



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110343181 B

(45) 授权公告日 2022.04.08

(21) 申请号 201810305368.7

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2018.04.08

C12N 15/85 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 33/68 (2006.01)

申请公布号 CN 110343181 A

G01N 1/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2019.10.18

(56) 对比文件

(73) 专利权人 苏州康宁杰瑞生物科技有限公司

CN 110023339 A, 2019.07.16

地址 215125 江苏省苏州市工业园区星湖

CN 103396494 A, 2013.11.20

街218号科技园C23

CN 109563154 A, 2019.04.02

(72) 发明人 徐霆 王玲 恽丽红 白玉

CN 106397592 A, 2017.02.15

汪晶晶

CN 107400166 A, 2017.11.28

审查员 王翔宇

(74) 专利代理机构 北京永新同创知识产权代理

有限公司 11376

代理人 栾星明 王子楠

(51) Int. Cl.

权利要求书2页 说明书20页

C07K 16/36 (2006.01)

序列表13页 附图3页

(54) 发明名称

针对凝血因子IX (FIX) 的单域抗体

(57) 摘要

本发明涉及医药生物领域,公开了针对凝血因子IX (FIX) 的单域抗体。具体而言,本发明公开了一种衍生自所述单域抗体的FIX结合分子及其用途,特别是用于检测FIX、制备乏FIX血浆中的用途。

1. 凝血因子IX (FIX) 结合分子,其能够结合FIX且包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3:

- (1) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:2所示的CDR2,SEQ ID NO:3所示的CDR3;
- (2) SEQ ID NO:4所示的CDR1,SEQ ID NO:5所示的CDR2,SEQ ID NO:6所示的CDR3;
- (3) SEQ ID NO:7所示的CDR1,SEQ ID NO:8所示的CDR2,SEQ ID NO:9所示的CDR3;
- (4) SEQ ID NO:10所示的CDR1,SEQ ID NO:11所示的CDR2,SEQ ID NO:12所示的CDR3;
- (5) SEQ ID NO:13所示的CDR1,SEQ ID NO:14所示的CDR2,SEQ ID NO:15所示的CDR3;

和

- (6) SEQ ID NO:16所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2,SEQ ID NO:18所示的CDR3。

2. 权利要求1的FIX结合分子,其中所述免疫球蛋白单一可变结构域是VHH。

3. 权利要求2的FIX结合分子,其中所述VHH包含SEQ ID NO:19-24中任一氨基酸序列。

4. 权利要求1-3任一项的FIX结合分子,其还包含免疫球蛋白Fc区。

5. 权利要求4的FIX结合分子,其中所述免疫球蛋白Fc区是人免疫球蛋白Fc区。

6. 权利要求5的FIX结合分子,其中所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 25。

7. 权利要求1-3中任一项的FIX结合分子,其结合FIX的KD值小于 1×10^{-7} M。

8. 核酸分子,其编码权利要求1-7中任一项的FIX结合分子。

9. 表达载体,其包含与表达调控元件可操作地连接的权利要求8的核酸分子。

10. 宿主细胞,其包含权利要求8的核酸分子或以权利要求9的表达载体转化,并能够表达所述FIX结合分子。

11. 产生权利要求1-7中任一项的FIX结合分子的方法,包括:

- a) 在允许所述FIX结合分子表达的条件下培养权利要求10的宿主细胞;
- b) 从得自步骤a)的培养物回收由所述宿主细胞表达的FIX结合分子;及
- c) 任选进一步纯化和/或修饰得自步骤b)的FIX结合分子。

12. 一种检测靶样品中FIX的存在和/或对靶样品中FIX定量和/或检测靶样品中FIX的羧基化水平的试剂盒,包含权利要求1-7中任一项的FIX结合分子。

13. 权利要求12的试剂盒,其还包含含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX的对照样品。

14. 一种检测靶样品中FIX的存在和/或对样品中FIX定量和/或检测样品中FIX的羧基化水平的非诊断方法,所述方法包括:

a) 在FIX结合分子与FIX之间能够形成复合物的条件下,使所述靶样品和对照样品分别与权利要求1-7中任一项的FIX结合分子接触;

b) 检测复合物的形成,

其中所述靶样品与对照样品之间复合物形成的差异指示靶样品中FIX的存在和/或量和/或其羧基化水平。

15. 权利要求14的方法,其中所述对照样品含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX。

16. 一种制备缺乏FIX的血液样品的方法,包括

a) 使血液样品与权利要求1-7中任一项的FIX结合分子接触,从而所述血液样品中的

FIX与所述FIX结合分子形成复合物，

- b) 使所述所述复合物与所述血液样品分离,和
- c) 收获缺乏FIX的血液样品。

17. 权利要求16的方法,其中所述FIX结合分子被固定于固体支持物上。

18. 权利要求16或17的方法,其中所述血液样品是血浆。

19. 一种FIX亲和层析介质,包含其上固定有权利要求1-7中任一项的FIX结合分子的固体支持物。

20. 权利要求19的FIX亲和层析介质,其中所述固体支持物由选自以下的材料制成:聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、纤维素乙酸酯、交联的葡聚糖、交联的琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、含氟聚合物和磁性介质。

21. 权利要求19的FIX亲和层析介质,其是固定化有权利要求1-7中任一项的FIX结合分子的琼脂糖介质或磁珠。

22. 用于制备缺乏FIX的血液样品的装置,包含权利要求19-21中任一项的FIX亲和层析介质。

针对凝血因子IX (FIX) 的单域抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及医药生物领域,公开了针对凝血因子IX (FIX) 的单域抗体。具体而言,本发明公开了一种衍生自所述单域抗体的FIX结合分子及其用途,特别是用于检测FIX、制备乏FIX血浆中的用途。

背景技术

[0002] 凝血因子是参与血液凝固过程的各种蛋白质组分。它的生理作用是,在血管出血时被激活,和血小板粘连在一起并且堵塞血管上的漏口。这个过程被称为凝血。它们部分由肝生成。可以为香豆素所抑制。为统一命名,世界卫生组织按其被发现的先后次序用罗马数字编号,有凝血因子I、II、III、IV、V、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII等。

[0003] 由于凝血因子缺乏造成的遗传性的凝血功能障碍性疾病,一般分为甲型和乙型,均属于伴性遗传。新生男儿的患病率大约为1:5000。通常病情越严重,瘀血和出血现象就出现得越早。按发病率计算,全球大约有40万患者。我国的患者应有10万,但遗憾的是大多未获诊断,目前接受治疗的患者估计仅为~8% (约8000余人)。

[0004] 乙型血友病是由于体内缺乏凝血九因子 (FIX) 而造成的凝血障碍性疾病,以自发性或创伤相关的出血为特征,出血部位主要在关节、软组织和肌肉。据中国医学科学院血液病医院 (血液学研究所) 血栓止血诊疗中心的信息,目前全国登记在册的血友病患者有9804人,但实际患者数量远不止于此,其中乙型血友病患者约占15%至20%。

[0005] 目前,血友病尚无根治方法。最好的治疗是替代治疗,也就是及时给患者输入相应的凝血因子。否则患者一旦出现创口,就会因凝血功能缺失而失血身亡。如果患者已经出血了,用药的频率就更高。我国目前医药用凝血九因子大多数依托于血浆制品,即受到供应源的限制,又存在安全隐患;而唯一的重组产品则是美国惠氏公司的BeneFIX,价格昂贵。BeneFIX价格2009年Wyeth报价0.93美元每国际单位,患者报告每单位实际医疗费用可达4美元,一次用量250-2000国际单位。针对出血而进行临时治疗,每年一个血友病患者耗费大约15-20万美元,而要进行预防性治疗的话,则要加倍。鉴于目前治疗乙型血友病唯一有效的药物只有FIX及FIX产生的市场效应,国际上已有多家公司研发及生产FIX、FIX仿制药及长效FIX。

[0006] 对于重组FIX的开发,其关键的一环就是尽量维持其生物学活性和生物利用度。FIX上包含多种翻译后修饰,且对其生物学活性有着非常重要的影响。目前的分析手段往往只能在开发后期,对高度纯化的重组FIX进行翻译后修饰以及比活分析。如果能有一种更简便的检测方法,在早期就能简单快速的分析比较纯度较低,甚至是细胞料液中的重组FIX的活性,对于项目开发,早期的工艺筛选等都会有巨大的帮助。

[0007] 重组凝血因子的活性检测中,需要用到乏九因子血浆。同时凝血功能障碍的诊断也需要检测患者的凝血因子活性。本领域还需要高效、低成本的制备乏凝血因子 (如凝血因子IX) 血浆的方法。

[0008] 发明概述

[0009] 在第一方面,本发明提供一种凝血因子IX (FIX) 结合分子,其能够结合FIX且包含至少一个免疫球蛋白单一可变结构域,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3:

[0010] (1) SEQ ID NO:1所示的CDR1,SEQ ID NO:2所示的CDR2,SEQ ID NO:3所示的CDR3;

[0011] (2) SEQ ID NO:4所示的CDR1,SEQ ID NO:5所示的CDR2,SEQ ID NO:6所示的CDR3;

[0012] (3) SEQ ID NO:7所示的CDR1,SEQ ID NO:8所示的CDR2,SEQ ID NO:9所示的CDR3;

[0013] (4) SEQ ID NO:10所示的CDR1,SEQ ID NO:11所示的CDR2,SEQ ID NO:12所示的CDR3;

[0014] (5) SEQ ID NO:13所示的CDR1,SEQ ID NO:14所示的CDR2,SEQ ID NO:15所示的CDR3;和

[0015] (6) SEQ ID NO:16所示的CDR1,SEQ ID NO:17所示的CDR2,SEQ ID NO:18所示的CDR3。

[0016] 在一些实施方案中,所述免疫球蛋白单一可变结构域是VHH。

[0017] 在一些具体实施方案中,所述VHH包含SEQ ID NO:19-24中任一氨基酸序列。

[0018] 在一些实施方案中,所述FIX结合分子还包含免疫球蛋白Fc区。在一些实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区是人免疫球蛋白Fc区。在一些具体实施方案中,其中所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列示于SEQ ID NO:25。

[0019] 在一些具体实施方案中,所述FIX结合分子结合FIX的KD值小于 1×10^{-7} M,优选小于 1×10^{-8} M,更优选小于 1×10^{-9} M,更优选小于 1×10^{-10} M,尤其更优选小于 1×10^{-11} M。

[0020] 在第二方面,本发明提供一种核酸分子,其编码本发明的FIX结合分子。

[0021] 在第三方面,本发明提供一种表达载体,其包含与表达调控元件可操作地连接的本发明第二方面的核酸分子。

[0022] 在第四方面,本发明提供一种宿主细胞,其包含本发明的核酸分子或以本发明的表达载体转化,并能够表达所述FIX结合分子。

[0023] 在第五方面,本发明提供一种产生本发明的FIX结合分子的方法,包括:

[0024] a) 在允许所述FIX结合分子表达的条件下培养本发明的宿主细胞;

[0025] b) 从得自步骤a) 的培养物回收由所述宿主细胞表达的FIX结合分子;及

[0026] c) 任选进一步纯化和/或修饰得自步骤b) 的FIX结合分子。

[0027] 在第六方面,本发明提供一种检测靶样品中FIX的存在和/或对靶样品中FIX定量和/或检测靶样品中FIX的羧基化水平的试剂盒,包含本发明的FIX结合分子。在一些实施方案中,所述试剂盒还包含含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX的对照样品。

[0028] 在第七方面,本发明提供一种检测靶样品中FIX的存在和/或对样品中FIX定量和/或检测样品中FIX的羧基化水平的方法,所述方法包括:

[0029] a) 在FIX结合分子与FIX之间能够形成复合物的条件下,使所述靶样品和对照样品分别与本发明的FIX结合分子接触;

