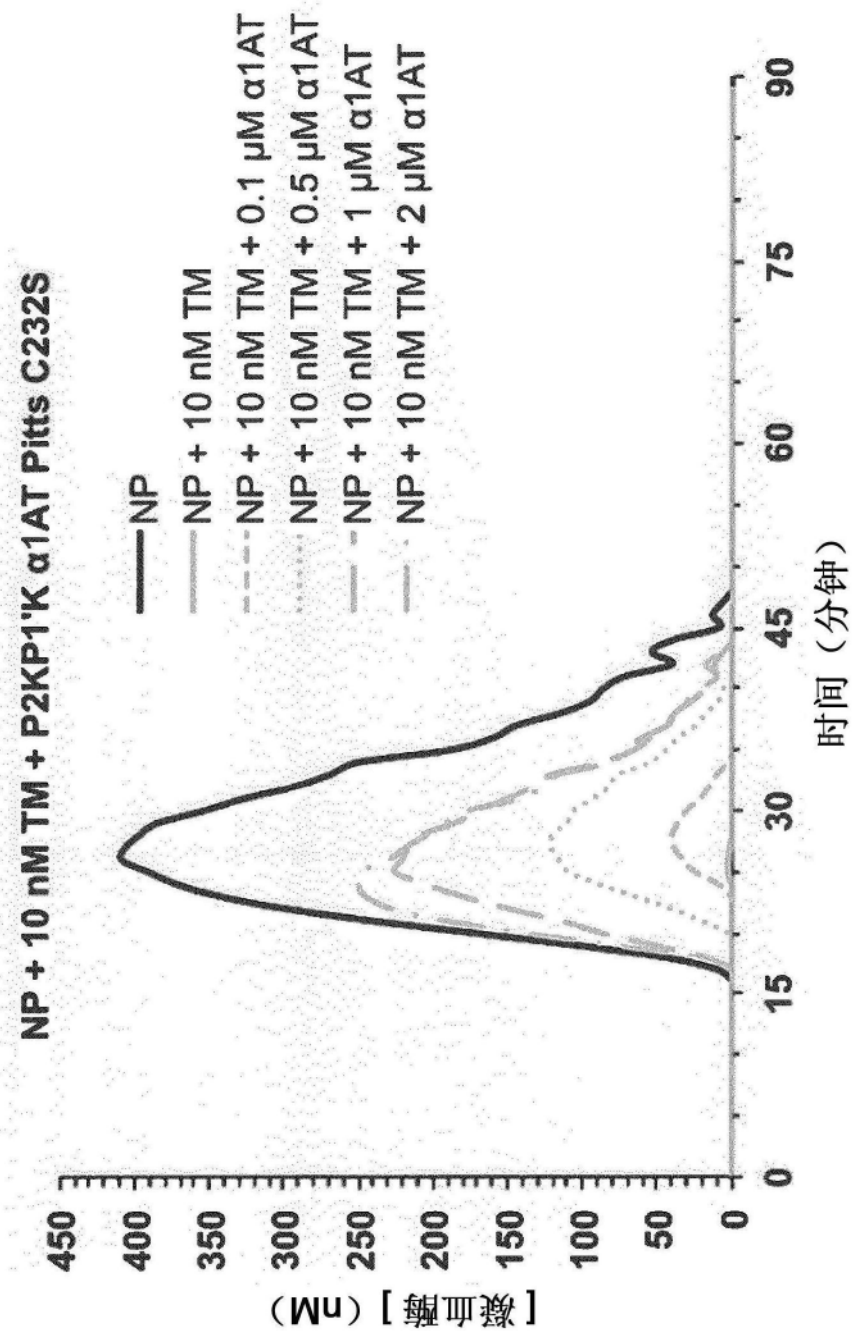


图7C

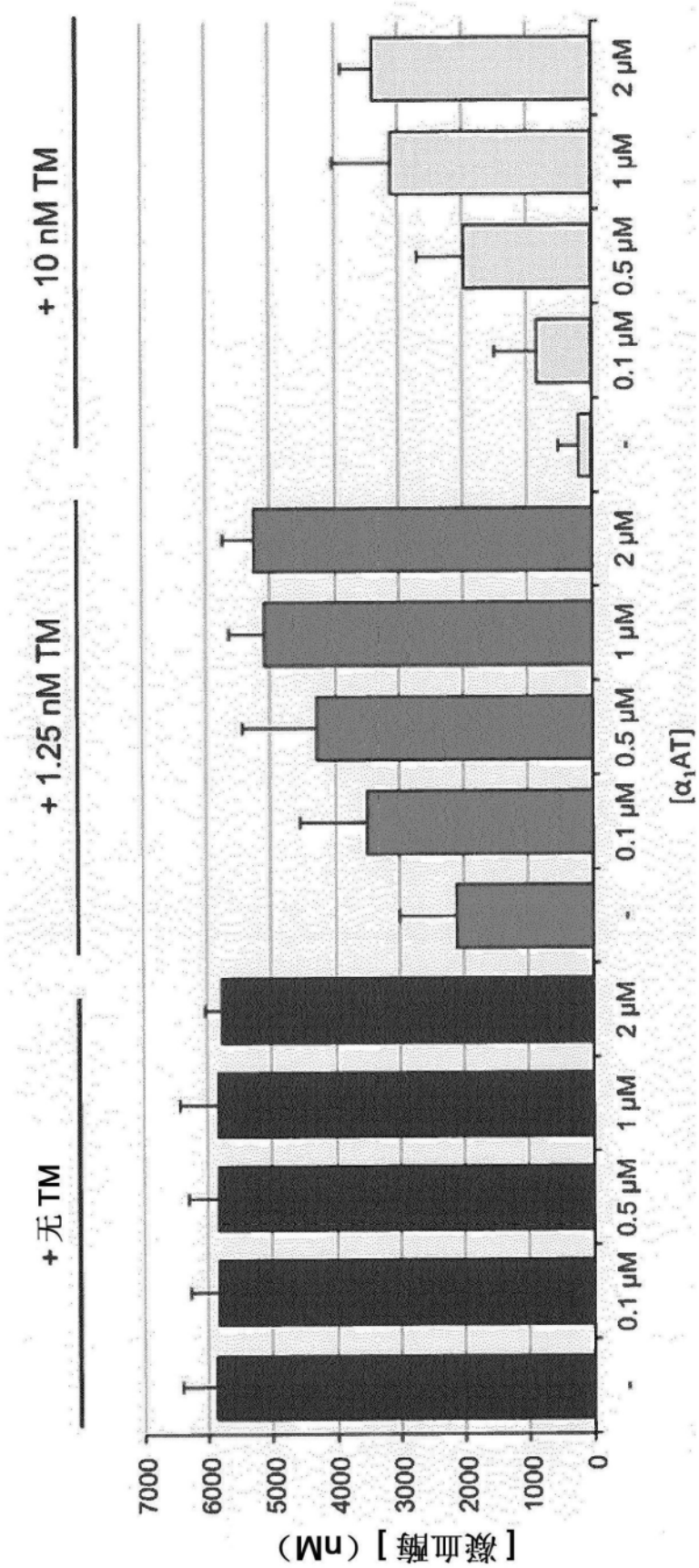


图7D

