

KLK1 融合蛋白的制备方法

5 技术领域

本申请涉及生物医药领域，具体地，本申请涉及一种制备包含组织激肽释放酶 1 (KLK1) 的融合蛋白 (例如，KLK1-Fc 融合蛋白) 的方法、包含 KLK1 的融合蛋白、包含所述融合蛋白的药物组合物及其在治疗或预防疾病 (例如，急性缺血性脑中风) 中的用途。

10 背景技术

激肽释放酶-激肽系统 (kallikrein-kinin system, 也称为“KKS”) 是一种复杂的内源性多酶系统, 由激肽原 (kininogen)、激肽释放酶 (kallikrein, 也称为“KLK”或者“激肽原酶”) 和激肽 (kinin) 组成, 参与调控血压、肾脏、糖代谢、神经系统等的生理功能。KLK 可以催化裂解激肽原, 从而产生具有生物活性的激肽。

15 KLK 分为血浆 KLK 和组织 KLK 两大类。血浆 KLK 和组织 KLK 的底物、分子量、功能均有很大差异。例如, 血浆 KLK 位于染色体 4q34-35 的 *KLKB1* 基因编码, 没有其他已知的旁系同源物; 而组织 KLK 由位于染色体 19q13 的 *KLK1~KLK15* 基因编码, 包括 15 种已知的旁系同源物 (KLK1~KLK15), KLK1 是组织 KLK 家族中唯一能产生具有生物活性的激肽的成员。KLK1 对离体动脉
20 具有舒张作用, 产生血管扩张、抗炎、细胞修复和减少细胞凋亡等效果。

目前市售的 KLK1 主要是从人尿液提取或者从猪的胰脏提取, 属于内源蛋白, 由于其生产工艺复杂、半衰期较短 (例如凯力康®, 其人体半衰期不到 4 小时)、给药频率较高 (例如凯力康®, 其临床说明书要求每天静脉注射一次, 连续
25 给药 21 天)、成本较高, 而且质量控制难度较高, 在一定程度上限制了其应用, 因此存在显著的未满足的临床需求。亟需开发一种半衰期延长、给药频率较低、且生产成本及质量可控性更优的 KLK1 蛋白产品。

发明简述

在一个方面, 本申请提供了一种制备包含组织激肽释放酶 1 (KLK1) 的融合

蛋白的方法，所述方法包括步骤(1)：将含有编码所述融合蛋白的核酸分子的重组载体置于适合的蛋白表达系统中进行表达，其中，所述融合蛋白包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，

- 5 a) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；
- b) 所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且
- c) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。

在某些实施方式中，所述方法进一步包括步骤(2)：将步骤(1)中得到的所述融合蛋白与所述蛋白酶混合进行特异性酶切反应，去除所述掩蔽肽。在某些实施方式中，在所述步骤(2)进行特异性酶切反应之前纯化步骤(1)中得到的所述融合蛋白。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示。在某些实施方式中，所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示。

在另一方面，本申请提供了一种融合蛋白，其包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，

- 20 a) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；
- b) 所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且
- c) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID

NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示。在某些实施方式中，所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36~55、SEQ ID NO: 100~109、SEQ ID NO: 111~113、SEQ ID NO: 125~127 5 中的任一个序列所示。

在另一方面，本申请提供了一种核酸分子，其包含编码本申请所述的 KLK1 融合蛋白的核苷酸序列。

在另一方面，本申请提供了一种载体，其包含本申请所述的核酸分子。

在另一方面，本申请提供了一种蛋白表达系统，其包含本申请所述的核酸分子或本申请所述的载体。 10

在另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含本申请所述的 KLK1 融合蛋白、包含本申请所述的核酸分子、包含本申请所述的载体或包含本申请所述的蛋白表达系统，以及药学上可接受的载体。

在另一方面，本申请提供了一种蛋白表达系统的构建方法，包括：将编码本申请所述的 KLK1 融合蛋白的核酸分子引入载体中以构建表达载体；将所述表达载体导入蛋白表达系统中。 15

在另一方面，本申请提供了一种治疗或预防疾病的方法，其包括向需要治疗或预防的受试者施用根据本申请所述的方法制备得到的分离的 KLK1 融合蛋白，其中，所述疾病选自下组：缺血性疾病、出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病。在某些实施方式中，所述缺血性疾病为急性缺血型脑中风。在某些实施方式中，所述肾病为慢性肾病或急性肾损伤。 20

附图说明

图 1 显示了示例性质粒图谱，其中用箭头表示的“gene”代表目标基因。

图 2 显示了阳性对照(图 2A)、在制备过程中带有 EK 酶识别序列并且经 EK 酶切之后得到的 KLK1 融合蛋白(图 2B)、在制备过程中不带有 EK 酶识别序列(图 2C)或者虽带有 EK 酶识别序列但未经 EK 酶切的 KLK1 融合蛋白(图 2D) 25 的酶催化活性。

图 3 显示了在制备过程中带有 EK 酶识别序列并且经 EK 酶切之后得到的不同序列的 KLK1 融合蛋白的酶催化活性。

图 4 显示了融合蛋白 2.4 的去糖还原分子量分析实验中的总离子流 (TIC) 图谱 (图 4A)、质谱 (MS) 图谱 (图 4B)、去卷积图谱 (图 4C) 和去卷积图谱
5 的局部放大图 (图 4D)。

图 5 显示了融合蛋白 2.4 的去糖完整分子量分析实验中的总离子流 (TIC) 图谱 (图 5A)、质谱 (MS) 图谱 (图 5B)、去卷积图谱 (图 5C) 和去卷积图谱的局部放大图 (图 5D)。

图 6 显示了融合蛋白 2.1 和凯力康®在小鼠体内的 PK 曲线。

10 图 7 显示了阳性对照品 (依达拉奉)、低剂量 (25 μg/kg) 融合蛋白 2.1 和高剂量 (150 μg/kg) 融合蛋白 2.1 对大鼠短暂性脑缺血再灌注 (tMCAO) 模型的行为学评分 (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 假手术组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组)。

15 图 8 显示了阳性对照品 (依达拉奉)、低剂量 (25 μg/kg) 融合蛋白 2.1 和高剂量 (150 μg/kg) 融合蛋白 2.1 对大鼠 tMCAO 模型的脑梗死面积的 TTC 染色结果 (# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs 假手术组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs 模型组, 单因素 ANOVA Dunnett 检验)。

20 图 9 显示了阳性对照品 (依达拉奉)、低剂量 (25 μg/kg) 融合蛋白 2.1 和高剂量 (150 μg/kg) 融合蛋白 2.1 对大鼠 tMCAO 模型的缺血-再灌注后的脑组织图。

发明详述

25 尽管本申请将在以下公开多个方面和实施方式,但是在不违背本申请主题精神和范围的前提下,本领域技术人员显然可以对其进行各种等同改变和修改。本申请公开的多个方面和实施方式仅用于举例说明,其并非旨在限制本申请,本申请的实际保护范围以权利要求为准。除非另外指出,本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本申请所属领域中的普通技术人员通常所理解的相同的含义。本申请中引用的所有参考文献、专利、专利申请均通过整体引用并入本文。

定义

当提及的是多肽或蛋白质时，本申请中使用的术语“野生型”指的是在一个或多个氨基酸位置处不包括人为的突变、插入、缺失或修饰的天然存在的多肽或蛋白质；当提及的是核酸、核苷酸或多核苷酸时，本申请中使用的术语“野生型”指的是在一个或多个核苷酸位置处不包括人为的突变、插入、缺失或修饰的天然存在的核酸、核苷酸或多核苷酸。但是编码野生型多肽的多核苷酸不仅限于天然存在的多核苷酸，也包括编码野生型多肽的任何多核苷酸（例如，人工合成的多核苷酸）。

本申请中使用的术语“受试者”包括人类和非人类的动物。非人类的动物包括所有的脊椎动物，例如哺乳动物和非哺乳动物。“受试者”也可以是家畜动物，例如牛、猪、羊、家禽和马；或啮齿类动物，例如大鼠、小鼠；或灵长类动物，例如猿（ape）、猴子、黑猩猩（chimpanzee）、大猩猩（gorilla）、猩猩（orangutan）、狒狒（baboon）；或家养动物，例如狗和猫。“受试者”可以是雄性或者雌性，可以是老年、成年、青少年、儿童或者婴儿。

本申请中使用的术语“蛋白”、“多肽”以及“肽”可以互换使用，是指氨基酸的聚合物。本申请所述的蛋白、多肽或肽可以含有天然的氨基酸，也可以含有非天然的氨基酸，或氨基酸的类似物、模拟物。本申请所述的蛋白、多肽或肽可以通过本领域公知的任何方法获得，例如但不限于，通过天然分离、重组表达、化学合成等。

本申请所用的术语“氨基酸”是指含有氨基（-NH₂）和羧基（-COOH）官能团以及每个氨基酸特有的侧链的有机化合物。氨基酸名称在本申请中也以标准的单字母或三字母代码表示，总结如下：

名称	三字母代码	单字母代码
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酸	Glu	E
谷氨酰胺	Gln	Q

名称	三字母代码	单字母代码
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
蛋氨酸	Met	M
苯丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V

在本申请中当“保守替换”用于氨基酸序列时，是指将一个氨基酸残基用另一个具有相似理化性质的侧链的氨基酸残基替代。例如，可以在具有疏水侧链的氨基酸残基之间（例如 Met、Ala、Val、Leu 和 Ile）、具有中性亲水侧链的氨基酸残基之间（例如 Cys、Ser、Thr、Asn 和 Gln）、具有酸性侧链的氨基酸残基之间（例如 Asp、Glu）、具有碱性侧链的氨基酸残基之间（例如 His、Lys 和 Arg）或具有芳香侧链的氨基酸残基之间（例如 Trp、Tyr 和 Phe）进行保守替换。本领域已知，保守替换通常不会引起蛋白构象结构的显著变化，因此能够保留蛋白质的生物活性。

本申请所述的术语“同源的”指当最佳比对时核酸序列（或其互补链）或氨基酸序列与另一条序列具有至少 60%（例如，至少 65%、70%、75%、80%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）的序列同一性。

当“百分比（%）序列同一性”用于氨基酸序列（或核酸序列）时，是指在进行序列比对，并且必要时引入间隔使相同氨基酸（或核酸）数目达到最多后，在候选序列中，与参比序列相同的氨基酸（或核酸）残基占所述候选序列的氨基酸（或核酸）残基的百分比。换言之，可以通过用与其比较的参比序列相同的氨基酸残基（或碱基）数除以候选序列或参比序列（以较短者为准）中的氨基酸残基（或碱基）总数来计算氨基酸序列（或核酸序列）的百分比（%）序列同一性。所述氨基酸残基的保守替换可以认为或不认为是相同残基。可以通过本领域

公开的工具,例如 BLASTN、BLASTp(美国国家生物技术信息中心网站(NCBI),也可参见 Altschul S.F. *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 215: 403-410 (1990); Stephen F. *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402 (1997))、ClustalW2(欧洲生物信息研究所网站,可参见 Higgins D.G. *et al.*, *Methods in Enzymology*, 266: 383-402 (1996);

5 Larkin M.A. *et al.*, *Bioinformatics* (Oxford, England), 23 (21): 2947-8 (2007))和 ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件,对序列进行比对以确定氨基酸(或核酸)序列的百分比序列同一性。本领域技术人员可以使用所述工具的默认参数或根据比对的需要适当调整参数,例如通过挑选合适的算法。