[0030] b) 检测复合物的形成,

[0031] 其中所述靶样品与对照样品之间复合物形成的差异指示靶样品中FIX的存在和/或量或/或其羧基化水平,优选地,所述对照样品含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX。

[0032] 在第八方面,本发明提供一种制备乏FIX血液样品的方法,包括

[0033] a) 使血液样品与本发明的FIX结合分子接触,从而所述血液样品中的FIX与所述FIX结合分子形成复合物,

[0034] b) 使所述所述复合物与所述血液样品分离,和

[0035] c) 收获乏FIX血液样品。

[0036] 在一些实施方案中,其中所述FIX结合分子被固定于固体支持物上。在一些实施方案中,其中所述血液样品是血浆。

[0037] 在第九方面,本发明提供一种FIX亲和层析介质,其包含其上固定有本发明的FIX结合分子的固体支持物。在一些实施方案中,其中所述固体支持物由选自以下的材料制成:聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、纤维素乙酸酯、交联的葡聚糖、交联的琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、含氟聚合物、磁性介质和其他合成聚合物。在一些实施方案中,FIX亲和层析介质是固定化有本发明的FIX结合分子的琼脂糖介质或磁珠。

[0038] 在第十方面,本发明提供一种用于制备乏FIX血液样品的装置,包含本发明的FIX亲和层析介质。

附图说明

[0039] 图1. 示出抗FIX单域抗体的序列。

[0040] 图2. 示出抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与抗原FIX的结合曲线。

[0041] 图3. 示出FIX和FVII与抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的蛋白印迹结果。

[0042] 图4. 示出重组人FIX与抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的蛋白印迹结果。

[0043] 图5. 示出不同羧基化的重组人FIX蛋白与抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的蛋白印迹结果。

[0044] 发明详述

[0045] 定义

[0046] 除非另有指示或定义,否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义,该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册,如Sambrook et al.,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”;Lewin,“Genes VIII”;及Roitt et al.,“Immunology”(第8版),以及本文中引用的一般现有技术;此外,除非另有说明,否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行,该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

[0047] 除非另有说明,否则可互换使用的术语“抗体”或“免疫球蛋白”在本文中无论是指重链抗体还是指常规4链抗体,均用作一般术语以包括全长抗体、其单个的链以及其所有部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段,分别例如VHH结构域或VH/VL结构域)。此外,本文所用的术语“序列”(例如在“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“单一可变结构域序列”、“VHH序列”或“蛋白序列”等的术语中)一般应理解为既包括相关氨基酸序列,又包括编码所述序列的核酸序列或核苷酸序列,除非本文需要更限定的解释。

[0048] 如本文所用,术语(多肽或蛋白的)“结构域”是指折叠蛋白结构,其能够独立于蛋白的其余部分维持其三级结构。一般而言,结构域负责蛋白的单个的功能性质,且在许多情

况下可添加、移除或转移至其他蛋白而不损失蛋白的其余部分和/或结构域的功能。

[0049] 如本文所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链(例如常规4链抗体的链或重链抗体的链)的球形区域,或是指基本上由这类球形区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于其维持抗体分子的免疫球蛋白折叠特征,其由排列在两个 β 折叠中任选由保守二硫键稳定的约7个反平行 β 折叠股的2层夹层组成。

[0050] 如本文所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由本领域及下文中分别称为“框架区1”或“FR1”、“框架区2”或“FR2”、“框架区3”或“FR3”、及“框架区4”或“FR4”的四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域,其中所述框架区由本领域及下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”、“互补决定区2”或“CDR2”、及“互补决定区3”或“CDR3”的三个“互补决定区”或“CDR”间隔开。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可如下表示为:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域因具有抗原结合位点而赋予抗体对抗原的特异性。

[0051] 如本文所用的术语“免疫球蛋白单一可变结构域”是指能够在不与其他免疫球蛋白可变结构域配对的情况下特异性结合抗原表位的免疫球蛋白可变结构域。本发明含义中的免疫球蛋白单一可变结构域的一个实例为“结构域抗体”,例如免疫球蛋白单一可变结构域VH及VL(VH结构域及VL结构域)。免疫球蛋白单一可变结构域的另一实例为如下文定义的骆驼科的“VHH结构域”(或简称为“VHH”)。

[0052] “VHH结构域”,亦称为重链单域抗体、VHH、 V_H 结构域、VHH抗体片段和VHH抗体,是称为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”)的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C,Atarhouch T,Muyldermans S,Robinson G,Hamers C,Songa EB,Bendahman N,Hamers R.:“Naturally occurring antibodies devoid of light chains”;Nature 363,446-448(1993))。使用术语“VHH结构域”以将所述可变结构域与存在于常规4链抗体中的重链可变结构域(其在本文中称为“VH结构域”)以及存在于常规4链抗体中的轻链可变结构域(其在本文中称为“VL结构域”)进行区分。VHH结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域(此与常规4链抗体中的VH或VL结构域相反,在该情况下表位由VL结构域与VH结构域一起识别)。VHH结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。

[0053] 在本发明的上下文中,术语“重链单域抗体”、“VHH结构域”、“VHH”、“ V_H 结构域”、“VHH抗体片段”、“VHH抗体”以及“Nanobody®”及“Nanobody®结构域”(“Nanobody”为Ablynx N.V.公司,Ghent,Belgium的商标)可互换使用。

[0054] 例如Riechmann及Muyldermans,J.Immunol.Methods 231,25-38(1999)的图2中所示,对于骆驼科的VHH结构域所应用的氨基酸残基,根据Kabat等人给出的VH结构域的一般编号法来编号(“Sequence of proteins of immunological interest”,US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,公开案第91号)。根据该编号法,

[0055] -FR1包含在位置1-30处的氨基酸残基,

[0056] -CDR1包含在位置31-35处的氨基酸残基,

[0057] -FR2包含在位置36-49处的氨基酸,

[0058] -CDR2包含在位置50-65处的氨基酸残基,

[0059] -FR3包含在位置66-94处的氨基酸残基,

[0060] -CDR3包含在位置95-102处的氨基酸残基,且

[0061] -FR4包含在位置103-113处的氨基酸残基。

[0062] 然而应注意,如本领域中对于VH结构域及VHH结构域所公知的,各CDR中的氨基酸残基的总数可能不同,且可能不对应于由Kabat编号指示的氨基酸残基的总数(即根据Kabat编号的一个或多个位置可能在实际序列中未被占据,或实际序列可能含有多于Kabat编号所允许数目的氨基酸残基)。这意味着一般而言,根据Kabat的编号可能对应或可能不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。

[0063] 本领域中已知还有对VH结构域的氨基酸残基进行编号的其他系统,如Chothia编号系统。Chothia的氨基酸编号与Kabat相同,但其将对CDR区划分是基于抗体可变区结构中的环(loop)区来进行的,因此在CDR区所包含的氨基酸区域上会与Kabat的有所不同。此外还有AbM编码系统等。所述其他编码系统也可以类似地应用于VHH结构域。然而,除非另有说明,否则在本说明书、权利要求书及附图中,将遵循如上所述的根据Kabat且适于VHH结构域的编号,或者综合Kabat与Chothia的编号。

[0064] VHH结构域中的氨基酸残基的总数将通常在110至120范围内,常常介于112与115之间。然而应注意较小及较长序列也可适于本文所述的目的。

[0065] VHH结构域及含有其的多肽的其他结构特性及功能性质可总结如下:

[0066] VHH结构域(其已经天然“设计”以在不存在轻链可变结构域且不与轻链可变结构域相互作用的情况下与抗原功能性结合)可用作单一且相对较小的功能性抗原结合结构单元、结构域或多肽。此区分VHH结构域与常规4链抗体的VH及VL结构域,这些VH及VL结构域自身通常不适于作为单一抗原结合蛋白或免疫球蛋白单一可变结构域进行实际应用,但需要以某种形式或另一形式组合以提供功能性抗原结合单元(如以诸如Fab片段等常规抗体片段的形式;或以由与VL结构域共价连接的VH结构域组成的scFv的形式)。

[0067] 由于这些独特性质,使用VHH结构域—单独或作为较大多肽的一部分—提供许多优于使用常规VH及VL结构域、scFv或常规抗体片段(例如Fab-或F(ab')₂-片段)的显著优势:仅需要单一结构域以高亲和力及高选择性结合抗原,从而使得既不需要存在两个单独结构域,也不需要确保该两个结构域以适当空间构象及构型存在(例如scFv一般需要使用经特别设计的接头);VHH结构域可自单一基因表达且不需要翻译后折叠或修饰;VHH结构域可容易地改造成多价及多特性格式(格式化);VHH结构域高度可溶且无聚集趋势;VHH结构域对热、pH、蛋白酶及其他变性剂或条件高度稳定,且因此可在制备、储存或运输中不使用冷冻设备,从而达成节约成本、时间及环境;VHH结构域易于制备且相对廉价,甚至在生产所需的规模上亦如此;VHH结构域与常规4链抗体及其抗原结合片段相比相对较小(大约15kDa或大小为常规IgG的1/10),因此相比于常规4链抗体及其抗原结合片段,显示较高的组织渗透性且可以较高剂量给药;VHH结构域可显示所谓腔结合性质(尤其由于与常规VH结构域相比其延长的CDR3环),从而可到达常规4链抗体及其抗原结合片段不可到达的靶及表位。

[0068] 获得结合特定抗原或表位的VHH的方法,先前已公开于以下文献中:R.van der Linden et al.,*Journal of Immunological Methods*,240(2000)185-195;Li et al.,*J Biol Chem.*,287(2012)13713-13721;Deffar et al.,*African Journal of Biotechnology* Vol.8(12),pp.2645-2652,17June,2009;W094/04678;US 7790367,2006-

09-14, METHOD FOR SCREENING A LIBRARY OF VHH POLYPEPTIDES, Casterman, Cecile, Hamers, Raymond; 和 US 7786047, 2006-02-10, IMMUNOGLOBULINS DEVOID OF LIGHT CHAINS, Casterman, Cecile, Hamers, Raymond。

[0069] 此外,本领域技术人员还将了解,有可能将一个或多个上述CDR“移植”于其他“支架”(包括但不限于人支架或非免疫球蛋白支架)上。适于所述CDR移植的支架及技术在本领域中是已知的。

[0070] 如本文所用,术语“表位”或可互换使用的术语“抗原决定簇”指抗体的互补位所结合的抗原上的任何抗原决定簇。抗原决定簇通常包含分子的化学活性表面基团,例如氨基酸或糖侧链,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。例如,表位通常以独特的空间构象包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或非连续的氨基酸,其可以是“线性”表位或“构象”表位。参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed. (1996)。在线性表位中,蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中,相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

[0071] 可使用本领域中熟知的许多表位定位技术鉴别给定抗原的表位。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris,Ed. (1996)。举例而言,线性表位可通过例如以下方法来确定:在固体支持物上同时合成大量肽,其中这些肽对应于蛋白质分子的各部分,且使这些肽在仍然与支持物连接的情况下与抗体反应。这些技术在本领域中为已知的且描述于例如美国专利第4,708,871号;Geysen等人(1984)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:3998-4002;Geysen等人(1986)Molec.Immunol.23:709-715中。类似地,构象表位可通过诸如通过例如x射线结晶学及2维核磁共振确定氨基酸的空间构形加以鉴别。参见例如Epitope Mapping Protocols(同上)。

[0072] 可使用本领域技术人员已知的常规技术,就与相同表位的结合竞争性筛选抗体。例如,可进行竞争和交叉竞争研究,以获得彼此竞争或交叉竞争与抗原结合的抗体。基于它们的交叉竞争来获得结合相同表位的抗体的高通量方法描述于国际专利申请W003/48731中。因此,可使用本领域技术人员已知的常规技术,获得与本发明的抗体分子竞争结合FIX上的相同表位的抗体及其抗原结合片段。