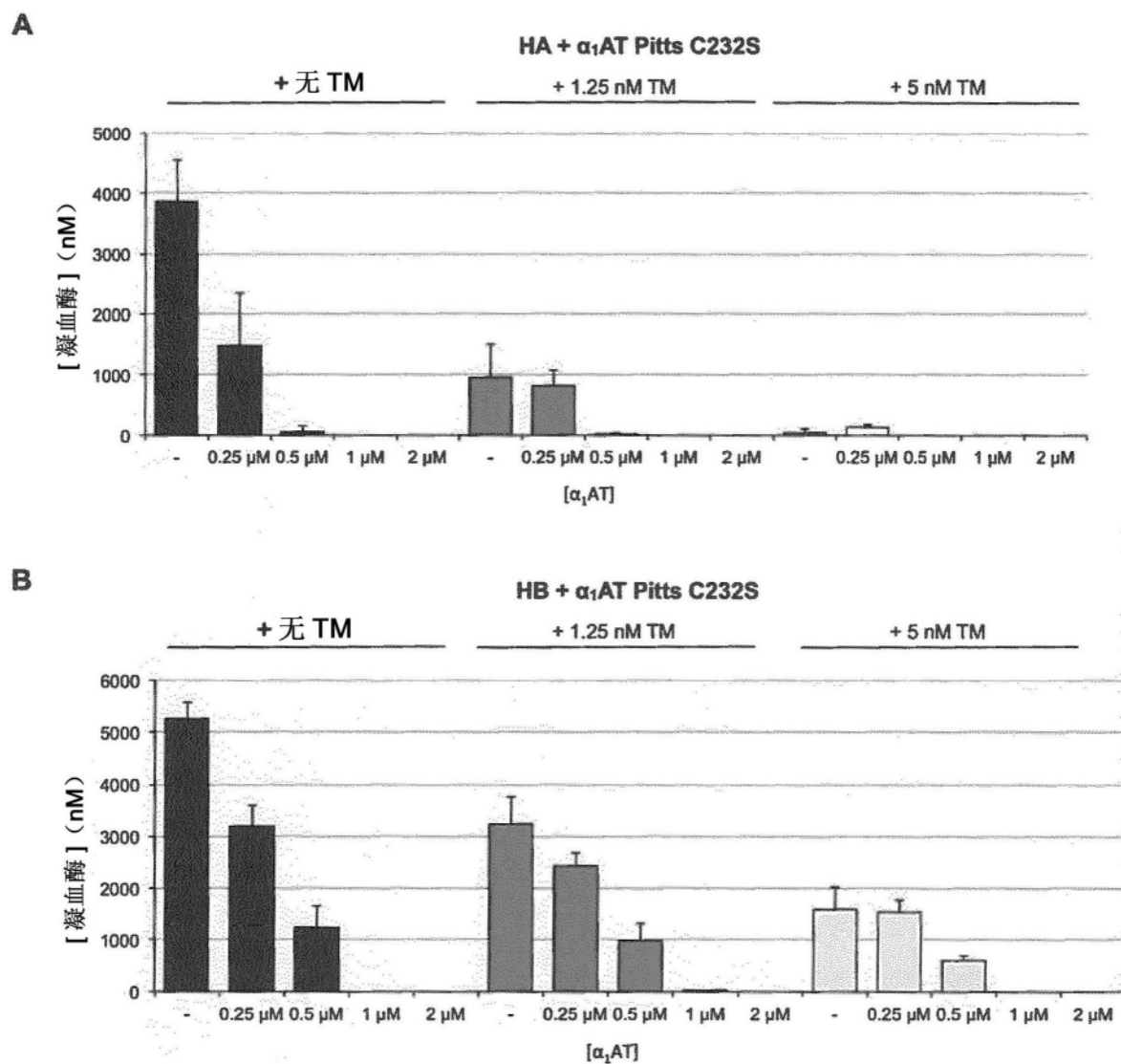


图8

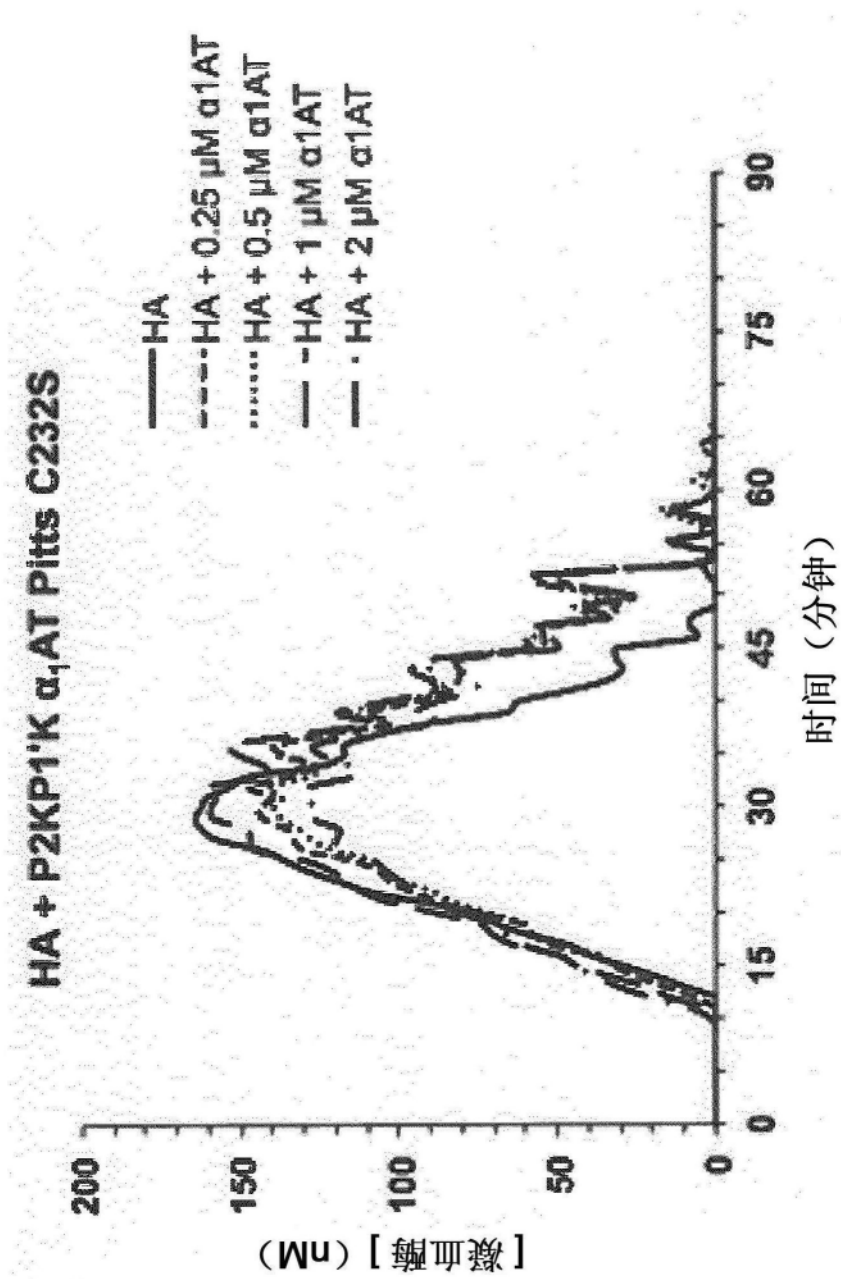


图9A

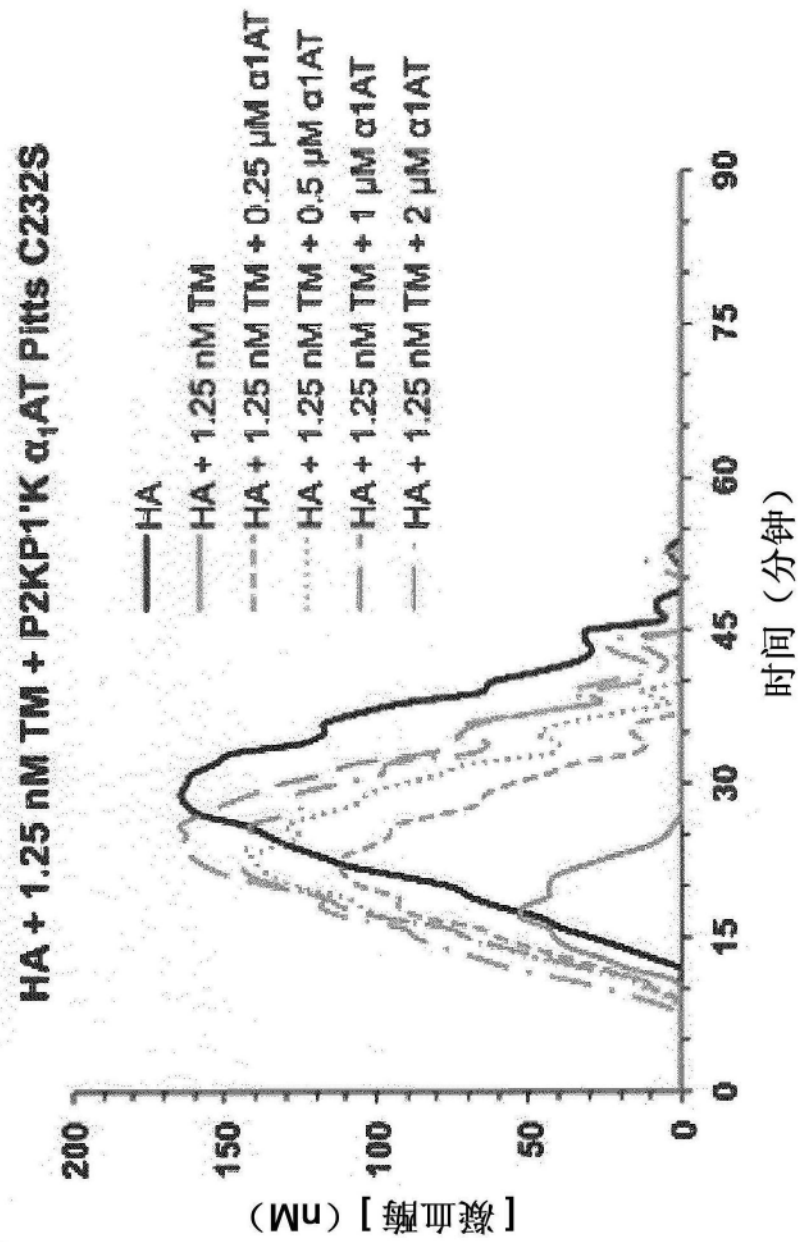