“分离的”物质已经经人工由自然状态改变。如果自然界中出现某种“分离的”组合物或物质,那么其已经被改变或脱离其原始状态,或二者均有发生。例如,某一活体动物体内天然存在的多核苷酸或多肽不是“分离的”,但如果这些多核苷酸或多肽与之在天然状态下共存的物质足够分离并以基本上纯的状态存在,则可以认为是“分离的”。“分离的核酸序列”是指分离的核酸分子的序列。在一些实施方式中,“分离的 KLK1”是指纯度为至少 60%、70%、75%、80%、

10 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

15 94%、95%、96%、97%、98%、99%的 KLK1 蛋白或者编码 KLK1 蛋白的核酸分子,其中纯度由电泳方法(例如,SDS-PAGE、等电聚焦、毛细管电泳),或色谱法(例如,离子交换色谱或反相 HPLC)确定。

本申请中的术语“载体”是指可将遗传元件操作性地插入其中并使该遗传元件获得表达的一种运载工具,例如生产由该遗传元件编码的蛋白质、RNA 或 DNA,或者复制所述遗传元件。载体可用于转化、转导或转染宿主细胞,使其携带的遗传元件在宿主细胞内得以表达。举例来说,载体包括:质粒、噬菌粒、柯斯质粒(cosmid)、人工染色体如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 衍生的人工染色体(PAC)、噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体,以及动物

20 病毒等。载体可含有多种控制表达的元件,包括启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外,载体还可含有复制起始位点。载体还可包括协助其进入细胞的成分,包括但不限于,病毒颗粒、脂质体或蛋白外壳。载体可以是表达载体或克隆载体。本申请提供的载体(例如表达载体)含有本申请所述的编码 KLK1 融合蛋白的核酸序列、至少一个可操作地连接至所述核酸序列

25

的启动子（例如，SV40、CMV、EF-1 α ），以及至少一个选择标记。

本申请中使用的对某种疾病、病症或状况的“治疗”或“疗法”包括预防或减轻某种疾病、病症或状况，降低某种疾病、病症或状况发生或发展的速度，降低发展出某种疾病、病症或状况的风险，预防或延迟与某种疾病、病症或状况相关的症状发展，减少或终止与某种疾病、病症或状况相关的症状，产生某种疾病、病症或状况的完全或部分的逆转，治愈某种疾病、病症或状况，或以上的组合。

术语“药学上可接受的”表示指定的载体、媒介、稀释剂、赋形剂和/或盐通常在化学和/或物理上与组成该制剂的其他成分相容，并且在生理上与其受体相容。

10 制备融合蛋白的方法

在一个方面，本申请提供了一种制备包含组织激肽释放酶 1（KLK1）的融合蛋白的方法，所述方法包括步骤(1)：将含有编码所述融合蛋白的核酸分子的重组载体置于适合的蛋白表达系统中进行表达，其中，所述融合蛋白包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，

- d) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；
- e) 所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且
- f) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。

“组织激肽释放酶 1”、“Kallikrein-1”、“KLK1 蛋白”或者“KLK1 酶”是一种丝氨酸蛋白酶，由 *KLK1* 基因编码，是组织激肽释放酶家族的成员之一，能够从激肽原（kininogen）释放活性激肽（kinin）。在本申请中，“组织激肽释放酶 1”、“Kallikrein-1”、“KLK1 蛋白”和“KLK1 酶”可以互换使用。本申请中所述的 KLK1 蛋白可以指源自任何脊椎动物来源的 KLK1 蛋白，所述脊椎动物来源包括哺乳动物，例如，灵长类动物（例如，人、猴）和啮齿动物（例如，小鼠和大鼠）等。人 KLK1 蛋白的示例性序列如 UniProtKB 登录号 P06870（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示）所示。小鼠 KLK1 蛋白的示例性序列如 UniProtKB 登录号 P15947（其氨基酸序列如 SEQ ID NO: 3 所示）所示。

在本申请中，KLK1 蛋白包括由细胞天然表达的 KLK1 蛋白或通过用 *KLK1* 基因转染的重组细胞表达的 KLK1 蛋白的任何变体、构象、同种型或者物种同系物。例如，本申请中的“KLK1 蛋白”包括：1) 天然未经加工形式的 KLK1 蛋白、全长 KLK1 蛋白或者天然存在的 KLK1 变体（例如，剪接变体或等位基因变体）；2) 在细胞中加工产生的任何形式的 KLK1 蛋白；或 3) 通过重组方法产生的 KLK1 蛋白的全长、片段（例如，截短形式、胞外/跨膜结构域）或修饰形式（例如，突变形式、糖基化/聚乙二醇化、免疫荧光融合形式）。

在本申请中，“包含 KLK1 的融合蛋白”（在本申请中又称为“KLK1 融合蛋白”）是指 KLK1 蛋白与至少另外一种异源肽可操作地连接形成的单一链的蛋白质。可以通过重组方法、化学方法或者任何其他方法产生本申请所述的 KLK1 融合蛋白。

在某些实施方式中，本申请提供的制备包含 KLK1 的融合蛋白的方法包括步骤(1)。在某些实施方式中，本申请提供的制备包含 KLK1 的融合蛋白的方法还进一步包括步骤(2)。以下分别详细描述这两个步骤。

步骤(1)

步骤(1)是将含有编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子的重组载体置于适合的蛋白表达系统中进行表达，其中，所述 KLK1 融合蛋白包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。

a) 掩蔽肽

在某些实施方式中，本申请所述的掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列。在本申请中，“掩蔽肽”是指与本申请所述的第一多肽或第二多肽直接或者通过连接子共价连接，从而阻断、遮挡、抑制或以其他方式阻止本申请所述的第一多肽或第二多肽与其受体或底物之间的结合。

由于 KLK1 酶是一种哺乳动物丝氨酸蛋白酶，因此可能会干扰表达 KLK1 融

合蛋白的蛋白表达系统（例如，宿主细胞）的正常功能，从而使得 KLK1 融合蛋白在表达后失去活性或者活性显著降低。本发明的发明人意外地发现，当在制备 KLK1 融合蛋白的过程中，使得蛋白表达系统表达包含掩蔽肽的 KLK1 融合蛋白，然后再进行特异性酶切反应，去除所述掩蔽肽之后得到的 KLK1 融合蛋白即具有较高的 KLK1 酶活性。不受限于任何理论，但是认为掩蔽肽有助于增强 KLK1 融合蛋白的表达和/或活性，可能是因为掩蔽肽的存在避免或者减少了 KLK1 融合蛋白对蛋白表达系统的干扰。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列，并且能够阻断、遮挡或抑制 KLK1 蛋白与其底物的结合。本领域技术人员可以合理地预期，只要掩蔽肽具有上述性质，就可以用于本发明所述的 KLK1 融合蛋白的制备方法中。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽选自下组：肠激酶（EK）识别序列、凝血酶识别序列、凝血因子 Xa 识别序列、烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶识别序列、SUMO 蛋白酶识别序列和转肽酶（Sortase）识别序列。在某些实施方式中，所述掩蔽肽为肠激酶（EK）识别序列。在某些实施方式中，所述肠激酶（EK）识别序列为 SEQ ID NO: 4（DDDDK）或者 SEQ ID NO: 5（VDDDDK）。在某些实施方式中，所述掩蔽肽包括如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽为凝血酶识别序列。在某些实施方式中，所述凝血酶识别序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 所示。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽为凝血因子 Xa 识别序列。在某些实施方式中，所述凝血因子 Xa 识别序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7 所示。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽为烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶识别序列。在某些实施方式中，所述烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶识别序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 8 所示。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽为 SUMO 蛋白酶识别序列。在某些实施方式中，所述 SUMO 蛋白酶识别序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 9 所示。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽为转肽酶（Sortase）识别序列。在某些实施方式中，所述转肽酶（Sortase）识别序列的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10 所示。

在某些实施方式中，经特异性酶切反应去除所述掩蔽肽之后得到的 KLK1 融合蛋白的半衰期为至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 6 天、至少 7 天、至少 8 天、至少 9 天、至少 10 天、至少 11 天、至少 12 天、至少 13 天或至少 14 天。

b) 第一多肽

在某些实施方式中，所述第一多肽为人 KLK1 蛋白或者其变体。KLK1 “变体”是指与野生型 KLK1 蛋白的氨基酸序列相比有氨基酸突变、缺失、插入或修饰，但仍然保留 KLK1 的功能或活性的 KLK1 多肽。在本申请中，“人 KLK1”也称为“hKLK1”。

在某些实施方式中，人野生型 KLK1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示，其中 SEQ ID NO: 1 的第 1-18 位氨基酸形成的多肽为信号肽，第 19-24 位氨基酸形成的多肽为前肽（propeptide，在本申请中也称为“prepro”），第 25-262 位氨基酸形成的多肽为 KLK1 的成熟蛋白。在某些实施方式中，SEQ ID NO: 1 所示的氨基酸序列去除掉 N 末端的信号肽和前肽之后形成的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。

在某些实施方式中，所述第一多肽包含如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%）序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。

在不影响活性的前提下，本申请 KLK1 蛋白或者其变体还可以含有非天然的氨基酸。非天然的氨基酸包括例如，β-氟代丙氨酸、1-甲基组氨酸、γ-亚甲基谷氨酸、α-甲基亮氨酸、4,5-脱氢赖氨酸、羟基脯氨酸、3-氟代苯基丙氨酸、3-氨基酪氨酸、4-甲基色氨酸等。

本申请所述的 KLK1 蛋白或者其变体也可以使用本领域公知的方法进行修饰。例如，但不限于，PEG 化、糖基化、氨基端修饰、脂肪酰化、羧基端修饰、磷酸化、甲基化等。本领域技术人员可以理解，本申请所述的 KLK1 蛋白或者其变体使用本领域公知的方法进行修饰之后，仍然保留了与 KLK1 蛋白基本上相似的功能。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列基础上，在一个或多个位点具有氨基酸的保守替换，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请提供的 KLK1 蛋白变体与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90% 的序列同一性（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 的序列同一性），并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在选自下组的至少一个氨基酸位置有突变：对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位、第 162 位和第 164 位。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在选自下组的至少一个氨基酸位置有突变：对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位、第 162 位和第 164 位，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）突变为谷氨酰胺（Q），在本申请中也称为“E121Q”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 E121Q 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 117 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 117 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸(K)突变为谷氨酸(E)，在本申请中也称为“K162E”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 K162E 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 118 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 118 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位的丙氨酸（A）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位的丙氨酸（A）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位的丙氨酸(A)突变为缬氨酸(V)，在本申请中也称为“A164V”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 A164V 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 119 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 119 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位和第 162 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位和第 162 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）和第 162 位的赖氨酸（K）有突变。在某些

实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）和第 162 位的赖氨酸（K）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）突变为谷氨酰胺（Q），并且在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）突变为谷氨酸（E），在本申请中也称为“E121Q+K162E”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 E121Q+K162E 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 120 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 120 所示。

10 在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位和第 164 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位和第 164 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 162 位的赖氨酸（K）突变为谷氨酸（E），并且在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位的丙氨酸（A）突变为缬氨酸（V），在本申请中也称为“K162E+A164V”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 K162E+A164V 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 121 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 121 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位和第 164 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位和第 164 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位