[0073] 一般而言,术语“特异性”是指特定抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单一可变结构域)分子可结合的不同类型抗原或表位的数目。可基于抗原结合分子的亲和力和/或亲合力确定其特异性。由抗原与抗原结合蛋白的解离平衡常数(KD)所表示的亲和力,是表位与抗原结合蛋白上抗原结合位点之间结合强度的量度:KD值越小,表位与抗原结合分子之间的结合强度越强(或者,亲和力也可表示为缔合常数(KA),其为1/KD)。如本领域技术人员将了解,取决于具体感兴趣的抗原,可以以已知方式测定亲和力。亲合力为抗原结合分子(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单一可变结构域或含有其的多肽)与相关抗原之间结合强度的量度。亲合力与以下两者有关:与其抗原结合分子上的抗原结合位点之间的亲和力,以及存在于抗原结合分子上的相关结合位点的数目。

[0074] 如本文所用,术语“FIX结合分子”意指任何能够以高亲和力结合FIX的分子。FIX结合分子可以包括针对FIX的如本文定义的抗体或其缀合物。FIX结合分子还涵盖免疫球蛋白超家族抗体(IgSF)或CDR移植分子。

[0075] “FIX结合分子”或者可以指结合FIX的单价分子(即与FIX的一个表位结合分子),以及二价或多价结合分子(即结合一个以上表位的结合分子)。本发明的“FIX结合分子”可以包含至少一个结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域如VHH。在一些实施方案中,本发明的“FIX结合分子”可以包含两个结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域如VHH。

[0076] 通常,本发明的FIX结合分子将以如通过Biacore或KinExA或生物膜干涉技术(Biolayerinterferometry,BLI)测量的优选 10^{-7} 至 10^{-11} 摩尔/升(M)、更优选 10^{-8} 至 10^{-11} 摩尔/升、甚至更优选 10^{-9} 至 10^{-11} 、甚至更优选 10^{-10} 至 10^{-11} 或更低的解离常数(KD),和/或以至少 10^7M^{-1} 、优选至少 10^8M^{-1} 、更优选至少 10^9M^{-1} ,更优选至少 10^{10}M^{-1} 、例如至少 10^{11}M^{-1} 的缔合常数(KA)结合所要结合的抗原(即FIX)。抗原结合蛋白对抗原或表位的结合可以以已知的任何适合方式来测定,包括例如表面等离子体共振术(SPR)测定、Scatchard测定、生物膜干涉(Bio-Layer Interferometry,BLI)检测、和/或竞争性结合测定(例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)及夹心式竞争性测定。

[0077] 相比于其天然生物来源和/或获得该多肽或核酸分子的反应介质或培养基,当其已与至少一种在该来源或介质(培养基)中通常与之相关的其他组分(例如另一蛋白/多肽、另一核酸、另一生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或微量组分)分离时,多肽或核酸分子视为“基本上分离的”。特别地,多肽或核酸分子在其已纯化至少2倍、特别是至少10倍、更特别是至少100倍且多达1000倍或1000倍以上时被视为“基本上分离的”。经适合的技术(例如适合色谱技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳)确定,“基本上分离的”多肽或核酸分子优选基本上为均质的。

[0078] “亲和力成熟”的抗FIX抗体,特别是VHH或结构域抗体,在一个或多个CDR中具有一个或多个变化,所述变化导致对FIX的亲和力相比于其各自的亲本抗FIX抗体有所增加。亲和力成熟的抗FIX抗体可通过例如由以下所述的本领域中已知的方法来制备: Marks等人, 1992, Biotechnology 10:779-783或Barbas等人, 1994, Proc. Nat. Acad. Sci, USA 91:3809-3813.; Shier等人, 1995, Gene 169:147-155; Yelton等人, 1995, Immunol. 155:1994-2004; Jackson等人, 1995, J. Immunol. 154(7):3310-9; 及Hawkins等人, 1992, J. Mol. Biol. 226(3):889896; KS Johnson及RE Hawkins, “Affinity maturation of antibodies using phage display”, Oxford University Press 1996。

[0079] 本发明的FIX结合分子

[0080] 在第一方面,本发明提供了一种FIX结合分子,其包含至少一个能够结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域。在一些实施方案中,所述FIX结合分子包含一个结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域。在一些实施方案中,所述FIX结合分子包含两个或更多个结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域。在一些实施方式中,本发明所述的FIX的氨基酸序列示于SEQ ID NO:32,其为成熟的人FIX的全长氨基酸序列。

[0081] 在一些实施方案中,所述至少一个免疫球蛋白单一可变结构域包含选自以下的CDR1、CDR2和CDR3:

[0082] (1) SEQ ID NO:1所示的CDR1, SEQ ID NO:2所示的CDR2, SEQ ID NO:3所示的CDR3(对应于抗体株nFN50的CDR);

[0083] (2) SEQ ID NO:4所示的CDR1, SEQ ID NO:5所示的CDR2, SEQ ID NO:6所示的CDR3(对应于抗体株nFN52的CDR);

[0084] (3) SEQ ID NO:7所示的CDR1, SEQ ID NO:8所示的CDR2, SEQ ID NO:9所示的CDR3 (对应于抗体株nFN62的CDR) ;

[0085] (4) SEQ ID NO:10所示的CDR1, SEQ ID NO:11所示的CDR2, SEQ ID NO:12所示的CDR3 (对应于抗体株nFN64的CDR) ;

[0086] (5) SEQ ID NO:13所示的CDR1, SEQ ID NO:14所示的CDR2, SEQ ID NO:15所示的CDR3 (对应于抗体株nFN65的CDR) ;和

[0087] (6) SEQ ID NO:16所示的CDR1, SEQ ID NO:17所示的CDR2, SEQ ID NO:18所示的CDR3 (对应于抗体株nFN69的CDR) 。

[0088] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子中的至少一个免疫球蛋白单一可变结构域是VHH。在一些具体实施方案中,所述VHH包含SEQ ID NO:19-24中任一氨基酸序列。在另一些实施方案中,本发明的FIX结合分子中的VHH包含与SEQ ID NO:19-24中任一具有至少80%、优选地至少90%、更优选地至少95%、甚至更优选地至少99%的序列相同性的氨基酸序列。或者,所述VHH的氨基酸序列与SEQ ID NO:19-24中任一相比包含一或多个氨基酸取代,优选保守氨基酸取代。例如,包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个保守氨基酸取代。

[0089] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子是经过亲和力成熟获得的。经亲和力成熟的FIX结合分子可以在一个或多个CDR中具有一个或多个变化,所述变化导致对FIX的亲和力相比于亲本FIX结合分子有所增加。

[0090] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子,除了至少一个能够特异性结合FIX的免疫球蛋白单一可变结构域外,还包含免疫球蛋白Fc区。在本发明的FIX结合分子中包含免疫球蛋白Fc区可以使所述结合分子形成二聚体。可用于本发明的Fc区可以来自不同亚型的免疫球蛋白,例如,IgG (例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4亚型)、IgA1、IgA2、IgD、IgE或IgM。

[0091] 所述免疫球蛋白Fc区优选是人免疫球蛋白Fc区,更优选是人IgG1的Fc区。在一些具体实施方案中,所述免疫球蛋白Fc区的氨基酸序列示于SEQ ID NO:25。

[0092] 在一些具体实施方案中,本发明的FIX结合分子中,所述免疫球蛋白Fc区(例如人IgG1的Fc区)直接或通过接头(如肽接头)间接连接至所述免疫球蛋白单一可变结构域(如VHH)的C端。

[0093] 在另一方面,本发明的FIX结合分子还涵盖能够与由SEQ ID NO:19-24中任一氨基酸序列组成的VHH结合FIX上的相同表位的抗FIX抗体分子。

[0094] 本发明的所述FIX结合分子结合FIX的KD值可以小于 1×10^{-7} M,优选小于 1×10^{-8} M、更优选小于 1×10^{-9} M、更优选小于 1×10^{-10} M、尤其更优选小于 1×10^{-11} M。

[0095] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子特异性结合FIX,而不结合或以较低的亲和力结合其他凝血因子如FVII、FVIII。

[0096] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子与伽马羧基化程度更高、活性更好的FIX结合更强。

[0097] 此外,本发明的FIX结合分子对酸、碱和/或盐处理具有耐受性。例如,酸(如0.1M乙酸)处理约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约8小时、约16小时、约24小时、约32小时或更久,和/或碱(如0.1M碳酸氢钠)处理约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约8小时、约16小时、约24小时、约32小时或更久,和/或盐(如0.5M氯化钠)处理约1小时、约2小时、约3小时、约4小时、约5小时、约8小时、约16小时、约24小时、约32小时或更久

后,本发明的FIX结合分子活性基本上保持不变。

[0098] 核酸、载体、宿主细胞

[0099] 在另一方面中,本发明涉及编码本发明的FIX结合分子的核酸分子。本发明的核酸可为RNA、DNA或cDNA。根据本发明的一个实施方案,本发明的核酸是基本上分离的核酸。在一些具体实施方式中,编码本发明的FIX结合分子的核酸分子包含SEQ ID NO:26-31中任一的核苷酸序列。

[0100] 本发明的核酸也可呈载体形式,可存在于载体中和/或可为载体的一部分,该载体例如质粒、粘端质粒或YAC。载体可尤其为表达载体,即可提供FIX结合分子体外和/或体内(即在适合宿主细胞、宿主有机体和/或表达系统中)表达的载体。该表达载体通常包含至少一种本发明的核酸,其可操作地连接至一个或多个适合的表达调控元件(例如启动子、增强子、终止子等)。针对在特定宿主中的表达对所述元件及其序列进行选择为本领域技术人员的常识。对本发明的FIX结合分子的表达有用或必需的调控元件及其他元件的具体实例,例如启动子、增强子、终止子、整合因子、选择标记物、前导序列、报告基因。

[0101] 本发明的核酸可基于关于本文给出的本发明的多肽的氨基酸序列的信息通过已知的方式(例如通过自动DNA合成和/或重组DNA技术)制备或获得,和/或可从适合的天然来源加以分离。

[0102] 在另一方面中,本发明涉及表达或能够表达一种或多种本发明的FIX结合分子和/或含有本发明的核酸或载体的宿主细胞。本发明的优选宿主细胞为细菌细胞、真菌细胞或哺乳动物细胞。

[0103] 适合的细菌细胞包括革兰氏阴性细菌菌株(例如大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株、变形杆菌属(*Proteus*)菌株及假单胞菌属(*Pseudomonas*)菌株)及革兰氏阳性细菌菌株(例如芽孢杆菌属(*Bacillus*)菌株、链霉菌属(*Streptomyces*)菌株、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)菌株及乳球菌属(*Lactococcus*)菌株)的细胞。

[0104] 适合的真菌细胞包括木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)及曲菌属(*Aspergillus*)的物种的细胞;或者包括酵母属(*Saccharomyces*)(例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*))、裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)(例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*))、毕赤酵母属(*Pichia*)(例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))及嗜甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)及汉森酵母属(*Hansenula*)的物种的细胞。

[0105] 适合的哺乳动物细胞包括例如HEK293细胞、CHO细胞、BHK细胞、HeLa细胞、COS细胞等。

[0106] 然而,本发明也可使用两栖类细胞、昆虫细胞、植物细胞及本领域中用于表达异源蛋白的任何其他细胞。

[0107] 本发明还提供产生本发明的FIX结合分子的方法,所述方法通常包含以下步骤:

[0108] -在允许表达本发明的FIX结合分子的条件培养本发明的宿主细胞;及

[0109] -从培养物回收由所述宿主细胞表达的FIX结合分子;及

[0110] -任选进一步纯化和/或修饰本发明的FIX结合分子。

[0111] 在一个优选的实施方案中,本发明的FIX结合分子使用哺乳动物细胞产生。本发明的FIX结合分子可以在哺乳动物细胞中获得高表达。例如,表达水平可达大约100mg/L、优选