图9B

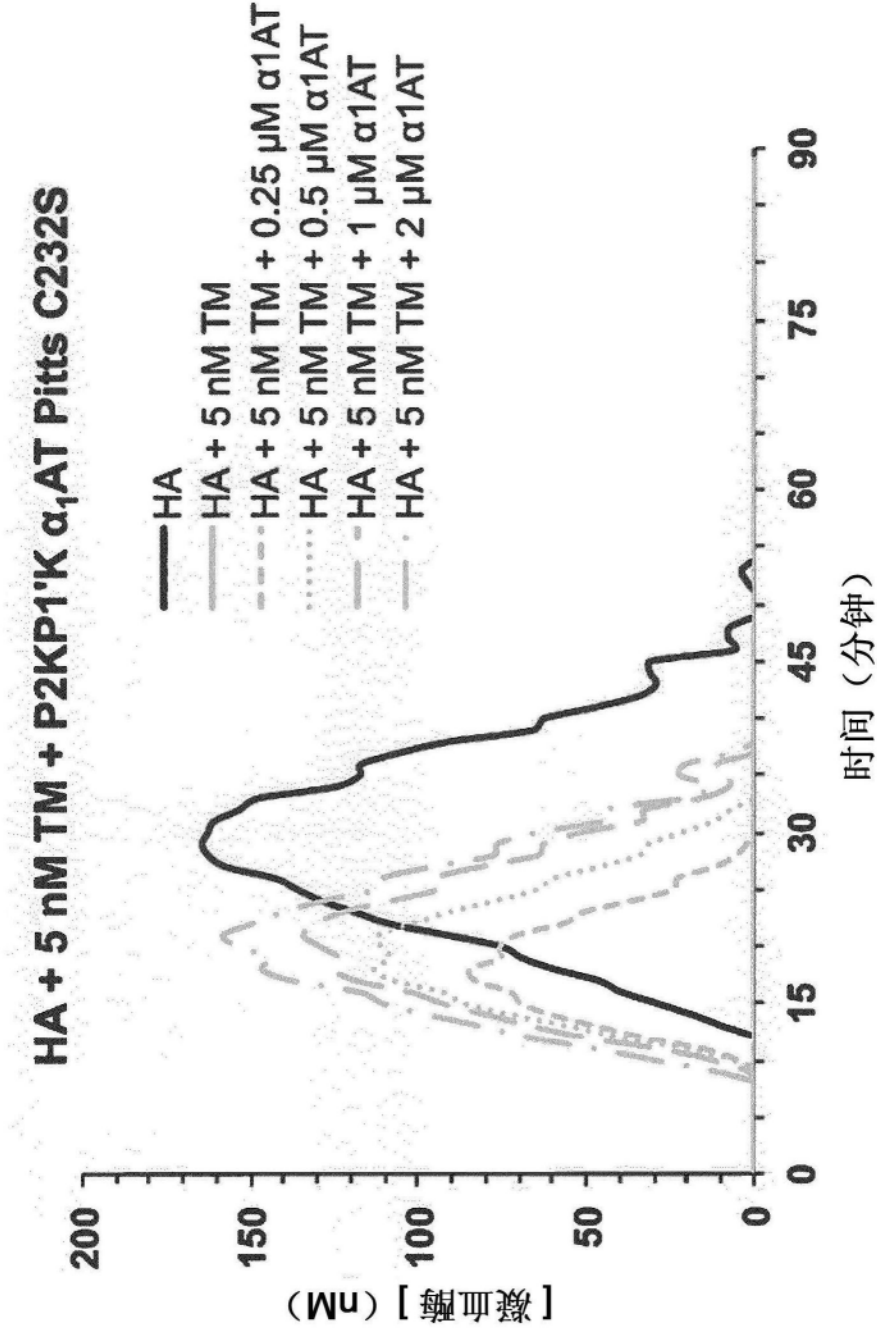


图9C

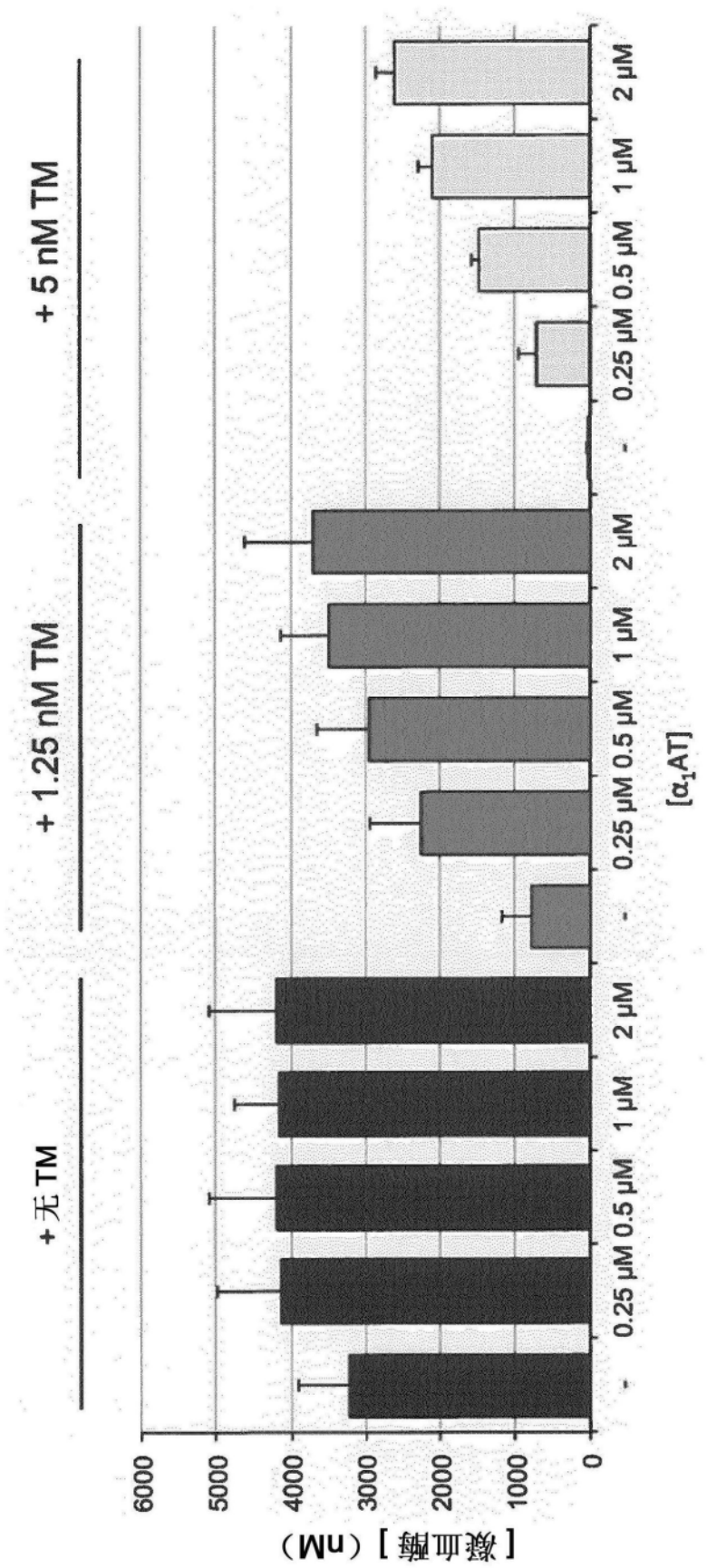


图9D