的谷氨酸（E）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）突变为谷氨酰胺（Q），并且第 164 位的丙氨酸（A）突变为缬氨酸（V），在本申请中也称为“E121Q+A164V”。在某些实施方式中，
5 本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 E121Q+A164V 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 115 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位、第 162 位和第 164 位有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位、第 162 位和第 164 位有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）、第 162 位的赖氨酸（K）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1
15 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）、第 162 位的赖氨酸（K）和第 164 位的丙氨酸（A）有突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 121 位的谷氨酸（E）突变为谷氨酰胺（Q）、第 162 位的赖氨酸（K）突变为谷氨酸（E），并且在对应于 SEQ ID NO: 2 的第 164 位的丙氨酸（A）突变为缬氨酸
20 （V），在本申请中也称为“E121Q+K162E+A164V”。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体具有 E121Q+K162E+A164V 突变，并且仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体包含如 SEQ ID NO: 122 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 蛋白变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示。

25 *c) 第二多肽*

在某些实施方式中，所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。在某些实施方式中，所述第二多肽包含用于延长所述第一多肽的半衰期的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述第二多肽包含用于延长所述第一多肽在受试者体内的半衰期的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述第二多肽为 Fc 结构域或白蛋白。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含铰链区。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含下游铰链区（lower hinge）。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含核心铰链区（core hinge region）和下游铰链区（lower hinge）。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含上游铰链区（upper hinge region）、核心铰链区（core hinge region）和下游铰链区（lower hinge）。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域不包含铰链区。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域来源于人 IgG Fc 结构域。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域来源于人 IgG1 Fc 结构域、人 IgG2 Fc 结构域、人 IgG3 Fc 结构域或人 IgG4 Fc 结构域。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域来源于人 IgG1 Fc 结构域或人 IgG4 Fc 结构域。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域来源于人 IgG1 Fc 结构域。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但仍然保留如 SEQ ID NO: 11 所示的 Fc 结构域的功能（例如，能够延长所述第一多肽的半衰期）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域来源于人 IgG4 Fc 结构域。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少

84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但仍然保留如 SEQ ID NO: 12 所示的 Fc 结构域的功能（例如，能够延长所述第一多肽的半衰期）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含一个或多个（例如，两个、三个、四个、五个或更多个）氨基酸位点的突变。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 252 位（根据 EU 系统编号）有氨基酸突变。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 252 位的蛋氨酸突变为酪氨酸（在本申请中也称为“M252Y”）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 254 位（根据 EU 系统编号）有氨基酸突变。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 254 位的丝氨酸突变为苏氨酸（在本申请中也称为“S254T”）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 256 位（根据 EU 系统编号）有氨基酸突变。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域在对应于人天然 IgG Fc 结构域的氨基酸序列（如 SEQ ID NO: 11 或者 SEQ ID NO: 12 所示）的第 256 位的苏氨酸突变为谷氨酸（在本申请中也称为“T256E”）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含一种、两种或三种选自下组的突变：M252Y、S254T 和 T256E。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域包含 M252Y、

S254T 和 T256E 突变。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但仍然保留如 SEQ ID NO: 13 所示的 Fc 结构域的功能（例如，能够延长所述第一多肽的半衰期）。

在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 Fc 结构域的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但仍然保留如 SEQ ID NO: 14 所示的 Fc 结构域的功能（例如，能够延长所述第一多肽的半衰期）。

在某些实施方式中，所述第二多肽为白蛋白。在某些实施方式中，所述白蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。在某些实施方式中，所述白蛋白包含人

血清白蛋白的一个或多个结构域。在某些实施方式中，所述白蛋白包含人血清白蛋白的 D3 结构域。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 117 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 117 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID

NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 117 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 117 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 117 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 118 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 119 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 119 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 119 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 119 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 119 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所

示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 120 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 121 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 121 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 121 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 121 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 121 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

所示的第二多肽。在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽、如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽和如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实

施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 12 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 13 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 14 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端。在某些实施方式中，所述第二多肽位于所述第一多肽的 C 末端。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次包括掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示，并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

10 MP-L1-P1-L2-P2,

其中, MP 表示掩蔽肽, L1 表示键或第一连接子, P1 表示第一多肽, L2 表示键或第二连接子, P2 表示第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示所述第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

15 在某些实施方式中，MP 表示所述肠激酶识别序列，L1 表示键，P1 表示人 KLK1 蛋白，L2 表示第二连接子，P2 表示 Fc 结构域。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

20 在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接器，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ

ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

5 在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ
10 ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，
15 P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

20 在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ
25 ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ

ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

5 在某些实施方式中，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 113 或者 SEQ ID NO: 127 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 113 或者 SEQ ID NO: 127 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 113 或者 SEQ ID NO: 127 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 46、SEQ ID NO: 47、SEQ ID NO: 48、SEQ ID NO: 49、SEQ ID NO: 50、SEQ ID NO: 51、SEQ ID NO: 52、SEQ ID NO: 53、SEQ ID NO: 54、SEQ ID NO: 55、SEQ ID NO: 113 或者 SEQ ID NO: 127 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但经 EK 酶切之后仍然保留 KLK1 的功能或活性（例如，能够催化激肽

原释放活性激肽)。

d) 标签

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白进一步包含标签。在某些实施方式中，所述标签选自下组：荧光标签、发光标签、纯化标签和生色标签。

- 5 在某些实施方式中，所述标签为纯化标签。在某些实施方式中，所述标签选自下组：HIS 标签、GST 标签、MBP 标签、Myc 标签、NusA 标签、SUMO 标签、FLAG 标签、Avi 标签、Halo 标签、SNAP 标签、Strep-II 标签和 TrX 标签。在某些实施方式中，所述标签是 HIS 标签。在某些实施方式中，所述标签是包含 5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个或更多个组氨酸的 HIS 标签。在某些实施方式中，
10 所述标签的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 16 所示。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

- 其中，LB 表示不存在或标签，MP 表示掩蔽肽，L1 表示键或第一连接子，
15 P1 表示第一多肽，L2 表示键或第二连接子，P2 表示第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示标签，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示所述第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示所述肠激酶识别序列，L1 表示键，P1 表示人 KLK1 蛋白，L2 表示第二连接子，P2 表示 Fc 结构域。

- 20 在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

- 25 在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、

SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、
5 SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、
10 SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、
15 SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。
20

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽, L2 表示第二连接子, P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。
25

在某些实施方式中, LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签, MP 表示

如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示

如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

e) 连接子

在某些实施方式中，所述第一连接子和所述第二连接子独立地选自下组：可切割连接子、不可切割连接子、柔性连接子、刚性连接子、螺旋连接子和非螺旋连接子。

在本申请中，术语“连接子”是指能够将一个部分与另一个部分共价连接的任何化学部分。例如，“连接子”可以是具有 1、2、3、4 或 5 个氨基酸残基，或长度介于 5 和 15、20、30、50 或更多个氨基酸残基之间的人工氨基酸序列，通过肽键连接，并用于连接一个或多个多肽。连接子可能有也可能没有二级结构。连接子序列在本领域是已知的，例如，参见 Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993); Poljak *et al.*, *Structure* 2:1121-1123 (1994)。

在本申请中，术语“可切割连接子”是指对体内蛋白酶、PH 或化学等因素敏感，并在上述因素的存在下容易裂解的连接子。

在本申请中，术语“不可切割连接子”是指对体内蛋白酶、PH 或化学等因素稳定，不容易裂解的连接子。

在本申请中，术语“柔性连接子”是指当连接不同蛋白组成部分时，可以增加空间延展性，使得蛋白组成部分的空间折叠、构象尽量不受互相影响的连接子。

在本申请中，术语“刚性连接子”是指当连接不同蛋白组成部分时，能够保持蛋白组成部分之间固定距离的连接子。

在本申请中，术语“螺旋连接子”是指其中的刚性单元能自身内部或者与相同相邻序列之间形成螺旋（例如 α -螺旋），从而使得形成的融合蛋白具有相对稳定立体构象的连接子。

在本申请中，术语“非螺旋连接子”是指不能够形成螺旋结构的连接子。

5 在某些实施方式中，所述柔性连接子包括含有甘氨酸和丝氨酸的连接子。在某些实施方式中，所述含有甘氨酸和丝氨酸的连接子包括如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 22 所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。在某些实施方式中，所述第一连接子或所述第二连接子包括如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 或者 SEQ ID NO: 10 22 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述第一连接子或所述第二连接子由如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 或者 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列组成。

在某些实施方式中，所述刚性连接子含有包括如 SEQ ID NO: 23 所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。在某些实施方式中，所述第一连接子或所述 15 第二连接子包括如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述第一连接子或所述第二连接子由如 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列组成。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 112 20 或者 SEQ ID NO: 126 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 112 或者 SEQ ID NO: 126 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 36、 25 SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 112 或者 SEQ ID NO: 126 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、

至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 36、SEQ ID NO: 37、SEQ ID NO: 38、SEQ ID NO: 39、SEQ ID NO: 40、SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO: 43、SEQ ID NO: 44、SEQ ID NO: 45、SEQ ID NO: 112 或者 SEQ ID NO: 126 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但经 EK 酶切之后仍然保留 KLK1 的功能或活性（例如，能够催化激肽原释放活性激肽）。

f) 信号肽

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白进一步包括信号肽。

本申请中使用的术语“信号肽”是指可以参与蛋白质的成熟或前体形式的分泌或定向转运的氨基酸残基序列。信号肽通常位于前体或成熟蛋白序列的 N 末端。信号肽可以是内源的或外源的。成熟蛋白中一般不存在信号肽。通常情况下，在蛋白转运后，信号肽通过信号肽酶从所述蛋白中被切割掉。

在某些实施方式中，信号肽是外源的。在某些实施方式中，所述信号肽位于 KLK1 融合蛋白的 N 末端。在某些实施方式中，所述信号肽包含如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示，或者与如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述信号肽由如 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述信号肽由如 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列组成。

在某些实施方式中，本申请所述的 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

SP-L3-LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，SP 表示不存在或者信号肽，L3 表示键或第三连接子，LB 表示不存在或标签，MP 表示掩蔽肽，L1 表示键或第一连接子，P1 表示第一多肽，L2 表示键或第二连接子，P2 表示第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示标签，MP 表示掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示所述第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示 HIS 标签，MP 表示肠激酶识别序列，L1 表示键，P1 表示人 KLK1 蛋白，L2 表示第二连接子，P2 表示 Fc 结构域。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多

肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如
5 SEQ ID NO: 2 、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如
10 SEQ ID NO: 2 、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如
15 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如
20 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如
25 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如

SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示如 SEQ ID NO: 24 或者 SEQ ID NO: 25 所示的

信号肽，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

5 在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 10 11 所示的第二多肽。

 在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 15 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

 在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 20 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

 在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 25 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或
5 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二
10 连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二
连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二
15 连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二
20 连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的第一多肽，L2 表示第二
25 连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示

的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 12 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接

子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 13 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 14 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，SP 表示不存在，L3 表示两个甘氨酸（GG）形成的连接子，LB 表示如 SEQ ID NO: 16 所示的 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的第一多肽，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 15 所示的第二多肽。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 110 或者 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 110 或者 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 110 或者 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 26、SEQ ID NO: 27、SEQ ID NO: 28、SEQ ID NO: 29、SEQ ID NO: 30、SEQ ID NO: 31、SEQ ID NO: 32、SEQ ID NO: 33、SEQ ID NO: 34、SEQ ID NO: 35、SEQ ID NO: 110 或者 SEQ ID NO: 124 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、