大约150mg/L、优选大约200mg/L、优选大约300mg/L、更优选大约400mg/L或更优选大约500mg/L或者更高。

[0112] 本发明的FIX结合分子可在如上所述细胞中以细胞内方式(例如在细胞质中、在周质中或在包涵体中)产生,接着从宿主细胞分离且任选进一步纯化;或其可以细胞外方式(例如在培养宿主细胞的培养基中)产生,接着自培养基分离且任选进一步纯化。

[0113] 用于重组产生多肽的方法及试剂,例如特定适合表达载体、转化或转染方法、选择标记物、诱导蛋白表达的方法、培养条件等在本领域中是已知的。类似地,适用于制造本发明的FIX结合分子的方法中的蛋白分离及纯化技术为本领域技术人员所公知。

[0114] 然而,本发明的FIX结合分子也可以通过本领域已知的其它产生蛋白质的方法获得,例如化学合成,包括固相或液相合成。

[0115] FIX检测

[0116] 在另一方面,本发明提供了一种检测靶样品中FIX的存在和/或对样品中FIX定量和/或检测样品中FIX的羧基化水平的方法,所述方法包括:

[0117] a) 在FIX结合分子与FIX之间能够形成复合物的条件下,使所述靶样品和对照样品分别与本发明的FIX结合分子接触;

[0118] b) 检测复合物的形成,

[0119] 其中所述靶样品与对照样品之间复合物形成的差异指示靶样品中FIX的存在和/或量和/或其羧基化水平,优选地,所述对照样品含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX。

[0120] 在一些实施方案中,所述羧基化是伽马羧基化。在一些实施方案中,所述FIX的生物学活性与其羧基化水平正相关。因此,检测样品中FIX的羧基化水平可用于评估样品中的FIX的生物学活性。本发明还涵盖通过检测样品中FIX的羧基化水平来评估样品中的FIX的生物学活性的方法。

[0121] 在一些实施方案中,所述方法还包括通过含有预定量的FIX或含有预定羧基化水平的FIX的对照样品的系列梯度稀释获得标准曲线的步骤。

[0122] 在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子可缀合有可用于检测或可被其他试剂检测到的荧光染料、化学物质、多肽、酶、同位素、标签等。在一个实施方案中,所述检测通过本领域已知的用于免疫检测的方法进行,如蛋白印迹或ELISA。在一些实施方案中,本发明的FIX结合分子可带有人Fc区,因此可以与商品化的二抗配对,用于FIX含量的检测,与商品化FIX检测试剂盒相比成本极大降低。

[0123] 在一些实施方案中,所述靶样品是通过不同方法制备的FIX产品。

[0124] 乏凝血因子IX血浆的制备

[0125] 在另一方面,本发明提供一种制备乏FIX血液样品的方法,包括

[0126] a) 使血液样品与本发明的FIX结合分子接触,从而所述血液样品中的FIX与所述FIX结合分子形成复合物,

[0127] b) 使所述复合物与所述血液样品分离,和

[0128] c) 收获乏FIX血液样品。

[0129] 在一些实施方案中,其中所述FIX结合分子被固定于固体支持物上。在一些实施方案中,所述固体支持物选自:聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、

二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、纤维素乙酸酯、交联的葡聚糖、交联的琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、含氟聚合物和其他合成聚合物，或者磁性介质（如磁珠）。

[0130] 所述固体支持物的表面可以进行官能化或是带有功能基团，以允许本文所述的FIX结合分子的共价或非共价附着。在一些实施方案中，所述固体支持物是用CNBr活化的琼脂糖。在另一些实施方案中，所述固体支持物是链霉亲和素(SA)标记的磁珠。

[0131] 在一些实施方案中，其中所述血液样品是血浆。通过本发明的方法制备的乏FIX血浆特别适合于临床上检测FIX活性。使用乏FIX血浆检测FIX活性的方法是本领域公知的。

[0132] 在另一方面，本发明提供一种FIX亲和层析介质，其包含其上固定有本发明的FIX结合分子的固体支持物。在一些实施方案中，其中所述固体支持物由选自以下的材料制成：聚乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚砜、聚丙烯腈、聚碳酸酯、聚氨酯、二氧化硅、乳胶、玻璃、纤维素、纤维素乙酸酯、交联的葡聚糖、交联的琼脂糖、几丁质、壳聚糖、交联的葡聚糖、交联的海藻酸、硅树脂、含氟聚合物和其他合成聚合物、或是磁性介质(如磁珠)。所述固体支持物可以是过滤器、膜、固体纤维、中空纤维或珠的形式。所述FIX亲和层析介质可以用于分离和制备FIX，或者特别可用于制备乏FIX血液样品如乏FIX血浆。

[0133] 在另一方面，本发明还提供一种用于制备乏FIX血液样品的装置，包含本发明的FIX亲和层析介质。所述装置例如可以是层析柱。

[0134] 试剂盒

[0135] 本发明的范围内还包括试剂盒，该试剂盒包括本发明的FIX结合分子、本发明的FIX亲和层析介质或本发明的装置。试剂盒一般包括表明试剂盒内容物的预期用途(例如，用于检测FIX或其活性，或用于制备乏FIX血浆)的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供的或以其他方式随试剂盒提供的任何书面的或记录的材料。

实施例

[0136] 下面将通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所描述的实施例范围中。

[0137] 实施例1:抗FIX重链单域抗体的筛选

[0138] 1.1. 文库的构建:

[0139] 选取未经免疫过的14只骆驼分离其淋巴细胞，并摘取了5只骆驼的脾脏和8只骆驼的淋巴结，使用QIAGEN公司提供的RNA提取试剂盒提取淋巴细胞和组织总RNA，使用Super-Script III FIRST STRANDSUPERMIX试剂盒按照说明书将提取的RNA全部反转录为cDNA，用巢式PCR扩增编码重链抗体的可变区的核酸片段。

[0140] 回收目标重链单域抗体核酸片段，并使用限制性内切酶(购自NEB) PstI及NotI将其克隆进入噬菌体展示用载体pMECS中。产物随后电转化至大肠杆菌电转感受态细胞TG1中，构建非免疫单域抗体噬菌体展示文库并对文库进行检定。通过梯度稀释铺板，计算库容的大小为 1.4×10^9 。为检测文库的插入率，随机挑选100个克隆测序检测，具有正确的外源片段插入的克隆为99个，正确率为99%。通过对测序克隆的DNA和氨基酸序列分别分析比对，证实所有序列完全不同，均为预期的骆驼VHH序列，其多样性为100%。

[0141] 1.2抗FIX重链单域抗体淘选:

[0142] 以0.5μg/孔的量用重组FIX包被平板,4℃放置过夜。第二天用2%脱脂奶室温封闭2小时后,每孔加入100μl噬菌体($\sim 10^{10} \times 10^{13}$ pfu,来自1.1双峰驼非免疫单域抗体展示文库),在室温下作用2小时。之后用PBST20(PBS中含有0.05%吐温20)洗25遍,以洗掉不结合的噬菌体。最后用甘氨酸(100mM, pH 2.06)将与FIX特异性结合的噬菌体解离,并感染处于生长对数期的大肠杆菌TG1,产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选。上述筛选过程重复3轮。由此,富集阳性的克隆,从而利用噬菌体展示技术筛选抗体库中FIX特异抗体。

[0143] 1.3用酶联免疫方法(ELISA)筛选特异性单个阳性克隆:

[0144] 3轮淘选后,获得的FIX结合阳性的噬菌体感染空白大肠杆菌并铺板。随后挑选95个单菌落接种至2TY-AG,分别培养至OD600约0.8时,加入IPTG终浓度约1mM诱导表达,25℃过夜。单域抗体表达于大肠杆菌周质中,次日收获菌体,并加入TES用渗透压冲击法裂解菌体,上清液用于ELISA检测。用FIX包被平板4℃过夜,将所述上清液(对照组为空白大肠杆菌裂解上清)加入,室温下反应2小时。洗涤之后加入二抗Goat anti-HA tag HRP(购自abcam),室温反应2小时。洗涤之后加入TMB显色液,读取405nm波长吸收值。当样品孔OD值大于对照孔OD值2倍以上时,鉴定为阳性克隆孔。将阳性克隆测序。

[0145] 根据序列比对软件Vector NTI分析各个克隆的氨基酸序列。把CDR1、CDR2、CDR3序列同源性>90%的克隆视为同一抗体株。最终共获得6株不同的抗体,序列见图1,并根据Kabat和Chothia的规则用框标出CDR区。

[0146] 实施例2:通过在哺乳动物细胞中表达制备抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白

[0147] 2.1.制备表达FIX单域抗体-Fc融合蛋白的载体

[0148] 设计引物进行PCR扩增FIX单域抗体VHH片段,与编码人IgG1-Fc的DNA片段(氨基酸序列见图1)融合,并克隆至常规哺乳动物表达载体,获得用于在哺乳动物中表达FIX单域抗体-Fc融合蛋白的重组质粒。其中扩增不同VHH片段使用通用引物,通用引物如下:

[0149] 上游引物cccACCGTTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC (SEQ ID NO:33)

[0150] 下游引物cccGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTGG (SEQ ID NO:34)

[0151] 2.2.制备FIX单域抗体的Fc融合蛋白

[0152] 将2.1构建获得载体转染至HEK293细胞进行抗体的瞬时表达。将重组表达质粒用Freestyle293培养基稀释并加入转化所需聚乙烯亚胺(PEI)溶液,将每组质粒/PEI混合物分别加入HEK293细胞悬液中,放置在37℃,5%CO₂,130rpm培养。四小时后补加EX-CELL293培养基,130rpm悬浮培养。24小时后加3.8mM VPA,72小时后加入4g/L葡萄糖。培养5~6天后,收集瞬时表达培养上清液,通过Protein A亲和层析法,纯化目标FIX单域抗体-Fc融合蛋白。通过SDS-PAGE以及SEC-HPLC检测所获得的蛋白质的纯度。经SDS-PAGE检测发现nFN50-FC大多以聚体的形式存在。因此,将nFN50-FC从后续试验中排除。其余各蛋白质的瞬转结果如表1所示。

[0153] 表1:所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白瞬转后一步纯化结果。

[0154]

抗体	表达量 (mg/L)	SDS-PAGE纯度	单体比例%
nFN 65-FC	318	>95%	98.751
nFN 62-FC	402	>95%	99.713
nFN 52-FC	351	>95%	99.710
nFN 64-FC	409	>95%	95.242

nFN 69-FC	428	>95%	95.319
-----------	-----	------	--------

[0155] FIX单域抗体-Fc融合蛋白表达量均在300mg/L以上,且经过Protein A亲和层析柱一步纯化后,获得了具有稳定浓度以及高纯度的目的蛋白质。

[0156] 实施例3:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FIX的结合曲线

[0157] 通过ELISA研究抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FIX的结合曲线。

[0158] 以0.2 μ g/孔的量用重组人FIX蛋白包被平板4 $^{\circ}$ C过夜。将实施例2所得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白进行梯度稀释(10 \times),并在室温下与包被的平板反应2小时。洗涤之后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG-Fc抗体(Sigma)),室温反应2小时。洗涤之后加入显色液,读取450nm和650nm波长的吸收值,450nm波长的吸收值减去650nm波长的吸收值为最终的吸收值。

[0159] 应用软件SoftMax Pro v5.4进行数据处理和作图分析。通过四参数拟合,得到抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与重组人FIX蛋白结合的结合曲线及EC50值(所有抗体的EC50值均为约50ng/mL)。反映抗体对FIX的亲和能力。

[0160] 结果见图2,其中纵坐标为OD值,横坐标为抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的浓度(单位ng/mL);圆形、方形、正三角、菱形、圆圈分别代表抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白:nFN52-FC、nFN64-FC、nFN69-FC、nFN62-FC、nFN65-FC。五种蛋白对FIX均有很高的亲和力,且它们的亲和力相当。