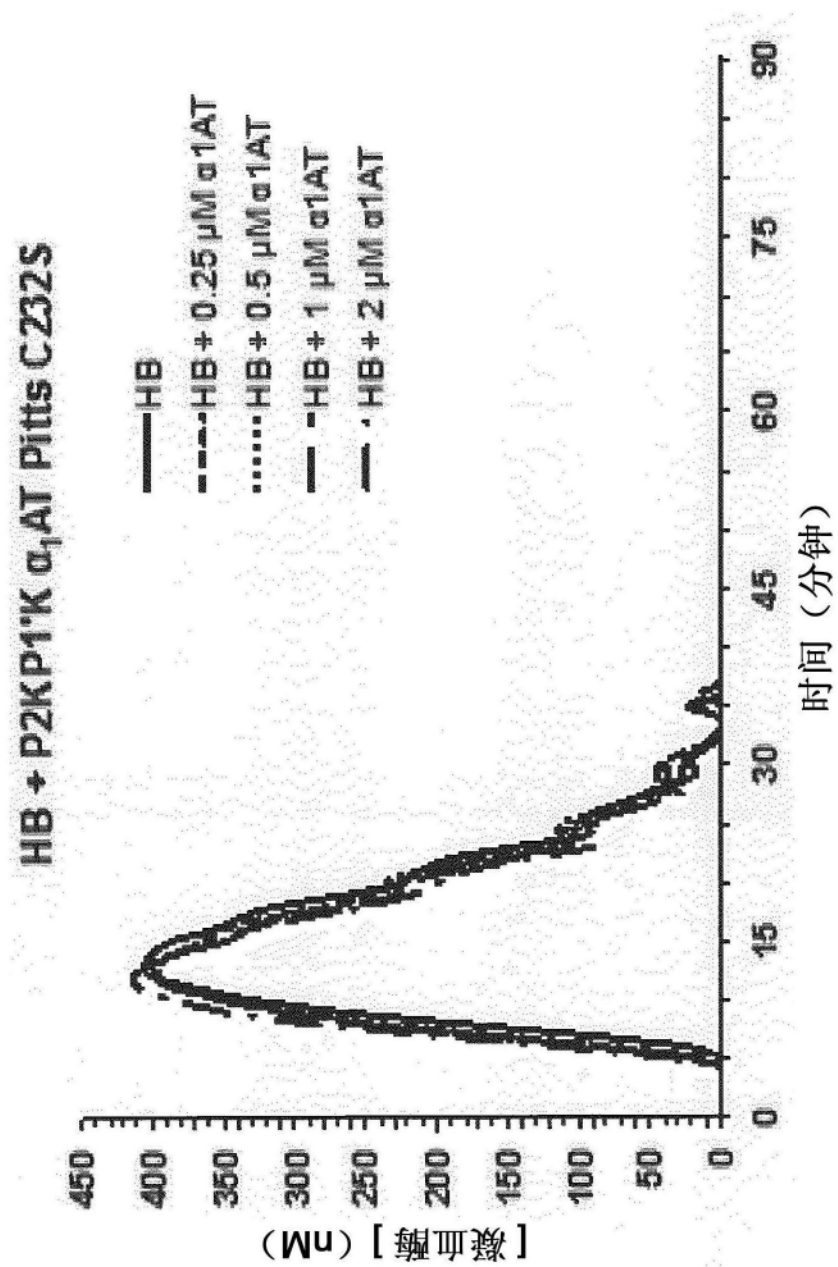


图10A

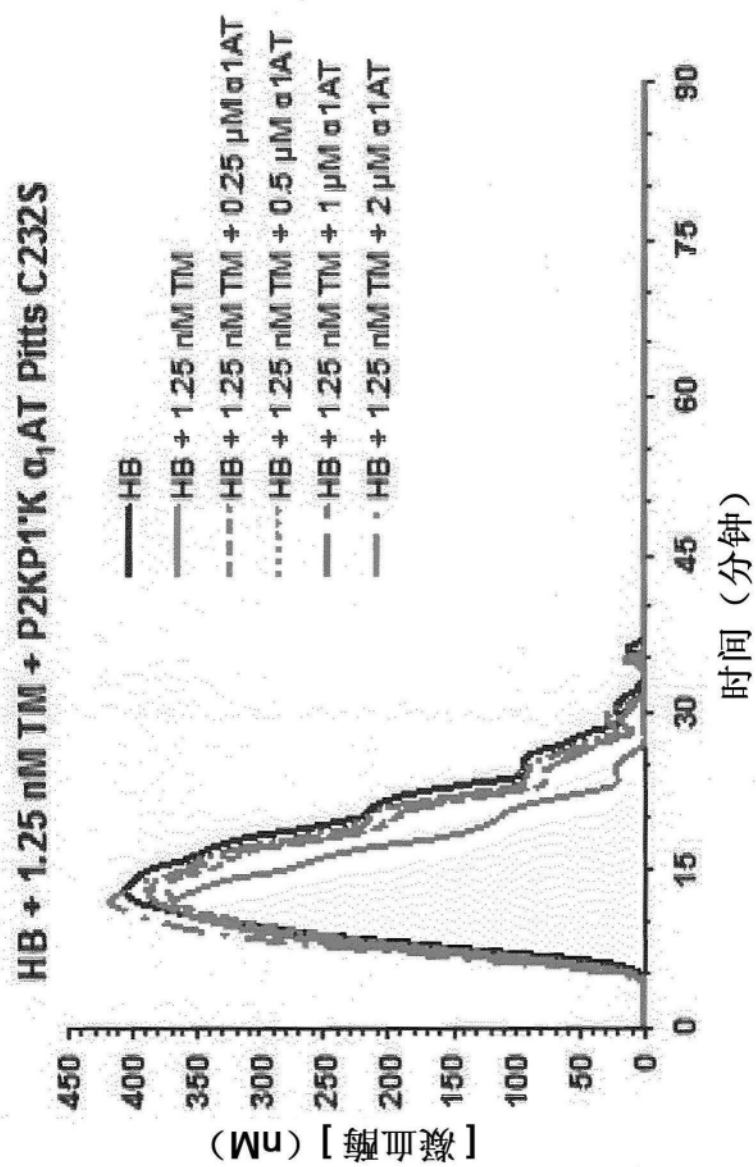


图10B

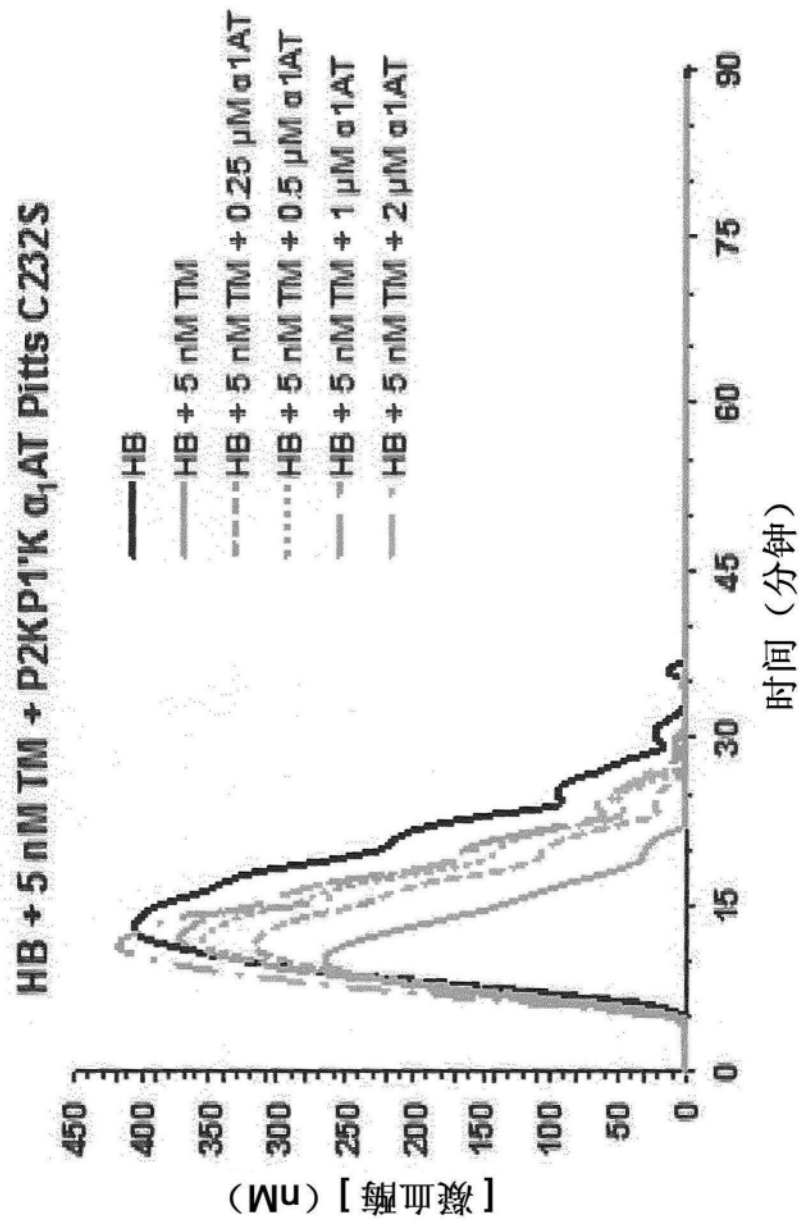