至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但在经 EK 酶切之后仍然保留 KLK1 的功能或活性（例如，能够催化激活肽原释放活性激肽）。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111 或者 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111 或者 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111 或者 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 100、SEQ ID NO: 101、SEQ ID NO: 102、SEQ ID NO: 103、SEQ ID NO: 104、SEQ ID NO: 105、SEQ ID NO: 106、SEQ ID NO: 107、SEQ ID NO: 108、SEQ ID NO: 109、SEQ ID NO: 111 或者 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但在经 EK 酶切之后仍然保留 KLK1 的功能或活性（例如，能够催化激活肽原释放活性激肽）。

g) 核酸

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码
5 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列。

10 在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID
15 NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码
20 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列。

25 在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码
5 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列。

10 在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 82 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 86 所示的核苷酸序列。

15 在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 87 或 SEQ ID NO: 88 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含与如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID
20 NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的序列同一性的核苷酸序列。在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID
25 NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列。在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子由如 SEQ ID NO: 66、

SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列组成。

本申请所用的术语“核酸”或“核苷酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核酸 (DNA) 或核糖核酸 (RNA) 及其聚合物。除非另有说明，否则特定的核苷酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体 (例如简并的密码子取代)、等位基因、直向同源物、SNP 和互补序列以及明确指出的序列。具体而言，简并的密码子取代可通过产生这样的序列来实现：其中一个或多个选定的 (或全部) 密码子的第三位置被混合碱基和/或脱氧肌苷残基取代 (参见 Batzer *et al.*, *Nucleic Acid Res.* 19: 5081 (1991); Ohtsuka *et al.*, *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985) 以及 Rossolini *et al.*, *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994))。

使用传统的步骤，可以容易地对所述编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子进行分离和测序 (例如通过使用能够与编码所述融合蛋白的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。编码 DNA 也可以通过合成方法获得。

15 ***h) 载体和蛋白表达系统***

在某些实施方式中，在本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中，所述含有编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子的重组载体选自下组：质粒、人工染色体和病毒载体。

使用本领域公知的重组技术，可以将编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子插入载体，用于进一步的克隆 (DNA 的扩增) 或用于表达。有多种载体可供选择。载体组分通常包括但不限于下列的一种或多种：信号序列、复制起始点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子 (例如 SV40、CMV、EF-1 α) 和转录终止序列。

载体的实例包括但不限于：逆转录病毒 (包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒 (例如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒 (例如 SV40)、 λ 噬菌体和 M13 噬菌体、pcDNA 质粒 (例如 pcDNA3.4 质粒)、pMD18-T、pOptivec、pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、

pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pCDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos 等。

在某些实施方式中，本申请提供的 KLK1 融合蛋白的制备方法中使用的蛋白表达系统为细胞表达系统。在某些实施方式中，所述细胞表达系统选自下组：细菌、真菌、植物细胞或动物细胞。

在某些实施方式中，所述细菌选自下组：芽孢杆菌属 (*Bacilli*)、梭菌属 (*Clostridia*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、贪铜菌属 (*Cupriavidus*)、代尔夫特菌属 (*Delftia*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、红球菌属 (*Rhodococcus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、志贺氏菌属 (*Shigella*) 和链霉菌属 (*Streptomyces*)。在某些实施方式中，所述细菌选自下组：大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 和铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*)。在某些实施方式中，所述细胞是大肠杆菌细胞。

在某些实施方式中，所述真菌选自下组：假丝酵母 (*Candida*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、克鲁维酵母 (*Kluyveromyces*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 和粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)。

在某些实施方式中，所述动物细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是人细胞或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是 CHO-K1 细胞或者 CHO-S 细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是人胚胎肾细胞 293 (HEK293 细胞)。

25 **步骤(2)**

步骤(2)是将步骤(1)中得到的 KLK1 融合蛋白与所述蛋白酶混合进行特异性酶切反应，去除所述掩蔽肽。在某些实施方式中，在步骤(2)进行特异性酶切反应之前纯化步骤(1)中得到的 KLK1 融合蛋白。

不受任何理论的限制,但是认为包含掩蔽肽的 KLK1 融合蛋白属于制备有活性的 KLK1 融合蛋白过程中产生的中间体,其本身并不具有 KLK1 酶的活性,例如不具有裂解激肽原释放激肽的活性。但是当包含掩蔽肽的 KLK1 融合蛋白与能够特异性识别和切割所述掩蔽肽的蛋白酶混合进行特异性酶切反应,去除所述掩蔽肽之后,形成的 KLK1 融合蛋白(例如, KLK1-Fc 融合蛋白)则具有 KLK1 酶活性,例如,能够裂解激肽原释放激肽。在某些实施方式中,去除掩蔽肽之后形成的 KLK1 融合蛋白仍然保留野生型 KLK1 的功能或活性(例如,仍然保留裂解激肽原释放激肽的酶活性)。本领域技术人员可以采用本领域中已知的方法测定 KLK1 融合蛋白的酶活性,例如,本申请实施例 4 中所描述的方法。在某些实施方式中,由本申请所述的方法制备得到的 KLK1 融合蛋白裂解激肽原释放激肽的活性为 0.3~3 PNAU/mg(例如, 0.4 PNAU/mg、0.5 PNAU/mg、0.6 PNAU/mg、0.7 PNAU/mg、0.8 PNAU/mg、0.9 PNAU/mg、1 PNAU/mg、1.5 PNAU/mg、2 PNAU/mg、2.5 PNAU/mg 等)。

在某些实施方式中,将步骤(1)中得到的 KLK1 融合蛋白与所述蛋白酶混合进行特异性酶切反应,去除所述掩蔽肽之后得到的 KLK1 融合蛋白包含如 SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 114 或者 SEQ ID NO: 128 所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 114 或者 SEQ ID NO: 128 所示的氨基酸序列组成。在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 114 或者 SEQ ID NO: 128 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列

与如 SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 114 或者 SEQ ID NO: 128 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性（例如，能够催化激肽原释放活性激肽）。

融合蛋白

10 在一个方面，本申请提供了一种融合蛋白，其包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，

- a) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；
- b) 所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且
- 15 c) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。

本申请的“制备融合蛋白的方法”部分中描述的掩蔽肽、第一多肽和第二多肽也适用于本部分“融合蛋白”里的掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，因此不再在此赘述。

在某些实施方式中，所述掩蔽肽选自下组：肠激酶（EK）识别序列、凝血酶识别序列、凝血因子 Xa 识别序列、烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶识别序列、SUMO 蛋白酶识别序列和转肽酶（Sortase）识别序列。在某些实施方式中，所述掩蔽肽是肠激酶（EK）识别序列。在某些实施方式中，所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5（VDDDDK）所示。

在某些实施方式中，所述第一多肽为人 KLK1 蛋白或者其变体。在某些实施方式中，所述第一多肽为人 KLK1 蛋白。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所

示的氨基酸序列具有至少 90%（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%）序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%）序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 115 所示的氨基酸序列具有至少 90%（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%）序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 115 所示。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 122 所示的氨基酸序列具有至少 90%（例如，至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%）序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。在某些实施方式中，所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 122 所示。

在某些实施方式中，所述第二多肽为 Fc 结构域或白蛋白。在某些实施方式中，所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白进一步包含标签。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白进一步包含 HIS 标签。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白进一步包含由 5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个或更多个组氨酸组成的 HIS 标签。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，LB 表示不存在或标签，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键或第一连接

子，P1 表示所述第一多肽，L2 表示键或第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，LB 表示标签，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键，P1 表示所述第一多
5 肽，L2 表示第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示所述肠激酶识别序列，L1 表示键，P1 表
示人 KLK1 蛋白，L2 表示第二连接子，P2 表示 Fc 结构域。

10 在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，L1
表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID
NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122
15 所示的氨基酸序列，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO:
12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，L1
20 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列，L2 表示第二连接子，P2
表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ
ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2，

25 其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，L1

表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的氨基酸序列，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构:

5 LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的氨基酸序列，L2 表示第二连接子，P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

10 在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构:

LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中, LB 表示 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列, L2 表示如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构:

LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中, LB 表示 HIS 标签, MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列, L1 表示键, P1 表示如 SEQ ID NO: 115 所示的氨基酸序列, L2 表示如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列, P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

25 在某些实施方式中,所述 KLK1 融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构:

LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中，LB 表示 HIS 标签，MP 表示如 SEQ ID NO: 5 所示的氨基酸序列，L1 表示键，P1 表示如 SEQ ID NO: 122 所示的氨基酸序列，L2 表示如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，P2 表示如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示的氨基酸序列。

在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白包括如 SEQ ID NO: 26~65、100~114、124~128 中任一个序列所示的氨基酸序列。在某些实施方式中，所述 KLK1 融合蛋白由如 SEQ ID NO: 26~65、110~114、124~128 中任一个序列所示的氨基酸序列组成。

核酸

在另一方面，本申请提供了一种分离的核酸分子，其包含编码本申请所述的 KLK1 融合蛋白的核苷酸序列。

在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子包含：

- a) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列；
- b) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列；
- c) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列；
- d) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列；
- e) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列；
- f) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列；

- g) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列;
- h) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列;
- 5 i) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列;
- j) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列;
- k) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列; 或者
- 10 l) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 82 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 83、SEQ ID NO: 84、SEQ ID NO: 85 或 SEQ ID NO: 86 所示的核苷酸序列。在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子进一步包含如 SEQ ID NO: 87 或 SEQ ID NO: 88 所示的核苷酸序列。

在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子包括如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列，或者与其具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 81%、至少 82%、至少 83%、至少 84%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、或者至少 99% 的序列同一性。在某些实施方式中，本申请提供的核酸分子由如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO:

116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列组成。

载体和细胞

在另一方面，本申请提供了一种载体，其包含编码本申请所述的 KLK1 融合蛋白的核酸分子。

- 5 在另一方面，本申请还提供了一种蛋白表达系统，其包含根据本申请所述的编码 KLK1 融合蛋白的核酸分子或者根据本申请所述的载体。

在另一方面，本申请还提供了一种蛋白表达系统的构建方法，包括将编码本申请所述的 KLK1 融合蛋白的核酸分子引入载体中以构建表达载体；将所述表达载体导入蛋白表达系统中。

- 10 使用本领域公知的重组技术，可以将编码所述的 KLK1 融合蛋白的分离的多核苷酸插入载体，用于进一步的克隆（DNA 的扩增）或用于表达。有多种载体可供选择。载体组分通常包括但不限于下列的一种或多种：信号序列、复制起始点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子（例如 SV40、CMV、EF-1 α ）和转录终止序列。