[0161] 实施例4:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的选择特异性

[0162] 通过ELISA研究抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的选择特异性。

[0163] 以0.5 μ g/孔的量分别用人FIX、FVII、FVIII、TFPI蛋白包被平板4 $^{\circ}$ C过夜,每孔加入0.5 μ g实施例2所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白(对照组为空白缓冲液),室温下反应2小时。洗涤之后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG-Fc抗体(Sigma)),室温反应2小时。洗涤之后加入显色液,读取405nm波长的吸收值。结果如表2所示。

[0164] 表2:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与人FIX及其同族蛋白的结合。

抗体	OD(对人FIX)	OD(对人FVII)	OD(对人FVIII)	OD(对人TFPI)
nFN52-FC	2.272	1.045	0.046	0.034
nFN62-FC	2.285	0.798	0.04	0.028
nFN64-FC	2.379	2.048	0.113	0.077
nFN65-FC	2.312	0.083	0.046	0.036
nFN69-FC	1.975	0.881	0.054	0.032
空白	0.042	0.037	0.031	0.022

[0166] 可见,所有获得的FIX单域抗体Fc融合蛋白不结合人FVIII和TFPI蛋白,其中nFN52/62/64/69-FC同时结合人FIX和FVII蛋白,nFN65-FC只结合人FIX蛋白而不结合人FVII蛋白。

[0167] 实施例5:检测FIX单域抗体-Fc融合蛋白与空细胞的非特异结合

[0168] CHOK1空细胞和293F空细胞重悬于3%BSA-PBS,调整细胞数至 6×10^6 细胞/mL,分别加入实施例2所获得的FIX单域抗体-Fc融合蛋白,终浓度为20 μ g/mL,同时设置阴性对照和空白对照,冰浴60min。洗涤后加入二抗APC抗人IgG-Fc抗体(Biolegend),冰浴30min。洗涤后将细胞重悬于500 μ L含有1%BSA的PBS缓冲液中,以流式细胞仪进行检测。结果如表3所

示。

[0169] 表3:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与CHOK1和293F空细胞的结合。

抗体	MFI (对CHOK1细胞)	MFI (对293F细胞)
nFN52-FC	5.86	5.16
nFN64-FC	6.86	5.82
nFN69-FC	4.57	4.6
nFN62-FC	4.88	4.36
nFN65-FC	5.12	5.16
空白对照	4.28	4.01
阴性对照	4.25	4.12

[0171] 可见,抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与CHOK1和293F空细胞结合的平均荧光强度值与空白对照和阴性对照没有显著性差异,显示抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与CHOK1和293F空细胞均没有非特异性结合。

[0172] 实施例6:检测抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的亲和力

[0173] 通过生物膜干涉 (Biolayerinterferometry, BLI) 技术,检测实施例2所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与重组人FIX的结合动力学。该检测使用分子相互作用仪进行。

[0174] 将抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-FC、nFN64-FC、nFN69-FC稀释至终浓度20 μ g/mL,固定化到AHC生物传感器上,对动力学进行测量。将人FIX、FVII蛋白用0.02%PBST20分别稀释至5个浓度:1000nM、500nM、250nM、125nM、62.5nM。进样120s,解离时间为300s。用10mM甘氨酸-HCl (pH1.7) 再生5s。使用简单一对一Languir结合模型 (Octet K2数据分析软件9.0版 (Data analysis 9.0)),计算结合速率 (kon) 和解离速率 (kdis)。以kdis/kon比率计算平衡解离常数 (kD)。

[0175] 所测量的融合蛋白与FIX结合的亲和力示于表4,与FVII结合的亲和力示于表5。结果表明抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-FC、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN69-FC与FIX结合比与FVII结合的亲和力更高,nFN65-FC只与FIX结合。

[0176] 表4:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FIX结合的亲和力。

抗体	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
nFN52-FC	3.02E-09	8.55E+04	2.58E-04
nFN64-FC	5.73E-09	7.18E+04	4.11E-04
nFN69-FC	7.91E-10	6.03E+04	4.77E-05
nFN62-FC	4.77E-09	1.08E+05	5.16E-04
nFN65-FC	6.24E-09	6.94E+04	4.33E-04

[0178] 表5:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FVII结合的亲和力。

抗体	KD (M)	kon (1/Ms)	kdis (1/s)
nFN52-FC	7.62E-09	8.31E+04	6.33E-04
nFN64-FC	1.58E-08	6.71E+04	1.06E-03
nFN69-FC	7.94E-09	2.63E+04	2.09E-04
nFN62-FC	1.50E-08	3.58E+04	5.38E-04

nFN65-FC	NA	NA	NA
----------	----	----	----

[0180] 通过蛋白印迹检测抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白对FIX或FVII的识别情况。

[0181] 将重组人FIX和FVII分别加入非还原性上样缓冲液,然后沸水浴处理使蛋白质充分变性。进行SDS-PAGE,上样量0.5 μ g蛋白质。通过半干转的方法将蛋白转印至甲醇活化的PVDF膜上。用0.05%TBST20洗膜后,用5%的脱脂奶粉对膜进行封闭,室温2h。用0.05%TBST20洗膜后。分别将实施例2中所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-FC、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC在0.05%TBST20中稀释,终浓度为2.5 μ g/mL。将膜与经稀释的融合蛋白室温孵育2h,洗膜后加入HRP标记的二抗室温孵育2h。洗膜后加入ECL底物显色液显色,凝胶成像系统曝光成像,结果如图3所示。

[0182] 图3显示,抗体nFN65-FC只与FIX结合,其余的抗体nFN52-FC、nFN64-FC、nFN69-FC、nFN62-FC同时结合FVII和FIX,与前述检测结果一致。

[0183] FVII和FIX氨基酸序列进行比对结果表明,其羧基化区域同源性高。考虑到FIX活性与羧基化程度相关,蛋白印迹进一步验证抗体与不同活性FIX结合情况。

[0184] 通过APTT(活化部分凝血活酶时间)法,对BeneFIX药品,以及发明人自行生产的、不同修饰程度的重组人FIX蛋白293DS-1、CHODS-1进行测活。得到结果:对照标BeneFIX活性为标准品的150%时,重组人FIX蛋白293DS-1、CHODS-1的活性分别为89.3%、138.6%。将重组人FIX蛋白293DS-1、CHODS-1,加入非还原性上样缓冲液后,沸水浴处理,使蛋白质充分变性。进行SDS-PAGE,上样量0.5 μ g。通过半干转的方法将蛋白转印至甲醇活化的PVDF膜上。用0.05%TBST20洗膜后,用5%的脱脂奶粉对膜进行封闭,室温2h。用0.05%TBST20洗膜后。分别将实施例2中所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-FC、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC在0.05%TBST20中稀释,终浓度为2.5 μ g/mL。将膜与经稀释的融合蛋白室温孵育2h,洗膜后加入HRP标记的二抗室温孵育2h。洗膜后加入ECL底物显色液显色,凝胶成像系统曝光成像,结果如图4所示。

[0185] 图4显示,nFN69-FC与不同活性的FIX结合有明显的差异,与修饰程度以及活性较好的FIX CHODS-1结合较好,与修饰程度以及活性较差的FIX 293DS-1结合较差。

[0186] 接着进一步验证nFN69-FC与不同羧基化的FIX结合情况。

[0187] 对照BeneFIX羧基化修饰为12.451/mol时,其他重组人FIX蛋白KN020Ko-A14、KN020Ko-A21、KN020BAP150619的羧基化修饰分别为12.046/mol、10.785/mol、7.488/mol。将不同羧基化水平的重组人FIX蛋白KN020Ko-A14、KN020Ko-A21、KN020BAP150619加入非还原性上样缓冲液后沸水浴处理,使蛋白质充分变性。进行SDS-PAGE,上样量0.5 μ g。通过半干转的方法将蛋白转印至甲醇活化的PVDF膜上。用0.05%TBST20洗膜后,用5%的脱脂奶粉对膜进行封闭,室温2h。用0.05%TBST20洗膜后。分别将实施例2中所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-FC、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC在0.05%TBST20中稀释,终浓度为2.5 μ g/mL。将膜与经稀释的融合蛋白室温孵育2h,洗膜后加入HRP标记的二抗室温孵育2h。洗膜后加入ECL底物显色液显色,凝胶成像系统曝光成像,结果如图5。

[0188] 图5显示,nFN69-FC与不同羧基化的FIX结合有明显的差异,羧基化程度越高,其结合越好,显色越深。

[0189] 实施例8:抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的酸碱稳定性研究

[0190] 分别在以下三种条件下处理实施例2所得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白,考察其

对酸碱的耐受性及稳定性：(1) 0.1M NaHCO₃+0.5M NaCl, pH8.3, 4℃处理过夜, (2) 0.1M乙酸+0.5M NaCl, pH4.0, 室温处理3h, (3) 0.1M乙酸+0.5M NaCl, pH4.0室温处理3h, 然后0.1M NaHCO₃+0.5M NaCl, pH8.3, 4℃处理过夜。

[0191] 将经处理的融合蛋白换液至1×PBS中, 以Nanodrop测定PBS中的融合蛋白的浓度。通过SEC检测经处理的融合蛋白的纯度。

[0192] 通过ELISA检测其与抗原FIX结合活性。具体而言, 以0.2μg/孔的量用重组人FIX包被平板4℃过夜。将经处理的融合蛋白梯度稀释, 在室温下与包被的平板反应2小时。洗涤之后加入二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗人IgG-Fc抗体(Sigma)), 室温反应2小时。洗涤之后加入显色液, 读取450nm和650nm波长的吸收值, 450nm波长的吸收值减去650nm波长的吸收值为最终的吸收值。应用软件SoftMax Pro v5.4进行数据处理和作图分析, 通过四参数拟合, 得到经处理的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FIX结合的结合曲线及EC50值。反映抗体对FIX的亲合能力。结果如表6所示。

[0193] 表6: 经处理的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白与FIX的结合。

抗体	EC50(原样)	EC50 (pH 4.0 3h)	EC50 (pH 8.3过夜)	EC50 (pH 4.0 3h后pH 8.3过夜)
nFN52-Fc	71ng/mL	62.9ng/mL	66ng/mL	65.5ng/mL
nFN64-Fc	66.6ng/mL	73.2ng/mL	74.8ng/mL	75.4ng/mL
nFN69-Fc	95ng/mL	78.5ng/mL	78.9ng/mL	72.4ng/mL
nFN62-Fc	67ng/mL	68.5ng/mL	69.3ng/mL	67.8ng/mL
nFN65-Fc	69.5ng/mL	72ng/mL	70ng/mL	70.3ng/mL

[0195] 可见, 经酸和/或碱处理后的抗体nFN52-Fc、nFN64-Fc、nFN69-Fc、nFN62-Fc、nFN65-Fc与FIX结合的结合活性均很好, 与处理前相比较没有显著差异。

[0196] 将经处理的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白分别用0.22μm水膜过滤。将经过滤的融合蛋白进行SEC-HPLC分析。SEC-HPLC参数如下: 进样量50μg, 色谱柱为TOSOH G3000SWXL 7.8×300mm, 5μm和保护柱为TOSOH TSK gel guardcolumn SWXL 6.0×40mm, 7μm, 流动相为20mM Na₂HPO₄+300mM NaCl pH7.4, 流速为0.5mL/min, 洗脱时间45min, 检测波长280nm。结果如表7所示。

[0197] 表7: 经处理的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白的SEC-HPLC分析。

抗体	单体比例(原样)%	单体比例(pH 4.0 3h)%	单体比例(pH 8.3 过夜)%	单体比例(pH 4.0 3h 后 pH 8.3 过夜)%
nFN52-FC	97.87	97.3	98.17	98.12
nFN64-FC	96.64	96.08	96.63	96.47
nFN69-FC	98.37	97.66	98.08	99.25
nFN62-FC	97.72	97.32	98.11	97.35
nFN65-FC	98.26	98.15	97.46	98.06