图10C

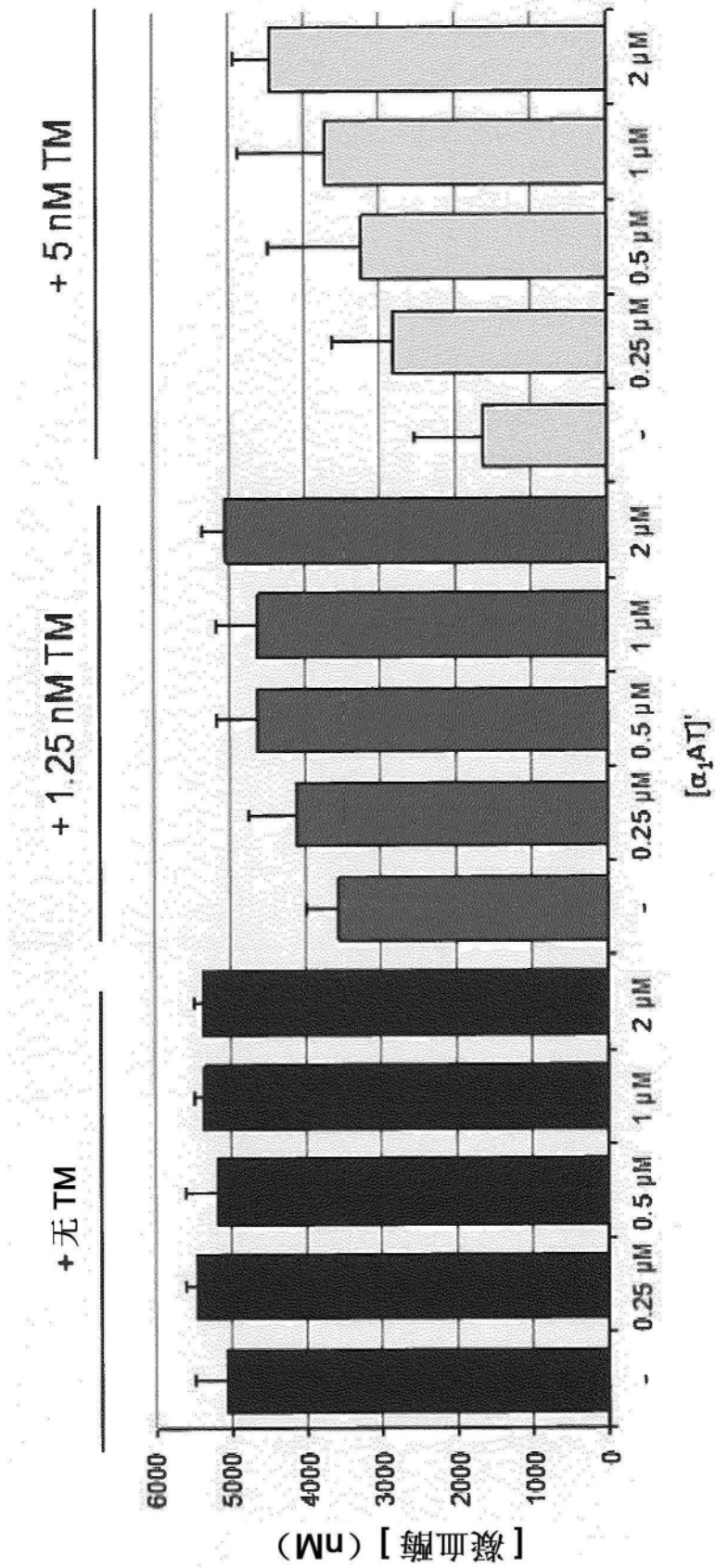


图10D

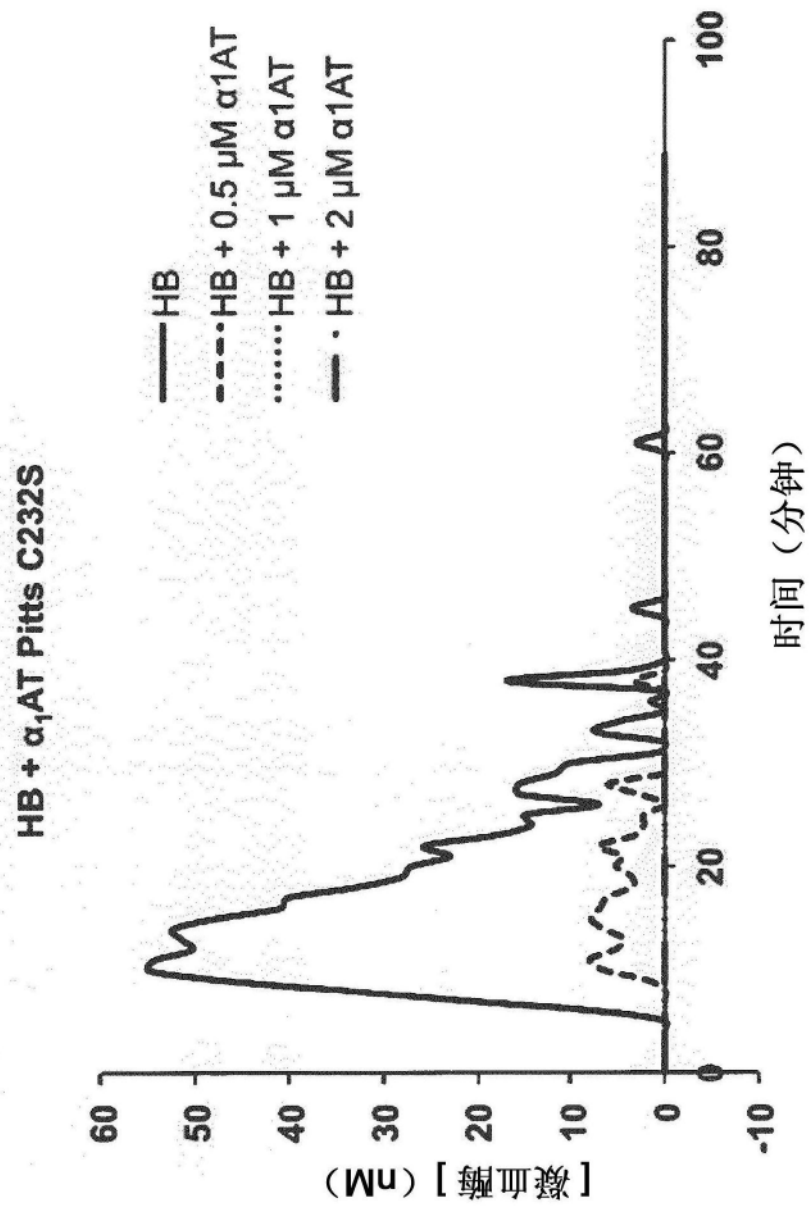


图11A