- 15 在某些实施方式中，本申请提供的核酸编码 KLK1 融合蛋白、与核酸序列可操作连接的至少一种启动子（例如 SV40、CMV、EF-1 α ）和至少一种选择标签。载体的实例包括但不限于：逆转录病毒（包括慢病毒）、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒（例如单纯疱疹病毒）、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳多空病毒（例如 SV40）、 λ 噬菌体和 M13 噬菌体、质粒 pcDNA3.4、pMD18-T、pOptivec、
20 pCMV、pEGFP、pIRES、pQD-Hyg-GSeu、pALTER、pBAD、pcDNA、pCal、pL、pET、pGEMEX、pGEX、pCI、pEGFT、pSV2、pFUSE、pVITRO、pVIVO、pMAL、pMONO、pSELECT、pUNO、pDUO、Psg5L、pBABE、pWPXL、pBI、p15TV-L、pPro18、pTD、pRS10、pLexA、pACT2.2、pCMV-SCRIPT.RTM.、pCDM8、pCDNA1.1/amp、pcDNA3.1、pRc/RSV、PCR 2.1、pEF-1、pFB、pSG5、pXT1、
25 pCDEF3、pSVSPORT、pEF-Bos 等。

可以将包含编码所述 KLK1 融合蛋白的核酸序列的载体引入宿主细胞，用于克隆或基因表达。适用于克隆或表达本申请中所述的载体中的 DNA 的宿主细胞

为上述的原核、酵母或高等真核细胞。适用于本申请用途的原核细胞包括真细菌，如革兰氏阴性菌或革兰氏阳性菌，例如，肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*)，例如，埃希氏菌属 (*Escherichia*) (例如，大肠杆菌 (*E. coli*))、肠杆菌属 (*Enterobacter*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷白氏杆菌属 (*Klebsiella*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*) (例如，鼠伤寒沙门(氏)杆菌 (*Salmonella typhimurium*))、沙雷氏菌属 (*Serratia*) (例如，粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescans*))、志贺氏菌属 (*Shigella*)、杆菌属 (*Bacilli*) (例如，枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) 和地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*))、假单胞菌属 (*Pseudomonas*) (例如，绿脓杆菌 (*P. aeruginosa*))、以及链霉菌属 (*Streptomyces*)。在某些实施方式中，所述细胞是大肠杆菌细胞。

除了原核细胞以外，真核生物细胞，例如真核微生物如丝状真菌或酵母也可用作编码融合蛋白的载体的合适的克隆或表达宿主。酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)，或面包酵母是最常用的低等真核宿主微生物。但是，许多其他属、种和株都比较常用且在本申请中适用，例如，粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)；克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 宿主，例如，乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*)、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、魏氏克鲁维酵母 (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilarum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克斯克鲁维酵母 (*K. marxianus*)；解脂耶氏酵母 (*Yarrowia*) (EP 402,226)；巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070)；假丝酵母 (*Candida*)；里氏木霉 (*Trichoderma reesia*) (EP 244,234)；链孢霉 (*Neurospora crassa*)；西方许旺酵母 (*Schwanniomyces*)，例如，西方许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*)；和丝状真菌 (*filamentous fungi*)，例如，脉孢菌 (*Neurospora*)、青霉菌 (*Penicillium*)、弯颈霉 (*Tolypocladium*) 和曲霉菌 (*Aspergillus*) (例如，钩巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*))。在某些实施方式中，所述真核生物细胞是哺乳动物细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是人细胞或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是 CHO-K1 细胞或者 CHO-S 细胞。在某些实施方式中，所述哺乳动物细胞是人胚胎肾细胞 293 (HEK293 细胞)。

药物组合物

在另一方面，本申请提供了一种药物组合物，其包含本申请所述的 KLK1 融合蛋白、包含本申请所述的核酸、包含本申请所述的载体或者包含本申请所述的细胞，以及药学上可接受的载体。

5 用于本申请中公开的药物组合物的药学上可接受的载体可包括，例如，药学上可接受的液体、凝胶或固体载剂、水相溶媒、非水相溶媒、抗微生物物质、等渗物质、缓冲液、抗氧化剂、麻醉剂、悬浮剂/分散剂、螯合剂、稀释剂、佐剂、辅料或无毒辅助物质，其他本领域公知的组分或以上的多种组合。

10 适用的组分可包括，例如，抗氧化剂、填充剂、粘合剂、崩解剂、缓冲液、防腐剂、润滑剂、搅味剂、增稠剂、着色剂、乳化剂或稳定剂例如糖和环糊精。适用的抗氧化剂可包括，例如，甲硫氨酸、抗坏血酸、EDTA、硫代硫酸钠、铂、过氧化氢酶、柠檬酸、半胱氨酸、巯基甘油、巯基乙酸、巯基山梨醇、丁基甲基茴香醚、丁基化羟基甲苯和/或没食子酸丙酯。如本申请所公开，在包含本申请公开的 KLK1 融合蛋白的组合物中包括一种或多种抗氧化剂如甲硫氨酸，可降低所述
15 KLK1 融合蛋白的氧化。本申请进一步提供多种防止所述 KLK1 融合蛋白氧化、延长其保质期和/或提高其活性的方法，例如，通过将本申请中提供的 KLK1 融合蛋白与一种或多种抗氧化剂（例如，甲硫氨酸）混合来实现。

20 进一步地说，药学上可接受的载体可包括，例如，水相介质如氯化钠注射液、林格氏液注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、或葡萄糖和乳酸林格注射液、非水介质例如：植物来源的不挥发性油、棉花子油、玉米油、芝麻油、或者花生油、细菌抑制或真菌抑制浓度下的抗菌物质、等渗剂如：氯化钠或葡萄糖、缓冲液如：磷酸盐或枸橼酸盐缓冲液，抗氧化剂如：硫酸氢钠，局部麻醉剂如：盐酸普鲁卡因，助悬剂和分散剂如：羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮，乳化剂如：聚山梨醇酯 80（吐温-80）、螯合试剂如 EDTA（乙二胺四乙酸）或 EGTA（乙二醇双（2-氨基乙基醚）四乙酸）、乙醇、聚乙二醇、丙二
25 醇、氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。作为运载体的抗菌剂可加入多剂量容器中的药物组合物中，其包括酚类或甲酚、汞制剂、苯甲醇、氯代丁醇、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、噻汞撒、氯苯甲烷铵和氯苯乙铵。适用的辅料可包括，例如，

水、盐、葡萄糖、甘油或乙醇。适用的无毒辅助物质可包括，例如，润湿剂、乳化剂、pH 缓冲剂、稳定剂、增溶剂，或者醋酸钠、去水山梨糖醇月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯或者环糊精之类的物质。

所述药物组合物可以是液体溶液、悬浮液、乳剂、丸剂、胶囊、片剂、持续
5 释放制剂或粉末。口服制剂可以包括标准运载体如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

在某些实施方式中，所述药物组合物被制剂成可注射的组合物。可注射的药物组合物可以任何常规的形式制备，例如，液体溶剂、悬浮剂、乳化剂或适用于产生液体溶剂、悬浮剂或乳化剂的固体形式。注射制剂可包括现用的无菌和/或无
10 热原溶液、使用前现与溶剂结合的无菌干燥的可溶物，如冻干粉，包括皮下片、注射即用的无菌悬浮剂、使用前现与介质结合的无菌干燥不溶产品，和无菌和/或无热原的乳剂。溶剂可以为水相或非水相。

在某些实施方式中，单位剂量的注射制剂包装在一个安瓿、一支管或一支带有针的针筒中。本领域习知，所有注射给药的制剂应为无菌无热原。

在某些实施方式中，通过将本申请中公开的 KLK1 融合蛋白溶解于某适当的溶剂中可制备无菌冻干的粉末。所述溶剂可含有一种可提高粉末或由粉末制得的重组溶液的稳定性，或改善粉末或重组溶液的其他药理组分。适用的辅料包括，但不限于，水、葡萄糖、三梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其他适用的物质。溶剂可含有缓冲液，如枸橼酸缓冲液、磷酸钠或磷酸钾
20 缓冲液或其他本技术人员公知的缓冲液，在一种实施方式中，缓冲液的 pH 为中性。在本领域公知的标准条件下进行对所述溶解进行随后的过滤除菌，然后冻干制得理想的制剂。在一种实施方式中，将所得的溶剂分装至小管中冻干。每支小管可容纳单次剂量或多次剂量的所述 KLK1 融合蛋白或其组合物。每支小管中的装入量可略微高于每次剂量所需或多次剂量所需（例如 10%过量），从而保证取
25 样精确和给药精确。冻干粉可在适当的条件下储存，如在约 4°C 到室温范围。

用注射用水将冻干粉重溶得到用于注射给药的制剂。在一种实施方式中，可将冻干粉加至无菌无热原水或其他适用的液体载体中重溶。精确的量由选择的疗法决定，可根据经验值决定。

治疗或预防疾病的方法

在另一方面，本申请提供了一种治疗或预防疾病的方法，其包括向需要治疗或预防的受试者施用本申请所述的 KLK1 融合蛋白（例如，根据本发明所述的方法制备得到的分离的 KLK1 融合蛋白），其中，所述疾病选自下组：缺血性疾病、
5 出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病。

在另一方面，本申请提供了本申请所述的 KLK1 融合蛋白（例如，根据本发明所述的方法制备得到的分离的 KLK1 融合蛋白）在制备用于治疗或预防缺血性疾病、出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病的药物中的用途。在某些实施方式中，本申请提供了本申请所述的 KLK1 融合蛋白（例如，根据本发明
10 所述的方法制备得到的分离的 KLK1 融合蛋白）在制备用于治疗或预防缺血性疾病、出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病的药物中的用途，所述治疗或预防包括向有需要的受试者施用所述药物。

在另一方面，本申请提供了本申请所述的 KLK1 融合蛋白（例如，根据本发明所述的方法制备得到的分离的 KLK1 融合蛋白）用于治疗或预防疾病的用途，
15 其中，所述疾病选自下组：缺血性疾病、出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病。

在某些实施方式中，所述缺血性疾病选自下组：脑缺血、缺血性中风、心肌缺血、缺血性结肠炎、肢体缺血、皮肤缺血、缺血型脑中风、短暂性脑缺血发作（TIA）和创伤性脑损伤（TBI）。在某些实施方式中，所述缺血性疾病为急性缺血
20 血型脑中风。在某些实施方式中，所述缺血性疾病为轻-中度急性血栓性脑梗死。

在某些实施方式中，所述出血性疾病为出血性中风。在某些实施方式中，所述出血性中风为脑内出血性中风或者蛛网膜下腔出血性中风。

在某些实施方式中，所述肾病为慢性肾病、糖尿病肾病或急性肾损伤。

在某些实施方式中，所述代谢性疾病选自下组：糖尿病（例如，1 型糖尿病、
25 2 型糖尿病）、肥胖症、胰岛素抵抗、高血糖症和高胰岛素血症。

在某些实施方式中，所述神经退行性疾病选自下组：阿尔茨海默病、运动神经元病、亨廷顿病和帕金森病。

本申请中提到的 SEQ ID NO 及其描述、对应的氨基酸序列或核苷酸序列如表 1 所示。

表 1. SEQ ID NO 及其描述和代表的氨基酸或核苷酸序列

SEQ ID NO:	描述	氨基酸或核苷酸序列
1	人野生型 KLK1 蛋白 (UniProtKB 登录号 P06870)	MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECE QHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTA HCISDNYQLWLGRHNLFFDENTAQFVHVSESF PHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLRLTE PADTITDAVKVVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIE PENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAHVQKVT DFMLCVGHLEGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQ GVTSWGYPVPCGTPNKPSVAVRVLVSYVKWIEDT AENS
2	人成熟 KLK1 蛋白 (AA25-262)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAACHCISDNYQLWLGRHNLFFDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYPVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENS
3	小鼠野生型 KLK1 蛋白 (UniProtKB 登录号 P15947)	MRFLILFLALSLGGIDAAPPVQSRIVGGFNCEK NSQPWQVAVYRFTKYQCGGILLNANWVLTA HCHNDKYQVWLGKNNFLEDEPSAQHRLVSKAI PHPDFNMSLLNEHTPQPEDDYSNDLMLRLKK PADITDVVKPIDLPTEEPKLGSTCLASGWGSITP VKYEYPDELQCVNLKLLPNEDCAKAHIEKVTD DMLCAGDMDGGKDTCAGDSGGPLICDGVLQG ITSWGSPCGKPNVPGIYTRVLNFNTWIRETMA END
4	EK 识别序列 1	DDDDK
5	EK 识别序列 2	VDDDDK
6	凝血酶识别序列	LVPRGS
7	凝血因子 Xa 识别序列	IEGRG