[0199] 由SEC结果可知, 经酸碱条件处理的抗体, 其主峰百分比与处理前没有明显变化, 表明融合抗体的耐酸碱能力强, 稳定性好。

[0200] 实施例9: 制备乏FIX血浆

[0201] 9.1. 制备抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白亲和纯化介质

[0202] 发明人尝试了两种不同的亲和纯化介质。

[0203] I. 使用琼脂糖介质偶联FIX单域抗体-Fc融合蛋白。

[0204] 将实施例2所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-Fc、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC使用3KDa的超滤管换液至0.2M NaHCO₃ 0.5M NaCl, pH8.3的溶液中。

[0205] 以3mg/mL的载量将所述融合蛋白与经CNBr预活化的琼脂糖介质偶联,4℃过夜。然后,用0.05M、pH8.0的Tris-HCl和0.2M、pH4.0的醋酸缓冲液交替淋洗经偶联的介质,然后用PBS平衡,获得抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白亲和层析介质。

[0206] II. 使用链霉亲和素(streptavidin)标记的微磁珠固定生物素标记的FIX单域抗体-Fc融合蛋白。

[0207] 将实施例2所获得的抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白nFN52-Fc、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC使用EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin试剂盒(Thermo)标记生物素。

[0208] 以0.1mg/mL的载量将上述生物素标记的融合蛋白与PBS处理过的Dynabeads™ M-280Streptavidin磁珠(Thermo)室温孵育半小时,之后用磁力架除去上清中没有偶联上的蛋白,获得FIX单域抗体-Fc融合蛋白标记的磁珠。

[0209] 9.2. 以FIX单域抗体-Fc融合蛋白-琼脂糖介质或者FIX单域抗体-Fc融合蛋白-磁珠处理全人血浆制备乏FIX血浆,并验证

[0210] 将人标准血浆加载于如上获得的融合蛋白-琼脂糖介质,或者磁珠,室温温和振荡孵育2h。同时以未偶联的琼脂糖介质或者磁珠处理血浆作为负对照(分别标记为负对照1、负对照2)。之后通过离心或者磁力架去除介质或者磁珠,获得经过处理的血浆上清。

[0211] 使用APTT的方法检测处理过的血浆上清中FIX的活性。将经处理的血浆上清上样至全自动凝血仪,与Dade Actin Activated Cephaloplastin Reagent、Calcium Chloride Solution和FACTOR IX DEFICIENT试剂自动混合、孵育后,在波长660nm处检测其吸光值,同时用标准品设置标准曲线(log凝血时间对log浓度百分比)。结果如表8所示。

[0212] 表8:

样品	凝血时间(s)	相对标准品活性%
负对照1	68.3	91.2
经nFN52-FC琼脂糖处理的乏FIX血浆	103.2	4.6
经nFN62-FC琼脂糖处理的乏FIX血浆	99.7	6.3
经nFN64-FC琼脂糖处理的乏FIX血浆	102.6	4.8
经nFN65-FC琼脂糖处理的乏FIX血浆	102.8	4.8
经nFN69-FC琼脂糖处理的乏FIX血浆	104.5	4.1
负对照2	66.5	97.1
经nFN52-FC磁珠处理的乏FIX血浆	100.1	5.8
经nFN62-FC磁珠处理的乏FIX血浆	101.3	5.1
经nFN64-FC磁珠处理的乏FIX血浆	98.3	7.5
经nFN65-FC磁珠处理的乏FIX血浆	99.1	6.8
经nFN69-FC磁珠处理的乏FIX血浆	102.8	4.8

[0214] 结果显示,与对照组相比,以nFN52-FC、nFN62-FC、nFN64-FC、nFN65-FC、nFN69-FC标记亲和层析介质或者磁珠处理血浆后,其APTT时间极大的延长,说明血浆中的内源FIX基本被介质或者磁珠捕获并去除。由此,本发明证明能够使用上述抗FIX单域抗体-Fc融合蛋白制备乏凝血因子IX血浆。

[0215] 序列表:

[0216] >SEQ ID NO:1

- [0217] GYTYSRYCMG
- [0218] >SEQ ID NO:2
- [0219] AICTGGGSTYYADSVKG
- [0220] >SEQ ID NO:3
- [0221] YVGSDCGNAGRAY
- [0222] >SEQ ID NO:4
- [0223] GDISKVASMA
- [0224] >SEQ ID NO:5
- [0225] GLSIGTGRITYYADSVKG
- [0226] >SEQ ID NO:6
- [0227] VVAGVKY
- [0228] SEQ ID NO:7
- [0229] GDISKVASMA
- [0230] >SEQ ID NO:8
- [0231] GLSIGTGRITYYADSVKG
- [0232] >SEQ ID NO:9
- [0233] KGDQRFGGYLD
- [0234] >SEQ ID NO:10
- [0235] GDISKVASMA
- [0236] >SEQ ID NO:11
- [0237] GLSIGTGRITYYADSVKG
- [0238] >SEQ ID NO:12
- [0239] VTRWPPLAGGNWPAKY
- [0240] >SEQ ID NO:13
- [0241] LHNTNINAMA
- [0242] >SEQ ID NO:14
- [0243] ALLTRGGNTWYDDSVKG
- [0244] >SEQ ID NO:15
- [0245] VRRRDGYKY
- [0246] >SEQ ID NO:16
- [0247] GDISKVASMA
- [0248] >SEQ ID NO:17
- [0249] GLSIGTGRITYYADSVKG
- [0250] >SEQ ID NO:18
- [0251] NDQRRARY
- [0252] >SEQ ID NO:19 nFN50
- [0253] QVQLQESGGGVSQAGGSLRLSCVGSGYTYSRYCMGWFRQAPGKEREVAVAICTGGGSTYYADS
VKGRFTISQDKSKNTVYLQMNLSKPEDTALYYCKLYVGSDCGNAGRAYWGQGTQVTSS
- [0254] >SEQ ID NO:20 nFN52

[0255] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS[GDISKVASMA]WFRQAPLKEREGVA[GLSIGTGRITYYADSV]
[KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAT][VAVGVKY]RGQGTQVTVSS

[0256] >SEQ ID NO:21 nFN62

[0257] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS[GDISKVASMA]WFRQAPLKEREGVA[GLSIGTGRITYYADSV]
[KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAMYYCAA][KGDQRFGGYLD]WGQGTQVTVSS

[0258] >SEQ ID NO:22 nFN64

[0259] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS[GDISKVASMA]WFRQAPLKEREGVA[GLSIGTGRITYYADSV]
[KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTEDTAIYYCAL][VTRWPPLAGGNWPAKY]WGQGTQVTVSS

[0260] >SEQ ID NO:23 nFN65

[0261] QVQLQESGGGSVQAGGSLTSCAYS[LHNTNINAMA]WFRQTPGKEREGVA[ALLTRGGNTWYDDS]
[VKG]RFTISRDNAKNTVYLQMDLKPEDTAVYYCAA[VRRRDGYKY]WGQGTQVTVSS

[0262] >SEQ ID NO:24 nFN69

[0263] QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS[GDISKVASMA]WFRQAPLKEREGVA[GLSIGTGRITYYADSV]
[KGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKTEDTAIYYCA][NDQRRARY]WGQGTQVTVSS

[0264] >SEQ ID NO:25 IgG1-FC

[0265] EPKSCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV
HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN
QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

[0266] >SEQ ID NO:26 nFN50

[0267] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTGTA
GGCTCTGGATACACCTACAGTAGTACTGCATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGC
AGCTATTTGTACTGGCGGTGGTAGTACGTACTATGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAAGACAAGT
CGAAGAACACGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCCTGTATTACTGTAAATTGTACGTT
GGTAGTGATTGTGAAACGCTGGCCGTGTTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0268] >SEQ ID NO:27nFN52

[0269] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GGCTCTGGAGACATCAGTAAGGTAGCTTCAATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCATTGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGC
CGGTTTAAGTATTGGTACAGGTAGGACATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG
CCAAGAATACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACAGCCGTATATTACTGCGCCACAGTGGTA
GCTGGCGTGAAGTACCGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0270] >SEQ ID NO:28nFN62

[0271] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GGCTCTGGAGACATCAGTAAGGTAGCTTCAATGGCCTGGTCCGCCAGGCTCCATTGAAGGAGCGCGAGGGGGTCGC
CGGTTTAAGTATTGGTACAGGTAGGACATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCAGACAACG
CCAAGAATACGCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACTGCCATGTACTACTGTGCGGCAAAAGGC
GACCAGCGTTTTGGAGGATATCTTGACTGGGGTCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0272] >SEQ ID NO:29nFN64

[0273] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA

GGCTCTGGAGACATCAGTAAGGTAGCTTCAATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCATTGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC
CGGTTTAAGTATTGGTACAGGTAGGACATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACG
CCAAGAATACGCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAAGTGGAGGACACTGCCATATACTACTGTGCGCTCGTGACG
AGGTGGCCTCCTCTCGCCGGTGGCAACTGGCCAGCTAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0274] >SEQ ID NO:30nFN65

[0275] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATCGGTGCAGGCTGGAGGATCTCTGACGCTCTCCTGTGCA
TACTCTCTGCACAACACCAATATCAACGCCATGGCCTGGTTCCGCCAGACTCCAGGCAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC
TGCTCTTCTCACTCGTGGTGGCAATACATGGTATGACGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACG
CCAAGAACACGGTGTATCTACAAATGGATGACCTGAAACCTGAGGACACTGCCGTGTACTACTGTGCGGCAGTCCGG
AGAAGGGATGGATATAAGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0276] >SEQ ID NO:31nFN69

[0277] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGAGGAGGCTCGGTGCAGGCTGGAGGGTCTCTGAGACTCTCCTGTACA
GGCTCTGGAGACATCAGTAAGGTAGCTTCAATGGCCTGGTTCCGCCAGGCTCCATTGAAGGAGCGCGAGGGGGTTCGC
CGGTTTAAGTATTGGTACAGGTAGGACATACTACGCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCCGAGACAACG
CCAAGAATACGCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAAAAGTGGAGGACACTGCCATATACTACTGTGCGTATAATGAT
CAGCGTCGTGCACGGTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATC

[0278] >SEQ ID NO:32mature FIX

[0279] YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSY
ECWCPFGFEGKNCDELDTVCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRA
ETVFPDVEDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCV
ETGVKITVVAGEHNIEETEHEQKRNVIIRIPHHYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLSYVTPICIAADKEYTNIFL
KFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHGGDRDSCQGDSGGPHVTEVEGTS
FLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKETKLT

[0280] >SEQ ID NO:33上游引物

[0281] cccACCGGTCAGGTGCAGCTGCAGGAGTC

[0282] >SEQ ID NO:34下游引物

[0283] cccGGATCCTGAGGAGACGGTGACCTGG

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 苏州康宁杰瑞生物科技有限公司
- [0003] <120> 针对凝血因子IX (FIX)的单域抗体
- [0004] <130> I2018TC2110CB
- [0005] <160> 34
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 10
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <223> Artificial sequence
- [0013] <400> 1
- [0014] Gly Tyr Thr Tyr Ser Arg Tyr Cys Met Gly
- [0015] 1 5 10
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 17
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> Artificial Sequence
- [0020] <220>
- [0021] <223> Artificial sequence
- [0022] <400> 2
- [0023] Ala Ile Cys Thr Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [0024] 1 5 10 15
- [0025] Gly
- [0026] <210> 3
- [0027] <211> 13
- [0028] <212> PRT
- [0029] <213> Artificial Sequence
- [0030] <220>
- [0031] <223> Artificial sequence
- [0032] <400> 3
- [0033] Tyr Val Gly Ser Asp Cys Gly Asn Ala Gly Arg Ala Tyr
- [0034] 1 5 10
- [0035] <210> 4
- [0036] <211> 10
- [0037] <212> PRT
- [0038] <213> Artificial Sequence