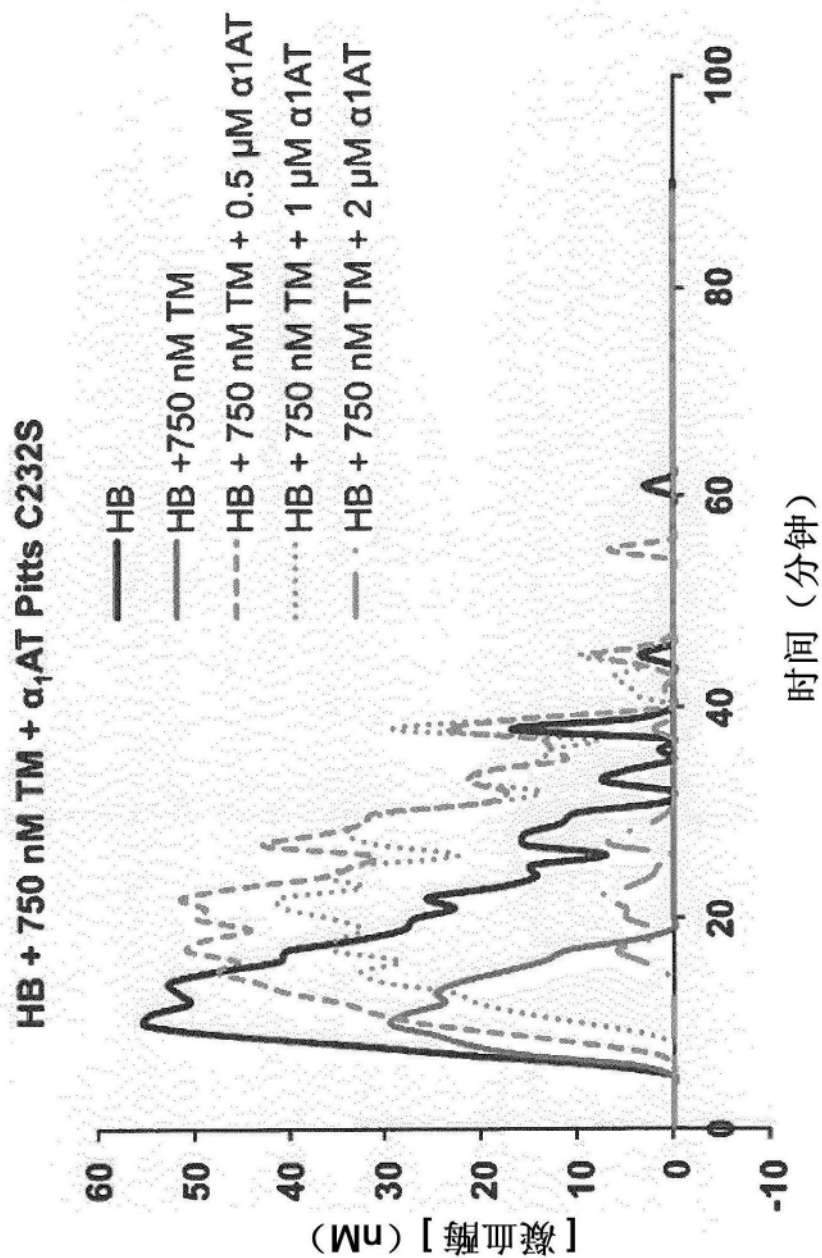


图11B

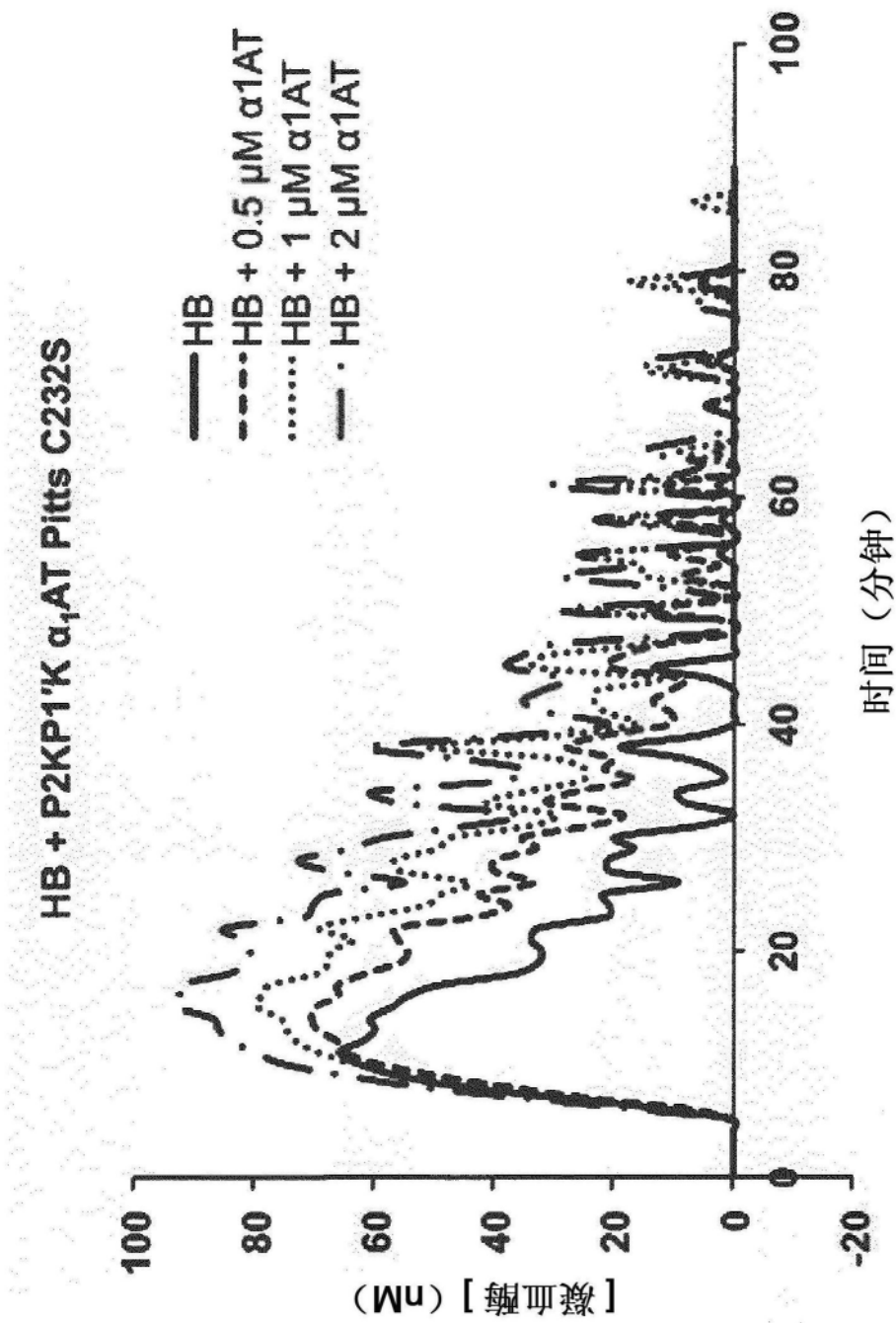


图11C