8	烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶 识别序列	ENLYFQG
9	SUMO 蛋白酶识 别序列	MSDQEAKPSTEDLGDKKEGEYIKLKVIGQDSSE IHFKVKMTTHLKKLKESYCQRQGVPMNSLRFL FEGQRIADNHTPKELGMEEEDVIEVYQEQTGG HSTV
10	转肽酶 (Sortase) 识别序列	LPXTG (X 为任何氨基酸)
11	IgG1 Fc	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	IgG4 Fc	GPPCPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
13	IgG1 Fc (具有 YTE 突变)	TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
14	IgG4 Fc (具有 YTE 突变)	GPPCPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREP VTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

15	白蛋白	DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLIAFAQYLQ QCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENCDK SLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP ERNECFLQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFH DNEETFLKKYLYEIARRHPYFYAPELLFFAKRY KAAFTECCQAADKAAACLLPKLDEL RDEGKASS AKQRLK CASLQKFGERA FKAWAVARLSQRFPK AEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDR ADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIA EVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAK DVFLGMFLY EYARRHPDYSV VLLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLI KQNC ELF EQLGEYKFQNAL LVRYTKKV PQVST PTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDY LSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNR RPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSE KERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDD FAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVAASQAA LGL
16	HIS 标签	HHHHHH
17	连接子	GGGS
18	连接子	GGGGS
19	连接子	GGGGGS
20	连接子	GGGGSGGGGS
21	连接子	GGGSSSS
22	连接子	GSSGSSG
23	连接子	EAAAK
24	信号肽	MWFLVLCLALSLGGTGAA
25	IL-2 信号肽	MYRMQLLSICIALSLALVTNS

26	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1-IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGD SG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSTCPPCAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDS DGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
27	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGD SG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSTCPPCAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
28	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGD SG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHE

		ALHNHYTQKSLSLSPGK
29	IL2-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GGGSSSS-IgG1 Fc	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGGHHHHHHVDD DDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGI LVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDE NTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADED YSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEV GSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPN DECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVG DSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSV AVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSSTCPPCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
30	IL2-GG-His-VDDDDK-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc	MYRMQLLSICIALSLALVTNSGGHHHHHHVDD DDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGI LVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDE NTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADED YSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEV GSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPN DECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVG DSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSV AVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
31	SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-IgG1 Fc	MWFLVLCLALS LGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDE NTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGD SGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPV

		LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
32	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSDG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
33	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSDG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGPPCPSCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
34	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG4 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSDG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGPPCPSCPAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVS QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP

		SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
35	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGGSGGGGS- IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDEN TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGGGSGGGGSTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
36	His-VDDDDK- hKLK1-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDENTTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSAVRVLSYVKWIEDTIAENSTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
37	His-VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDENTTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSSS STCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK

		CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
38	His-VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAHCISDNYQLW LGRHNLFD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLE GGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
39	His-VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAHCISDNYQLW LGRHNLFD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLE GGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSSS STCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
40	His-VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAHCISDNYQLW LGRHNLFD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLE GGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE

		NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
41	His-VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDfMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTswGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTcVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLp PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	His-VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDfMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTswGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
43	His-VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDfMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTswGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GGPPCPSCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTcVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW

		QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
44	His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-YTE IgG4 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLE GGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GGPPCSPCAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITRE PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK
45	His-VDDDDK-hKLK1-GGGSGGGGS-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLE GGKDT CVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGGSG GGGSTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
46	VDDDDK-hKLK1-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNL FD DENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTD FMLCVGHLEGGKDT CV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSTCPPCAPELLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

47	VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSSTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
48	VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
49	VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSSTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

50	VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
51	VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
52	VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLF DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

53	VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNL DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGGPPCPCSC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG4 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNL DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGGPPCPCSC PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVV VDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQQEEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	VDDDDK- hKLK1- GGGGSGGGGS- IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNL DDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGGSGGGGSTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

56	hKLK1-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFFDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTD FMLCVGHLEGGKDT CVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
57	hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFFDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTD FMLCVGHLEGGKDT CVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSSTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNH YTQKSLSLSPGK
58	hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFFDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTD FMLCVGHLEGGKDT CVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNH YTQKSLSLSPGK

59	hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGGGSSSSTCPPCAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
60	hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK
61	hKLK1- GSSGSSG-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

62	hKLK1- GSSGSSG-Fc (YTE IgG1)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSPAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
63	hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSPAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGGPPCPSCAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
64	hKLK1- GSSGSSG-Fc (YTE IgG4)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSPAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGGPPCPSCAPE FLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDV QEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLSDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFCFSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK

65	hKLK1- GGGSGGGGS- IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGGGSGGGGSTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
66	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1-IgG1 Fc (碱基序列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATCATGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTGAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCG CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCACATGCCC ACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGA CCGTGAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAA GGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAG GTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACG AAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGT GGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG

		TACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGC ACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAA GTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCC CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAG GGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCT GCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC CAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCT TCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGA CAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTT CTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACA ACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTC TCCGGGTAAATGA
67	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc (碱基序列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATCATGTAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGAGGCGG TTCAAGTTCTAGCACATGCCACCGTGCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT

		CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAATAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A
68	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc (碱基序 列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGTAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTT CAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCAATAAGCCTTCTGTGCG CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGAGGCAGC

		GGCTAAGACATGCCACCGTGCCCAGCACCT GAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCT TCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGAT CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTG GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGAG CAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAC AAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCA TCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACC ACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATG AGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTG CCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGG AGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCT GGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA AGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCAT GAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA GCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
69	IL2-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc（碱基序列）	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGC ACTAAGTCTTGCACTTGTACAAACAGTGGT GGCCACCATCATCATCATCATGATGACGA TGACAAGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAG CAGCATTCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGT ACCATTTTCAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATC CTGGTGCACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTG CTCATTGCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGG CTGGGTGCGCCACAACCTTGTTTGACGACGAAA ACACAGCCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAG CTTCCCACACCCTGGCTTCAACATGAGCCTCC TGGAGAACCACACCCGCCAAGCAGACGAGG ACTACAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTG ACAGAGCCTGCTGATACCATCACAGATGCTGT GAAGGTCGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCC GAAGTGGGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCT GGGGCAGCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTT CCAGATGATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAT CCTGCCTAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCAC GTCCAGAAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTG TCGGACACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTG TGTGGGTGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGT GATGGTGTGCTCCAAGGTGTCACATCATGGG GCTACGTCCCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCT TCTGTGCGCGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAA GTGGATCGAGGACACCATAGCGGAGAACTCC

		GGAGGCGGTTCAAGTTCTAGCACATGCCCAC CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACC GTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAATGA
70	IL2-GG-His- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc（碱基序 列）	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGC ACTAAGTCTTGCACTTGTCAAAACAGTGGT GGCCACCATCATCATCATGATAGATGACGA TGACAAGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAG CAGCATTCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGT ACCATTTTCAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATC CTGGTGCACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTG CTCATTGCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGG CTGGGTCGCCACAACCTGTTTGACGACGAAA ACACAGCCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAG CTTCCCACACCCTGGCTTCAACATGAGCCTCC TGGAGAACCACACCCGCCAAGCAGACGAGG ACTACAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTG ACAGAGCCTGCTGATACCATCACAGATGCTGT GAAGGTCGTGGAGTTGCCCACCGAGGAACCC GAAGTGGGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCT GGGGCAGCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTT CCAGATGATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAAT CCTGCCTAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCAC GTCCAGAAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTG TCGGACACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTG TGTGGGTGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGT GATGGTGTGCTCCAAGGTGTCACATCATGGG GCTACGTCCCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCT TCTGTGCGCGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAA GTGGATCGAGGACACCATAGCGGAGAACTCC

		GAGGCAGCGGCTAAGACATGCCACCGTGCC CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACC CTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATG CGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCG TGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCG GGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTG GTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAG AAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCC GAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATC CCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGC CTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGG CAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTC CCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTC TACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGT GGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGT GATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACG CAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAT GA
71	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG1 Fc（碱基序列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGATAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTTGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG

		TGGCTCTAGCGGTACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGTT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A
72	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG1 Fc（碱基序 列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGATAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG

		TGGCTCTAGCGGTACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC TACATCACCCGGGAACCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGTT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A
73	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc（碱基序列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGTAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCAATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG

		TGGCTCTAGCGGTGGTCCCCCATGCCATCAT GCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATC AGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCAC GTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGA CCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGAT GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA
74	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG4 Fc（碱基序 列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGATAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG

		TGGCTCTAGCGGTGGTCCCCCATGCCATCAT GCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATC AGTCTTCCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACTCTCTACATCACCCGGGAGCCTGAGGTCA CGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAG ACCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGA TGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAG CCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCA GGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCCTCCA TCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACACAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCTGGGT AAATGA
75	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSGGGGS- IgG1 Fc (碱基序 列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGAGGCGG

		TGGATCAGGAGGCGGTGGATCAACATGCCCA CCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGAC CGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAG GACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGT CACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAA GACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAA GCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTAC CGGGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACC AGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTG CAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGC AGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCC CCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCT ATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG CAATGGGCAGCCGGAGAACAACATAAGACC ACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCT TCTTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCA TGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCC GGGTAAATGA
76	EK 酶识别序列 (碱基序列)	gtagatgacgatgacaag
77	人成熟 KLK1 蛋 白 (AA25-262) (碱基序列)	ATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCATT CCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTTC AGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTGC ACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATTG CATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGTG GCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAGC CCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCAC ACCCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGAA CCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAGC CACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAGC CTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGTC GTGGAGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTGG GGAGCACCTGTTTGCTTCCGGCTGGGGCAG CATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCCAGATG ATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAATCCTGCCT AATGATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAGA AGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCGGACA CCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGGT GATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTGT GCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTCC CTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGC GTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCGA

		GGACACCATAGCGGAGAACTCCTGA
78	IgG1 Fc（碱基序列）	acatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtctt cctcttcccccaaaaaccaaggacaccctcatgatctccggaccctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtctc accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg tctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgg gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggctt ctatccagcgcacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacgcctccgtgctggactccgacggctcttctt cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa cgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacga gaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
79	IgG4 Fc（碱基序列）	gggtcccatgcccacatgccagcacctgagttcctggggggaccatc agtcttctgttcccccaaaaaccaaggacactctcatgatctccggac ccctgaggtcacgtgctggtggtggacgtgagccagggaagacccga ggtccagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaga caaaagccgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagct ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc aaggtctccaacaaaggcctccctcctccatcgagaaaaccatctcaa agccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacaccctgccccatc ccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaa ggcttctacccagcgcacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcag ccggagaacaactacaagaccacgcctccctgctggactccgacggct ccttctctctacagcaggtcaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac acacagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga
80	IgG1 Fc YTE（碱基序列）	acatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtctt cctcttcccccaaaaaccaaggacaccctctacatcaccgggaacctg aggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtaa gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaag ccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtctc accgtctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaagg tctccaacaaagccctccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagcc aaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgccccatccgg

		gatgagctgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggctt ctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctcttctt cctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaa cgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgca gaagagcctctccctgtctccgggtaaatga
81	IgG4 Fc YTE (碱基序列)	ggcccccatgccatcatgccagcacctgagttcctggggggaccatc agtcttctgttcccccaaaaccaaggacactctctacatccccggga gcctgaggtcacgtgcgtgggtggagcgtgagccagggaagaccccgga ggtcagttcaactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatccaaga caaagcgcgggaggagcagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgt cctcacgctcctgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaagtgc aaggtctccaacaaaggcctcccgctcctccatcgagaaaaccatctcaa agccaaagggcagccccgagagccacaggtgtacacctgcccccatc ccaggaggagatgaccaagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaa ggcttctacccagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcag ccggagaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggct ccttctcctctacagcaggtcaccgtggacaagagcaggtggcaggag gggaatgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactac acacagaagagcctctccctgtctctgggtaaatga
82	6xHis tag (碱基序列)	caccatcatcatcatcat
83	GGGGS 连接子 (碱基序列)	ggaggcgggtgatca
84	GSSGSSG 连接子 (碱基序列)	ggatcaagtggctctagcgg
85	GGGSSSS 连接子 (碱基序列)	ggaggcgggtcaagtttagc
86	EAAAK 连接子 (碱基序列)	gaggcagcggctaag
87	信号肽 (碱基序列)	atgtggttcctggttctgtgcctcgccctgtccctgggggggactgggtgct gcg
88	IL-2 信号肽 (碱基序列)	atgtacaggatgcaactcctgtcttgcaftgcactaagtcttgcaftgtcac aaacagt
89	SP-prepro-	MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRIVGGWECE

	hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc	QHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAA HCISDNYQLWLGRHNLFDDENTAQFVHVSESF PHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLMLLRLTE PADTITDAVKVVELPTEEPEVGSTCLASGWSIE PENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAHVQKVT DFMLCVGHLEGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQ GVTSWGYPVPCGTPNKPSPAVRVLSYVKWIEDTI AENSEAAAKTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS LSPGK
91	SP-prepro-VDDDDK-hKLK1	MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRVDDDDKIV GGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQ WVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTAQFV HVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLM LLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGSTCLAS GWSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAH VQKVTDMLCVGHLEGGKDTCVGDSGGPLMC DGVLQGVTSWGYPVPCGTPNKPSPAVRVLSYVK WIEDTIAENS
92	SP-prepro-VDDDDK-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAPPIQSRVDDDDKIV GGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVHRQ WVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTAQFV HVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSHDLM LLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGSTCLAS GWSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDECKKAH VQKVTDMLCVGHLEGGKDTCVGDSGGPLMC DGVLQGVTSWGYPVPCGTPNKPSPAVRVLSYVK WIEDTIAENSEAAAKTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK
93	prepro-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc	PPIQSRVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCG GILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDD ENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADE DYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPE VGSTCLASGWSIEPENFSFPDDLQCVDLKILP NDECKKAHVQKVTDMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYPVPCGTPNKPSP

		VAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
94	prepro-hKLK1	PPIQSRIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCG GILVHRQWVLTAAHCISDNQYLWLGRHNLFD DENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADE DYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPE VGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILP NDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENS
95	prepro- VDDDDK- hKLK1	PPIQSRVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYH FSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNQYLWL GRHNLFD DENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLEN HTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENS
96	prepro- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	PPIQSRVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYH FSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNQYLWL GRHNLFD DENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLEN HTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQ CVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAKTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNTKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	SP-prepro- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc (碱基序 列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGCCCCGATT CAGTCCCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTG AGCAGCATTCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCT GTACCATTT CAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCA TCCTGGTGCAACGCCAGTGGGTGCTCACAGC

		TGCTCATTGCATCAGCGACAATTACCAGCTCT GGCTGGGTGCGCCACAACCTTGTTTGACGACGA AAACACAGCCCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAG AGCTTCCCACACCCTGGCTTCAACATGAGCCT CCTGGAGAACCACACCCGCCAAGCAGACGA GGACTACAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC CTGACAGAGCCTGCTGATACCATCACAGATGC TGTGAAGGTTCGTGGAGTTGCCCACCGAGGAA CCCGAAGTGGGGAGCACCTGTTTGCTTCCG GCTGGGGCAGCATCGAACCAGAGAATTTCTC ATTTCCAGATGATCTCCAGTGTGTGGACCTCA AAATCCTGCCTAATGATGAGTGCAAAAAAGC CCACGTCCAGAAGGTGACAGACTTCATGCTG TGTGTCGGACACCTGGAAGGTGGCAAAGACA CCTGTGTGGGTGATTCAGGGGGCCCCGCTGAT GTGTGATGGTGTGCTCCAAGGTGTCACATCAT GGGGCTACGTCCCTTGTGGCACCCCCAATAA GCCTTCTGTGCGCGTCAGAGTGCTGTCTTATG TGAAGTGGATCGAGGACACCATAGCGGAGAA CTCCGAGGCAGCGGCTAAGACATGCCACCG TGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGT CAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGA CACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGAC GGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG GGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAG GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCAT CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCA GCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCA ATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCAC GCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCT TCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAG CAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGC TCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGT AAATGACTCGAGTGC
98	SP-prepro- hKLK1（碱基序 列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGCCCCCGATT CAGTCCCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTG AGCAGCATTTCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCT GTACCATTTCAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCA TCCTGGTGCACCGCCAGTGGGTGCTCACAGC TGCTCATTGCATCAGCGACAATTACCAGCTCT

		GGCTGGGTGCGCCACAACCTTGTTTGACGACGA AAACACAGCCCAGTTTGTTCATGTCAGTGAG AGCTTCCCACACCCTGGCTTCAACATGAGCCT CCTGGAGAACCACACCCGCCAAGCAGACGA GGACTACAGCCACGACCTCATGCTGCTCCGC CTGACAGAGCCTGCTGATACCATCACAGATGC TGTGAAGGTCGTGGAGTTGCCACCGAGGAA CCCGAAGTGGGGAGCACCTGTTTGGCTTCCG GCTGGGGCAGCATCGAACCAGAGAATTTCTC ATTTCCAGATGATCTCCAGTGTGTGGACCTCA AAATCCTGCCTAATGATGAGTGCAAAAAAGC CCACGTCCAGAAGGTGACAGACTTCATGCTG TGTGTCGGACACCTGGAAGGTGGCAAAGACA CCTGTGTGGGTGATTCAGGGGGCCCCGCTGAT GTGTGATGGTGTGCTCCAAGGTGTCACATCAT GGGGCTACGTCCCTTGTGGCACCCCCAATAA GCCTTCTGTGCGCGTCAGAGTGCTGTCTTATG TGAAGTGATCGAGGACACCATAGCGGAGAA CTCCTGA
99	SP-prepro- VDDDDK- hKLK1 (碱基序 列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGCCCCCGATT CAGTCCCGGGTAGATGACGATGACAAGATTG TGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCATTCCCA GCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTTCAGCA CTTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTGCACCG CCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATTGCATCA GCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGTGCGCCA CAACTTGTTTGACGACGAAAACACAGCCCAG TTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCACACCC TGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGAACCAC ACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAGCCACG ACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAGCCTGCT GATACCATCACAGATGCTGTGAAGGTCGTGG AGTTGCCACCGAGGAACCCGAAGTGGGGA GCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCAGCAT CGAACCAGAGAATTTCTCATTTCCAGATGATC TCCAGTGTGTGGACCTCAAATCCTGCCTAAT GATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAGAAG GTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCGGACACC TGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGGTGA TTCAGGGGGCCCCGCTGATGTGTGATGGTGTG CTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTCCC TTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCGCCG TCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCGAG GACACCATAGCGGAGAACTCCTGA
90	SP-prepro- VDDDDK- hKLK1-Fc (IgG1)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGCCCCCGATT CAGTCCCGGGTAGATGACGATGACAAGATTG

	(碱基序列)	TGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCATTCCCA GCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTTTCAGCA CTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTGCACCG CCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATTGCATCA GCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGTCGCCA CAACTTGTTTGACGACGAAAACACAGCCCAG TTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCACACCC TGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGAACCAC ACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAGCCACG ACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAGCCTGCT GATACCATCACAGATGCTGTGAAGGTCTGTGG AGTTGCCCACCGAGGAACCCGAAGTGGGGA GCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCAGCAT CGAACCAGAGAATTTCTCATTTCCAGATGATC TCCAGTGTGTGGACCTCAAATCCTGCCTAAT GATGAGTGCAAAAAAGCCCACGTCCAGAAG GTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCTGGACACC TGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGGTGA TTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTGTG CTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTCCC TTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTCTGCCG TCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCGAG GACACCATAGCGGAGAACTCCGAGGCAGCGG CTAAGACATGCCCACCGTGCCAGCACCTGA ACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC CCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGT TCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCA TAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCA GTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTC CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA AGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGA GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGC CTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGC CGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGA GAACAATAACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCA GGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG AGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG CCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGACTCGAGT GC
--	--------	--

100	GG-His- VDDDDK- hKLK1-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSTCPPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
101	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSS SSTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
102	GG-His- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAK TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

103	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GGGSSSS-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGSS SSTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
104	GG-His- VDDDDK- hKLK1-EAAAK- IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSEAAAK TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
105	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTP EVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

106	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
107	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-IgG4 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK
108	GG-His- VDDDDK- hKLK1- GSSGSSG-YTE IgG4 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDFMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GGPPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLYITRE PEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLK

109	GG-His-VDDDDK-hKLK1-GGGSGGGGS-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTEEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKAHVQKVTDfMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGGGGS GGGGSTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG K
110	SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1 (E121Q+A164 V)-GSSGSSG-IgG1 Fc	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENT AQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDE CKKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
111	GG-His-VDDDDK-hKLK1 (E121Q+A164 V)-GSSGSSG-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTQEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDD LQCVDLKILPNDECKKVHVQKVTDfMLCVGH LEGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYV PCGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGS SGTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

112	His-VDDDDK-hKLK1 (E121Q+A164V)-GSSGSSG-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLW LGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTQEPEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDL QCVDLKILPNDECKKVHVQKVTDfMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTP EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
113	VDDDDK-hKLK1 (E121Q+A164V)-GSSGSSG-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFD DENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQE PEVGSTCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECKKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
114	hKLK1 (E121Q+A164V)-GSSGSSG-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