- [0039] <220>
[0040] <223> Artificial sequence
[0041] <400> 4
[0042] Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala Ser Met Ala
[0043] 1 5 10
[0044] <210> 5
[0045] <211> 17
[0046] <212> PRT
[0047] <213> Artificial Sequence
[0048] <220>
[0049] <223> Artificial sequence
[0050] <400> 5
[0051] Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
[0052] 1 5 10 15
[0053] Gly
[0054] <210> 6
[0055] <211> 7
[0056] <212> PRT
[0057] <213> Artificial Sequence
[0058] <220>
[0059] <223> Artificial sequence
[0060] <400> 6
[0061] Val Val Ala Gly Val Lys Tyr
[0062] 1 5
[0063] <210> 7
[0064] <211> 10
[0065] <212> PRT
[0066] <213> Artificial Sequence
[0067] <220>
[0068] <223> Artificial sequence
[0069] <400> 7
[0070] Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala Ser Met Ala
[0071] 1 5 10
[0072] <210> 8
[0073] <211> 17
[0074] <212> PRT
[0075] <213> Artificial Sequence
[0076] <220>
[0077] <223> Artificial sequence

[0078] <400> 8
 [0079] Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0080] 1 5 10 15
 [0081] Gly
 [0082] <210> 9
 [0083] <211> 11
 [0084] <212> PRT
 [0085] <213> Artificial Sequence
 [0086] <220>
 [0087] <223> Artificial sequence
 [0088] <400> 9
 [0089] Lys Gly Asp Gln Arg Phe Gly Gly Tyr Leu Asp
 [0090] 1 5 10
 [0091] <210> 10
 [0092] <211> 10
 [0093] <212> PRT
 [0094] <213> Artificial Sequence
 [0095] <220>
 [0096] <223> Artificial sequence
 [0097] <400> 10
 [0098] Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala Ser Met Ala
 [0099] 1 5 10
 [0100] <210> 11
 [0101] <211> 17
 [0102] <212> PRT
 [0103] <213> Artificial Sequence
 [0104] <220>
 [0105] <223> Artificial sequence
 [0106] <400> 11
 [0107] Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0108] 1 5 10 15
 [0109] Gly
 [0110] <210> 12
 [0111] <211> 16
 [0112] <212> PRT
 [0113] <213> Artificial Sequence
 [0114] <220>
 [0115] <223> Artificial sequence
 [0116] <400> 12

[0117] Val Thr Arg Trp Pro Pro Leu Ala Gly Gly Asn Trp Pro Ala Lys Tyr
 [0118] 1 5 10 15
 [0119] <210> 13
 [0120] <211> 10
 [0121] <212> PRT
 [0122] <213> Artificial Sequence
 [0123] <220>
 [0124] <223> Artificial sequence
 [0125] <400> 13
 [0126] Leu His Asn Thr Asn Ile Asn Ala Met Ala
 [0127] 1 5 10
 [0128] <210> 14
 [0129] <211> 17
 [0130] <212> PRT
 [0131] <213> Artificial Sequence
 [0132] <220>
 [0133] <223> Artificial sequence
 [0134] <400> 14
 [0135] Ala Leu Leu Thr Arg Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Asp Asp Ser Val Lys
 [0136] 1 5 10 15
 [0137] Gly
 [0138] <210> 15
 [0139] <211> 9
 [0140] <212> PRT
 [0141] <213> Artificial Sequence
 [0142] <220>
 [0143] <223> Artificial sequence
 [0144] <400> 15
 [0145] Val Arg Arg Arg Asp Gly Tyr Lys Tyr
 [0146] 1 5
 [0147] <210> 16
 [0148] <211> 10
 [0149] <212> PRT
 [0150] <213> Artificial Sequence
 [0151] <220>
 [0152] <223> Artificial sequence
 [0153] <400> 16
 [0154] Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala Ser Met Ala
 [0155] 1 5 10

[0156] <210> 17
 [0157] <211> 17
 [0158] <212> PRT
 [0159] <213> Artificial Sequence
 [0160] <220>
 [0161] <223> Artificial sequence
 [0162] <400> 17
 [0163] Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0164] 1 5 10 15
 [0165] Gly
 [0166] <210> 18
 [0167] <211> 8
 [0168] <212> PRT
 [0169] <213> Artificial Sequence
 [0170] <220>
 [0171] <223> Artificial sequence
 [0172] <400> 18
 [0173] Asn Asp Gln Arg Arg Ala Arg Tyr
 [0174] 1 5
 [0175] <210> 19
 [0176] <211> 122
 [0177] <212> PRT
 [0178] <213> Artificial Sequence
 [0179] <220>
 [0180] <223> Artificial sequence
 [0181] <400> 19
 [0182] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0183] 1 5 10 15
 [0184] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Gly Ser Gly Tyr Thr Tyr Ser Arg Tyr
 [0185] 20 25 30
 [0186] Cys Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0187] 35 40 45
 [0188] Ala Ala Ile Cys Thr Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0189] 50 55 60
 [0190] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Asp Lys Ser Lys Asn Thr Val Tyr
 [0191] 65 70 75 80
 [0192] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
 [0193] 85 90 95
 [0194] Lys Leu Tyr Val Gly Ser Asp Cys Gly Asn Ala Gly Arg Ala Tyr Trp

[0195]		100		105		110
[0196]	Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser					
[0197]		115		120		
[0198]	<210> 20					
[0199]	<211> 116					
[0200]	<212> PRT					
[0201]	<213> Artificial Sequence					
[0202]	<220>					
[0203]	<223> Artificial sequence					
[0204]	<400> 20					
[0205]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly					
[0206]	1	5		10		15
[0207]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala					
[0208]		20		25		30
[0209]	Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Leu Lys Glu Arg Glu Gly Val					
[0210]		35		40		45
[0211]	Ala Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val					
[0212]		50		55		60
[0213]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr					
[0214]		65		70		75
[0215]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys					
[0216]		85		90		95
[0217]	Ala Thr Val Val Ala Gly Val Lys Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val					
[0218]		100		105		110
[0219]	Thr Val Ser Ser					
[0220]		115				
[0221]	<210> 21					
[0222]	<211> 120					
[0223]	<212> PRT					
[0224]	<213> Artificial Sequence					
[0225]	<220>					
[0226]	<223> Artificial sequence					
[0227]	<400> 21					
[0228]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly					
[0229]	1	5		10		15
[0230]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala					
[0231]		20		25		30
[0232]	Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Leu Lys Glu Arg Glu Gly Val					
[0233]		35		40		45

[0234]	Ala Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0235]	50 55 60
[0236]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[0237]	65 70 75 80
[0238]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0239]	85 90 95
[0240]	Ala Ala Lys Gly Asp Gln Arg Phe Gly Gly Tyr Leu Asp Trp Gly Gln
[0241]	100 105 110
[0242]	Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0243]	115 120
[0244]	<210> 22
[0245]	<211> 125
[0246]	<212> PRT
[0247]	<213> Artificial Sequence
[0248]	<220>
[0249]	<223> Artificial sequence
[0250]	<400> 22
[0251]	Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
[0252]	1 5 10 15
[0253]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala
[0254]	20 25 30
[0255]	Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Leu Lys Glu Arg Glu Gly Val
[0256]	35 40 45
[0257]	Ala Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
[0258]	50 55 60
[0259]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
[0260]	65 70 75 80
[0261]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
[0262]	85 90 95
[0263]	Ala Leu Val Thr Arg Trp Pro Pro Leu Ala Gly Gly Asn Trp Pro Ala
[0264]	100 105 110
[0265]	Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
[0266]	115 120 125
[0267]	<210> 23
[0268]	<211> 118
[0269]	<212> PRT
[0270]	<213> Artificial Sequence
[0271]	<220>
[0272]	<223> Artificial sequence

[0273] <400> 23
 [0274] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0275] 1 5 10 15
 [0276] Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Tyr Ser Leu His Asn Thr Asn Ile Asn
 [0277] 20 25 30
 [0278] Ala Met Ala Trp Phe Arg Gln Thr Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0279] 35 40 45
 [0280] Ala Ala Leu Leu Thr Arg Gly Gly Asn Thr Trp Tyr Asp Asp Ser Val
 [0281] 50 55 60
 [0282] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0283] 65 70 75 80
 [0284] Leu Gln Met Asp Asp Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0285] 85 90 95
 [0286] Ala Ala Val Arg Arg Arg Asp Gly Tyr Lys Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0287] 100 105 110
 [0288] Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0289] 115
 [0290] <210> 24
 [0291] <211> 117
 [0292] <212> PRT
 [0293] <213> Artificial Sequence
 [0294] <220>
 [0295] <223> Artificial sequence
 [0296] <400> 24
 [0297] Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Ala Gly Gly
 [0298] 1 5 10 15
 [0299] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Gly Ser Gly Asp Ile Ser Lys Val Ala
 [0300] 20 25 30
 [0301] Ser Met Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Leu Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0302] 35 40 45
 [0303] Ala Gly Leu Ser Ile Gly Thr Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 [0304] 50 55 60
 [0305] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0306] 65 70 75 80
 [0307] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
 [0308] 85 90 95
 [0309] Ala Tyr Asn Asp Gln Arg Arg Ala Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
 [0310] 100 105 110
 [0311] Val Thr Val Ser Ser

[0312]	115
[0313]	<210> 25
[0314]	<211> 232
[0315]	<212> PRT
[0316]	<213> Artificial Sequence
[0317]	<220>
[0318]	<223> Artificial sequence
[0319]	<400> 25
[0320]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala
[0321]	1 5 10 15
[0322]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
[0323]	20 25 30
[0324]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
[0325]	35 40 45
[0326]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val
[0327]	50 55 60
[0328]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
[0329]	65 70 75 80
[0330]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
[0331]	85 90 95
[0332]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
[0333]	100 105 110
[0334]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
[0335]	115 120 125
[0336]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr
[0337]	130 135 140
[0338]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
[0339]	145 150 155 160
[0340]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
[0341]	165 170 175
[0342]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
[0343]	180 185 190
[0344]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
[0345]	195 200 205
[0346]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
[0347]	210 215 220
[0348]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0349]	225 230
[0350]	<210> 26

[0351] <211> 368
[0352] <212> DNA
[0353] <213> Artificial Sequence
[0354] <220>
[0355] <223> Artificial sequence
[0356] <400> 26
[0357] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
[0358] tcctgtgtag gctctggata cacctacagt aggtactgca tgggctggtt ccgccaggct 120
[0359] ccagggaagg agcgcgaggg ggtcgcagct atttgtactg gcggtggtag tacgtactat 180
[0360] gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca agtcgaagaa cacggtgtat 240
[0361] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acggccctgt attactgtaa attgtacgtt 300
[0362] ggtagtgatt gtggaaacgc tggccgtgct tactggggcc aggggacca ggtcaccgtc 360
[0363] tcctcatc 368
[0364] <210> 27
[0365] <211> 350
[0366] <212> DNA
[0367] <213> Artificial Sequence
[0368] <220>
[0369] <223> Artificial sequence
[0370] <400> 27
[0371] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
[0372] tcctgtacag gctctggaga catcagtaag gtagcttcaa tggcctggtt ccgccaggct 120
[0373] ccattgaagg agcgcgaggg ggtcgcgggt ttaagtattg gtacaggtag gacatactac 180
[0374] gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca acgccaagaa tacgctgtat 240
[0375] ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggac acagccgtat attactgcgc cacagtggta 300
[0376] gctggcgtga agtaccgggg ccaggggacc caggtcaccg tctcctcatc 350
[0377] <210> 28
[0378] <211> 362
[0379] <212> DNA
[0380] <213> Artificial Sequence
[0381] <220>
[0382] <223> Artificial sequence
[0383] <400> 28
[0384] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
[0385] tcctgtacag gctctggaga catcagtaag gtagcttcaa tggcctggtt ccgccaggct 120
[0386] ccattgaagg agcgcgaggg ggtcgcgggt ttaagtattg gtacaggtag gacatactac 180
[0387] gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca acgccaagaa tacgctgtac 240
[0388] ctgcagatga acagcctgaa acctgaggac actgccatgt actactgtgc ggcaaaaggc 300
[0389] gaccagcgtt ttggaggata tcttgactgg ggtcagggga cccaggtcac cgtctcctca 360