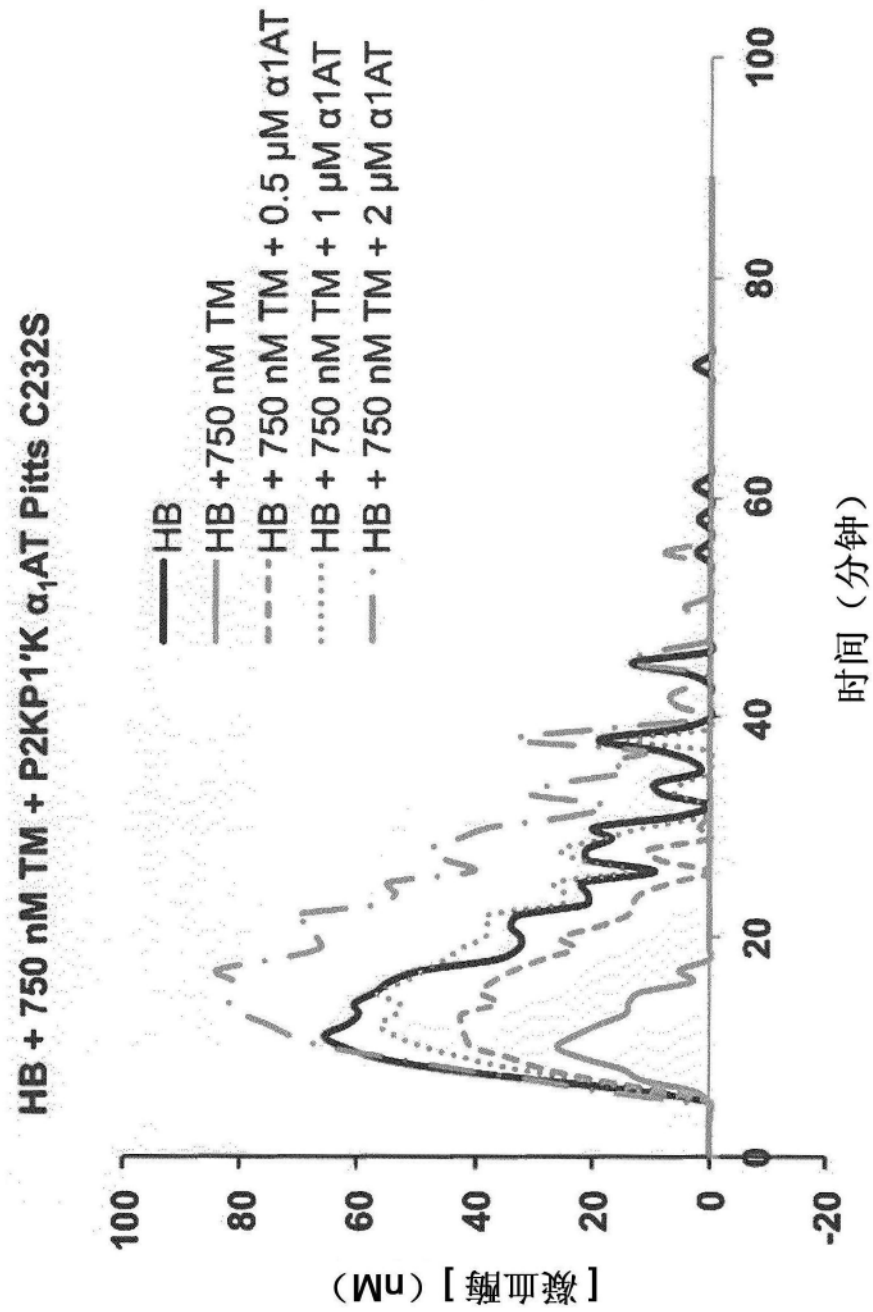


图11D

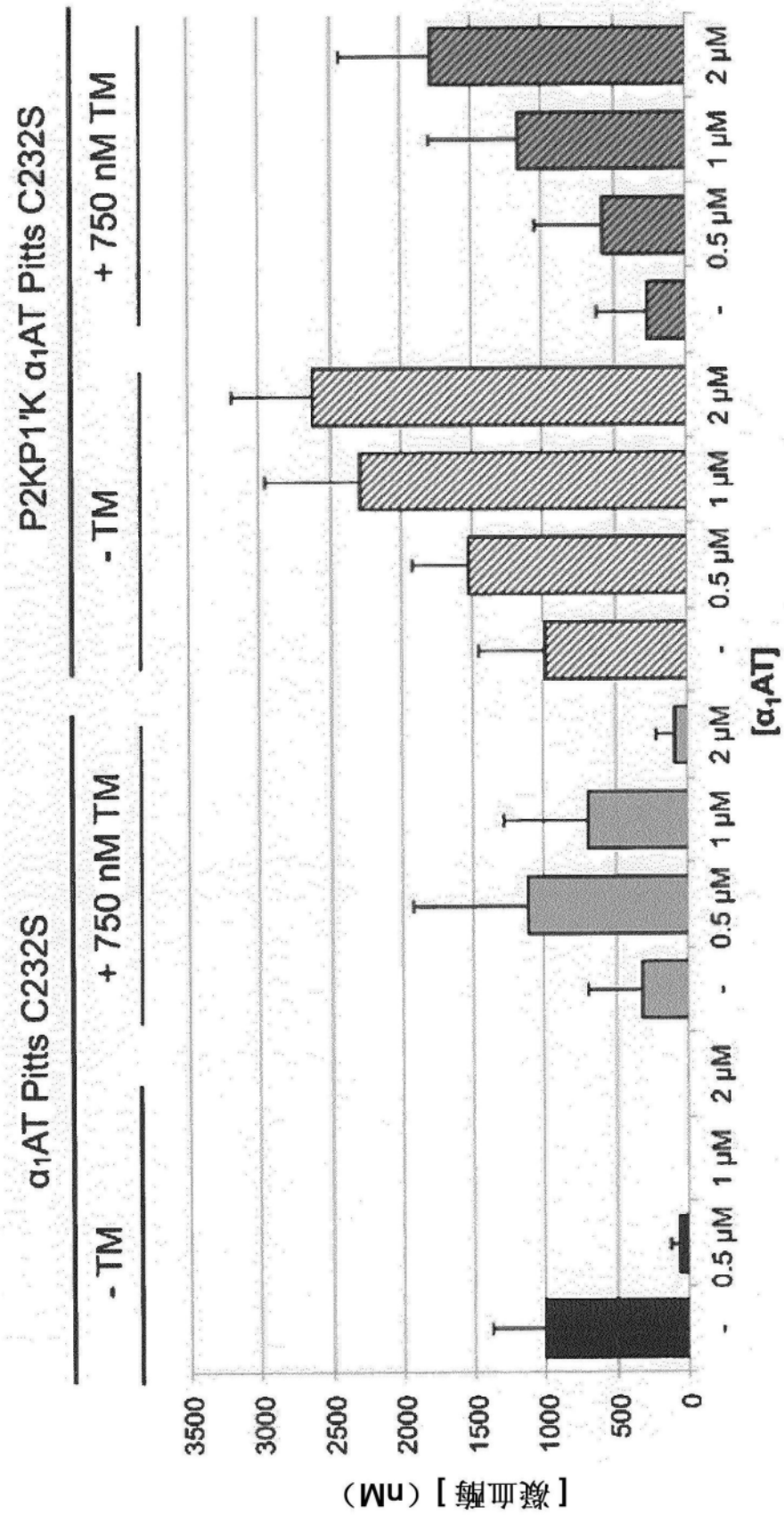


图11E

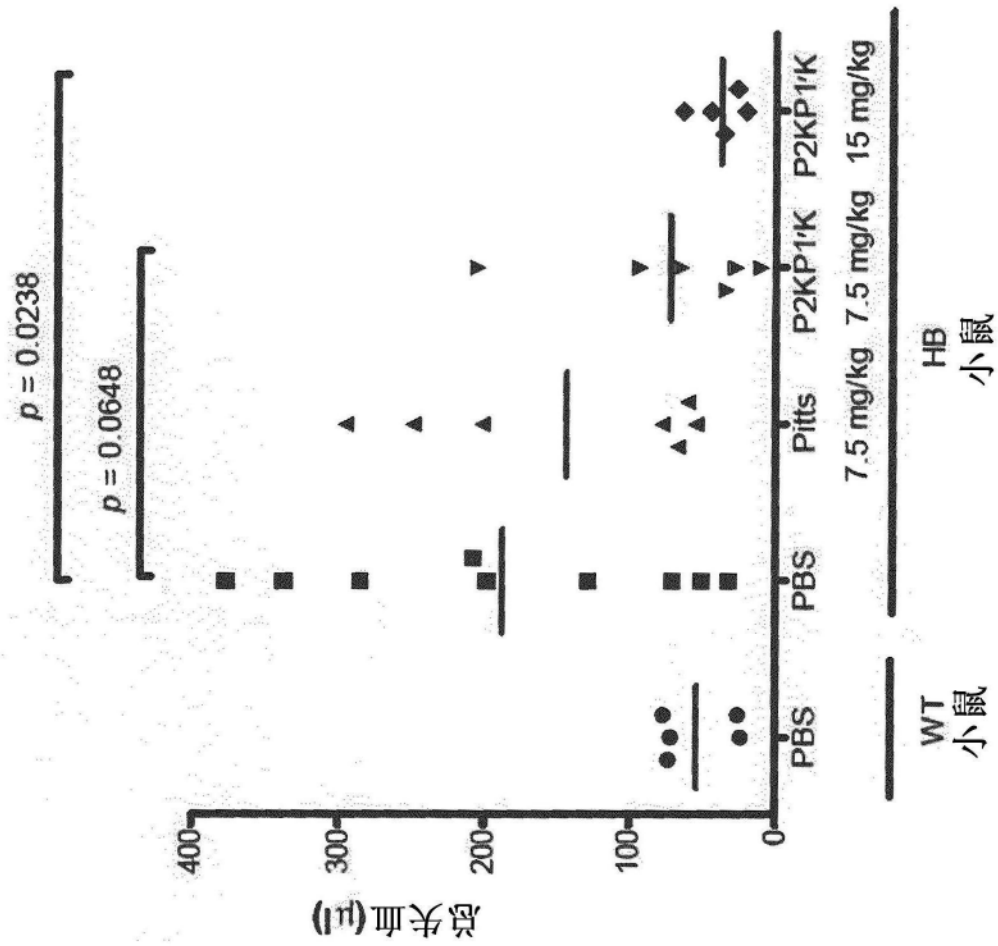