[0390] tc 362
[0391] <210> 29
[0392] <211> 377
[0393] <212> DNA
[0394] <213> Artificial Sequence
[0395] <220>
[0396] <223> Artificial sequence
[0397] <400> 29
[0398] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
[0399] tcctgtacag gctctggaga catcagtaag gtagcttcaa tggcctgggt cccagggt 120
[0400] ccattgaagg agcgcgaggg ggtcgccgt ttaagtattg gtacaggtag gacatactac 180
[0401] gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca acgccaagaa tacgctgtac 240
[0402] ctgcagatga acagcctgaa aactgaggac actgccatat actactgtgc gctcgtgacg 300
[0403] aggtggcctc ctctcgccgg tggcaactgg ccagctaagt actggggcca ggggaccag 360
[0404] gtcaccgtct cctcacc 377
[0405] <210> 30
[0406] <211> 356
[0407] <212> DNA
[0408] <213> Artificial Sequence
[0409] <220>
[0410] <223> Artificial sequence
[0411] <400> 30
[0412] caggtgcagc tgcaggagtc tgggggagga tcggtgcagg ctggaggatc tctgacgctc 60
[0413] tcctgtgcat actctctgca caacaccaat atcaacgcca tggcctgggt cccaggact 120
[0414] ccaggcaagg agcgcgaggg ggtcgctgct cttctcactc gtgggtggcaa tacatggtat 180
[0415] gacgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
[0416] ctacaaatgg atgacctgaa acctgaggac actgccgtgt actactgtgc ggcagtccgg 300
[0417] agaagggatg gatataagta ctggggccag gggaccagg tcaccgtctc ctcacc 356
[0418] <210> 31
[0419] <211> 353
[0420] <212> DNA
[0421] <213> Artificial Sequence
[0422] <220>
[0423] <223> Artificial sequence
[0424] <400> 31
[0425] caggtgcagc tgcaggagtc tggaggaggc tcggtgcagg ctggagggtc tctgagactc 60
[0426] tcctgtacag gctctggaga catcagtaag gtagcttcaa tggcctgggt cccagggt 120
[0427] ccattgaagg agcgcgaggg ggtcgccgt ttaagtattg gtacaggtag gacatactac 180
[0428] gccgactccg tgaagggccg attcaccatc tcccagaca acgccaagaa tacgctgtac 240

[0429] ctgcagatga acagcctgaa aactgaggac actgccatat actactgtgc gtataatgat 300
 [0430] cagcgtcgtg cacggtactg gggccagggg acccaggtca ccgtctcctc atc 353
 [0431] <210> 32
 [0432] <211> 415
 [0433] <212> PRT
 [0434] <213> Artificial Sequence
 [0435] <220>
 [0436] <223> Artificial sequence
 [0437] <400> 32
 [0438] Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
 [0439] 1 5 10 15
 [0440] Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
 [0441] 20 25 30
 [0442] Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
 [0443] 35 40 45
 [0444] Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
 [0445] 50 55 60
 [0446] Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
 [0447] 65 70 75 80
 [0448] Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu
 [0449] 85 90 95
 [0450] Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
 [0451] 100 105 110
 [0452] Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
 [0453] 115 120 125
 [0454] Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
 [0455] 130 135 140
 [0456] Arg Ala Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
 [0457] 145 150 155 160
 [0458] Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
 [0459] 165 170 175
 [0460] Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
 [0461] 180 185 190
 [0462] Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
 [0463] 195 200 205
 [0464] Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
 [0465] 210 215 220
 [0466] Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
 [0467] 225 230 235 240

[0468] Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
[0469] 245 250 255
[0470] His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
[0471] 260 265 270
[0472] Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
[0473] 275 280 285
[0474] Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
[0475] 290 295 300
[0476] Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
[0477] 305 310 315 320
[0478] Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
[0479] 325 330 335
[0480] Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
[0481] 340 345 350
[0482] Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
[0483] 355 360 365
[0484] His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
[0485] 370 375 380
[0486] Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
[0487] 385 390 395 400
[0488] Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
[0489] 405 410 415
[0490] <210> 33
[0491] <211> 29
[0492] <212> DNA
[0493] <213> Artificial Sequence
[0494] <220>
[0495] <223> Artificial sequence
[0496] <400> 33
[0497] cccaccggtc aggtgcagct gcaggagtc 29
[0498] <210> 34
[0499] <211> 28
[0500] <212> DNA
[0501] <213> Artificial Sequence
[0502] <220>
[0503] <223> Artificial sequence
[0504] <400> 34
[0505] cccgatcct gaggagacgg tgacctgg 28

6 个 dAb 的氨基酸序列（根据 Kabat 和 Chothia 的规则用框标出 CDR）

>nFN50

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCVGS **GYTYSRYCMG**WFRQAPGKEREVA **AICTGGGSTYYADS**
VKGRFTISQDKSKNTVY LQMNSLKPEDTALYYCKL **YVGSDCGNAGRAY**WGQGTQVTVSS

>nFN52

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS **GDISKVASMA**WFRQAPLKEREVA **GLSIGTGRYYADSV**
KGRFTISRDNANTLY LQMNSLKPEDTAVYYCAT **VVAGVKY**RGQGTQVTVSS

>nFN62

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS **GDISKVASMA**WFRQAPLKEREVA **GLSIGTGRYYADSV**
KGRFTISRDNANTLY LQMNSLKPEDTAMYYCAA **KGDQRFGGYLD**WGQGTQVTVSS

>nFN64

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS **GDISKVASMA**WFRQAPLKEREVA **GLSIGTGRYYADSV**
KGRFTISRDNANTLY LQMNSLKTEDTAIYYCAL **VTRWPPLAGGNWPAKY**WGQGTQVTVSS

>nFN65

QVQLQESGGGSVQAGGSLTLSCAYS **LHNTNINAMA**WFRQTPGKEREVA **ALLTRGGNTWYDDS**
VKGRFTISRDNANTVY LQMDDLKPEDTAVYYCAA **VRRRDGYKY**WGQGTQVTVSS

>nFN69

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTGS **GDISKVASMA**WFRQAPLKEREVA **GLSIGTGRYYADSV**
KGRFTISRDNANTLY LQMNSLKTEDTAIYYCAY **NDQRRARY**WGQGTQVTVSS

图1

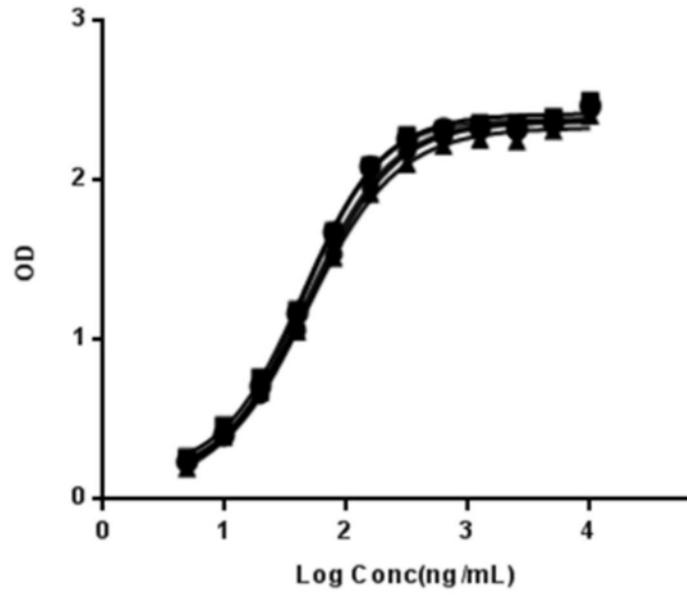


图2

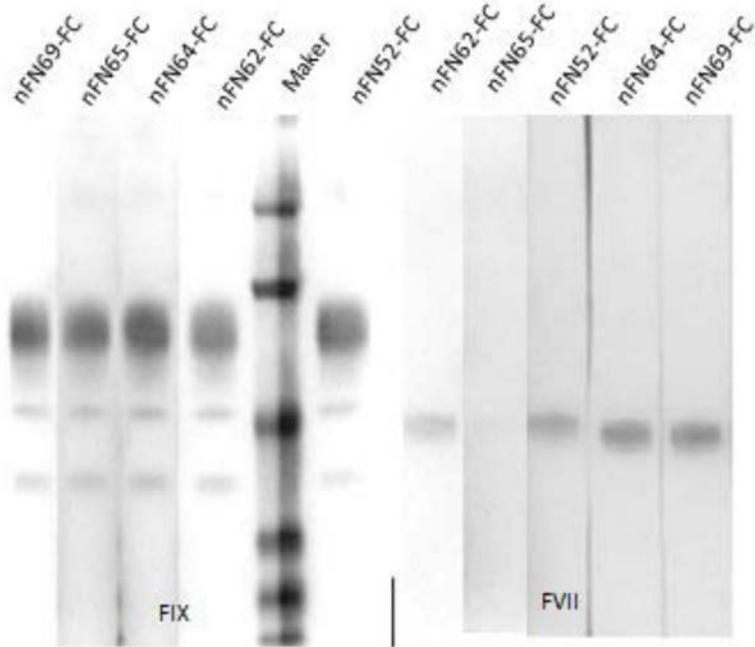


图3

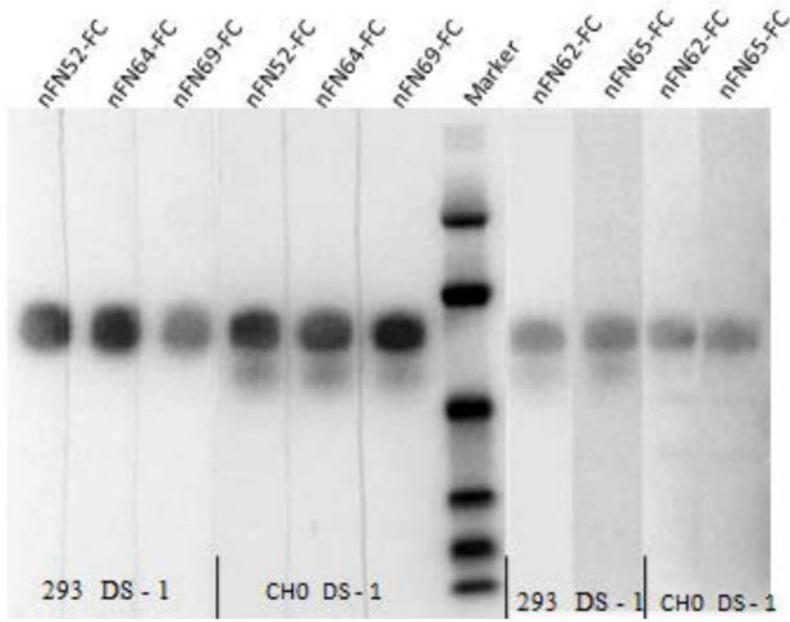


图4

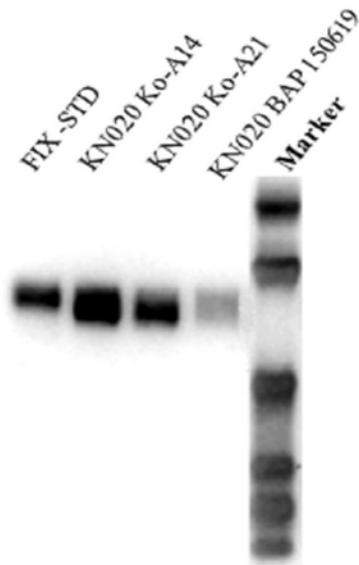


图5