图12

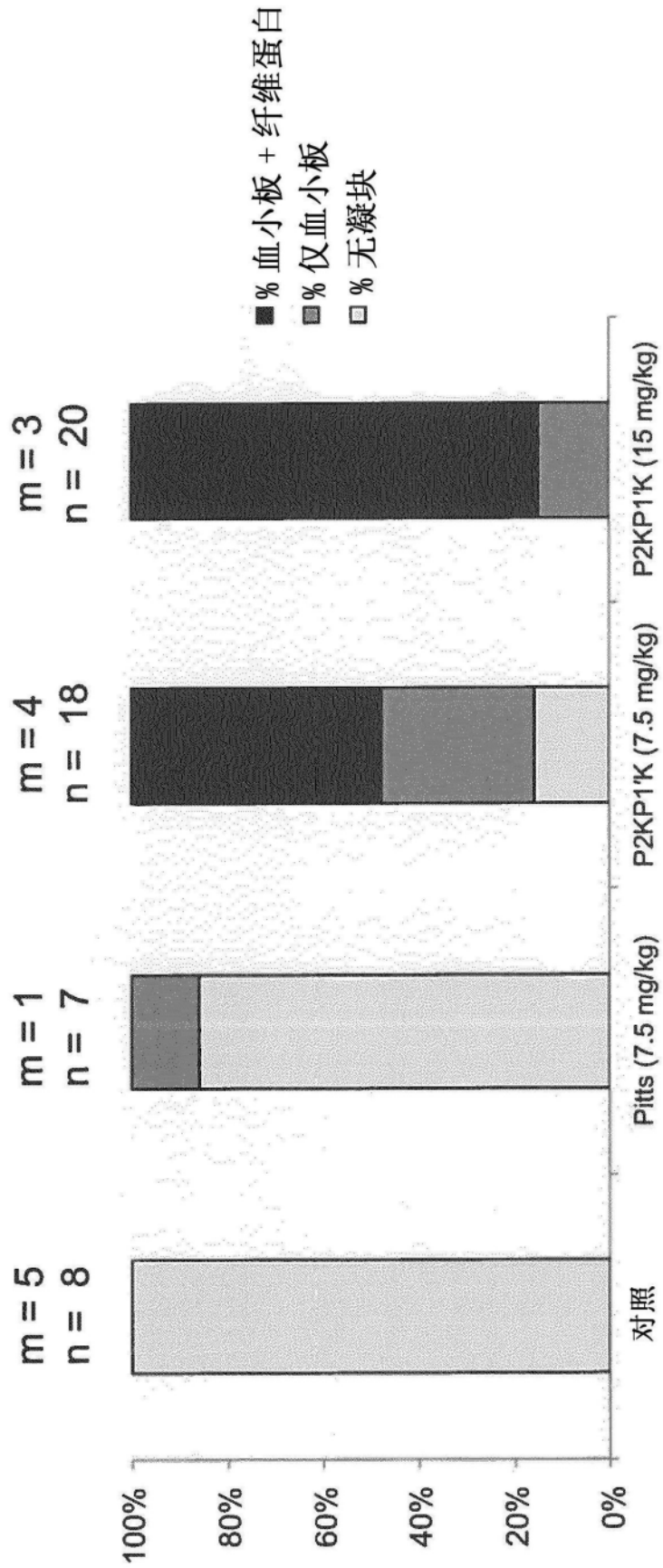


图13

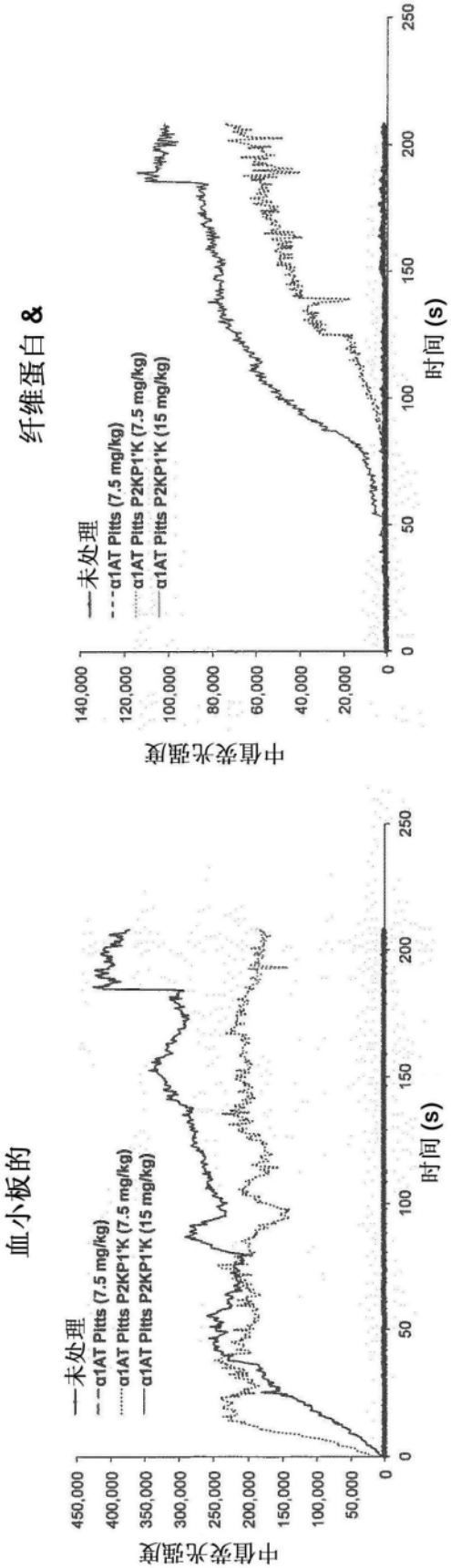


图14



图15