115	hKLK1 (E121Q+A164 V)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKVHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSPVAVR VLSYVKWIEDTIAENS
116	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1 (E121Q+A164 V)-GSSGSSG- IgG1 Fc （碱基 序列）	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATCATGTAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTT CAGCACTTTCCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCACCCAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCAAAAAAGTCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTCAAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCG CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG TGGCTCTAGCGGTACATGCCCACCGTGCCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTTCAGCCT

		GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG A
117	hKLK1 (E121Q)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDETA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDGSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENS
118	hKLK1 (K162E)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDETA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC EKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDGSG PLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVRVL SYVKWIEDTIAENS
119	hKLK1 (A164V)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDETA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC KKVHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDGSG GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVR VLSYVKWIEDTIAENS
120	hKLK1 (E121Q+K162E)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDETA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC EKAHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDGSG PLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSAVRVL SYVKWIEDTIAENS

121	hKLK1 (K162E+A164V)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTEEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC EKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGDSSG PLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVRVL SYVKWIEDTIAENS
122	hKLK1 (E121Q+K162E+A164V)	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC EKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGDSSG PLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVRVL SYVKWIEDTIAENS
123	hKLK1 (E121Q+A164V) 碱基序列	ATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCATT CCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTTC AGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTGC ACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATTG CATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGTC GCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAGC CCAGTTTGTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCAC ACCCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGAA CCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAGC CACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAGC CTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGTC GTGGAGTTGCCCACCCAGGAACCCGAAGTGG GGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCAG CATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGATG ATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCCT AATGATGAGTGCAAAAAAGTCCACGTCCAGA AGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGCGGACA CCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGGT GATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTGT GCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTCC CTTGTGGCACCCCAATAAGCCTTCTGTGCGCC GTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCGA GGACACCATAGCGGAGAACTCC
124	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1 (E121Q+K162E+A164V)- GSSGSSG-IgG1	MWFLVLCLALSLGGTGAAGGHHHHHHVDDD DKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGIL VHRQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA TAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDY SHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVG STCLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC CEKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCVGDSSG

	Fc	GPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVR VLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPAPELL GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
125	GG-His- VDDDDK- hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V)- GSSGSSG-IgG1 Fc	GGHHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQA ALYHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCSIDNYQL WLGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSL LENHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVK VVELPTQEPEVGSTCLASGWGSIENFSFPDD LQCVDLKILPNDECEKVHVQKVTDfMLCVGHL EGGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVP CGTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
126	His-VDDDDK- hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V)- GSSGSSG-IgG1 Fc	HHHHHHVDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAAL YHFSTFQCGGILVHRQWVLTAAHCSIDNYQLW LGRHNLFDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLE NHTRQADEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKV VELPTQEPEVGSTCLASGWGSIENFSFPDDL QCVDLKILPNDECEKVHVQKVTDfMLCVGHLE GGKDTCVGDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPC GTPNKPSVAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSS GTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
127	VDDDDK- hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V)- GSSGSSG-IgG1 Fc	VDDDDKIVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQ CGGILVHRQWVLTAAHCSIDNYQLWLGRHNL FDDENTAQFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQA DEDYSHDLMLLRLTEPADTITDAVKVVELPTQE PEVGSTCLASGWGSIENFSFPDDLQCVDLKIL PNDECEKVHVQKVTDfMLCVGHLEGGKDTCV GDSGGPLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPS VAVRVLSYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPA

		PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
128	hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V)- GSSGSSG-IgG1 Fc	IVGGWECEQHSQPWQAALYHFSTFQCGGILVH RQWVLTAAHCISDNYQLWLGRHNLFDDENTA QFVHVSESFPHPGFNMSLLENHTRQADEDYSH DLMLRLTEPADTITDAVKVVELPTQEPEVGST CLASGWGSIEPENFSFPDDLQCVDLKILPNDEC EKVHVQKVTDFMLCVGHLEGGKDTCVGDSGG PLMCDGVLQGVTSWGYVPCGTPNKPSVAVRVL SYVKWIEDTIAENSGSSGSSGTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
129	SP-GG-His- VDDDDK- hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V)- GSSGSSG-IgG1 Fc (碱基序列)	ATGTGGTTCCTGGTTCTGTGCCTCGCCCTGTC CCTGGGGGGGACTGGTGCTGCGGGTGGCCAC CATCATCATCATCATGTAGATGACGATGACAA GATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCAT TCCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATT CAGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTG CACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATT GCATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGT CGCCACAACCTGTTTGACGACGAAAACACAG CCCAGTTTGTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCA CACCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGA ACCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAG CCACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAG CCTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGT CGTGGAGTTGCCCACCCAGGAACCCGAAGTG GGGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCA GCATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGAT GATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCC TAATGATGAGTGCGAAAAAAGTCCACGTCCAG AAGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGCGGAC ACCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGG TGATTACGGGGGCCCCGCTGATGTGTGATGGTG TGCTCCAAGGTGTACATCATGGGGCTACGTC CCTTGTGGCACCCCAATAAGCCTTCTGTGCG CGTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCG

		AGGACACCATAGCGGAGAACTCCGGATCAAG TGGCTCTAGCGGTACATGCCCACCGTGCCAG CACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGT GGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGA GGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTG GAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGT CAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGG CTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCT CCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA GAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCC GGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCT GACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA GCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTA CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTG GCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTG ATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATG ACTCGAGTGC
130	hKLK1 (E121Q+K162E+ A164V) 碱基序 列	ATTGTGGGAGGCTGGGAGTGTGAGCAGCATT CCCAGCCCTGGCAGGCGGCTCTGTACCATTTC AGCACTTTCAGTGTGGGGGCATCCTGGTGC ACCGCCAGTGGGTGCTCACAGCTGCTCATTG CATCAGCGACAATTACCAGCTCTGGCTGGGTC GCCACAACCTTGTTTGACGACGAAAACACAGC CCAGTTTGTTTCATGTCAGTGAGAGCTTCCCAC ACCCTGGCTTCAACATGAGCCTCCTGGAGAA CCACACCCGCCAAGCAGACGAGGACTACAGC CACGACCTCATGCTGCTCCGCCTGACAGAGC CTGCTGATACCATCACAGATGCTGTGAAGGTC GTGGAGTTGCCACCCAGGAACCCGAAGTGG GGAGCACCTGTTTGGCTTCCGGCTGGGGCAG CATCGAACCAGAGAATTTCTCATTTCAGATG ATCTCCAGTGTGTGGACCTCAAAATCCTGCCT AATGATGAGTGCGAAAAAGTCCACGTCCAGA AGGTGACAGACTTCATGCTGTGTGTGTCGGACA CCTGGAAGGTGGCAAAGACACCTGTGTGGGT GATTCAGGGGGCCCGCTGATGTGTGATGGTGT GCTCCAAGGTGTCACATCATGGGGCTACGTCC CTTGTGGCACCCCCAATAAGCCTTCTGTGCC GTCAGAGTGCTGTCTTATGTGAAGTGGATCGA GGACACCATAGCGGAGAACTCC

具体实施方式

所有实施例中的涉及的生物学材料如菌株、各种克隆与表达质粒、培养基、工具酶、缓冲液，以及各种培养方法、蛋白提取和纯化方法、其它的分子生物学操作方法，均为该领域技术人员所熟悉，可以参考 Sambrook 等人编著的“分子克隆”（实验室手册，冷泉港，1989）及“精编分子生物学实验指南”（美/F.奥斯伯等著，颜子颖等译，北京，科学出版社，1998）。

实施例 1：KLK1 融合蛋白的质粒构建和表达

合成编码 KLK1 融合蛋白的目的基因，分别将各种目的基因插入 pcDNA3.4 载体的 AgeI 和 EcoRV 位点（如图 1 所示），构建 pcDNA3.4-KLK1-Fc 质粒。

10 将构建的 pcDNA3.4-KLK1-Fc 质粒转化到大肠杆菌（*E. coli*）DH5α 感受态细胞中，经含氨苄青霉素（Amp⁺）的 LB 琼脂培养皿抗性选择，然后挑取单克隆菌落至含相应抗生素的 LB 培养液中摇菌培养，提取质粒。然后将提取的质粒转染入 HEK293 细胞，使用 Expi293™ 表达系统表达目的蛋白。

15 构建的质粒、插入的目的基因及其表达的融合蛋白如下所示，其中，每种质粒名称中的 SP 表示信号肽；GG 表示两个甘氨酸；His 表示组氨酸标签；VDDDDK 表示肠激酶识别序列；hKLK1 表示人 KLK1；GGGSSSS、GSSGSSG、GGGGSGGGGS、EAAAK 表示连接子；IgG1 Fc 表示来自人 IgG1 的 Fc 结构域；YTE IgG1 Fc 表示在来自人 IgG1 的 Fc 结构域的基础上具有 M252Y、S254T 和 T256E 突变；IgG4 Fc 表示来自人 IgG4 的 Fc 结构域；YTE IgG4 Fc 表示在来自人 IgG4 的 Fc 结构域的基础上具有 M252Y、S254T 和 T256E 突变。

- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 66 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 1 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 100 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GGGSSSS-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 67 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 2.1 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 101 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc 质粒中插入

的目的基因如 SEQ ID NO: 68 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 2.2 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 102 所示的氨基酸序列；

- 5 ● pcDNA3.4-IL2-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GGGSSSS-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 69 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 2.3 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 103 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-IL2-GG-His-VDDDDK-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 70 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 2.4 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 104 所示的氨基酸序列；
- 10 ● pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 71 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.1 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 105 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-YTE IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 72 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.2 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 106 所示的氨基酸序列；
- 15 ● pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-IgG4 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 73 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.3 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 107 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GSSGSSG-YTE IgG4 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 74 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.4 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 108 所示的氨基酸序列；
- 20 ● pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1-GGGGSGGGGS-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 75 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.5 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 109 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-prepro-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 97 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 3.6”）包含如 SEQ ID NO: 93 所示的氨基酸序列；
- 25 ● pcDNA3.4-SP-prepro-hKLK1 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 98 所

示，表达的蛋白（下称“蛋白 4.1”）包含如 SEQ ID NO: 94 所示的氨基酸序列；

- pcDNA3.4-SP-prepro-VDDDDK-hKLK1 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 99 所示，表达的蛋白（下称“蛋白 4.2 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 95 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-prepro-VDDDDK-hKLK1-EAAAK-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 90 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 4.3 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 96 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1 (E121Q+A164V)-GSSGSSG-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 116 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 5.1 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 111 所示的氨基酸序列；
- pcDNA3.4-SP-GG-His-VDDDDK-hKLK1 (E121Q+K162E+A164V)-GSSGSSG-IgG1 Fc 质粒中插入的目的基因如 SEQ ID NO: 129 所示，表达的融合蛋白（下称“融合蛋白 6.1 中间体”）包含如 SEQ ID NO: 125 所示的氨基酸序列。

实施例 2：KLK1 融合蛋白的纯化

2.1. KLK1 融合蛋白的初步纯化

将实施例 1 中制备得到的若干种蛋白（例如：融合蛋白 1 中间体、融合蛋白 2.1 中间体、融合蛋白 2.2 中间体、融合蛋白 2.3 中间体、融合蛋白 2.4 中间体、融合蛋白 3.1 中间体、融合蛋白 3.2 中间体、融合蛋白 3.3 中间体、融合蛋白 3.4 中间体、融合蛋白 3.5 中间体、融合蛋白 3.6、蛋白 4.1、蛋白 4.2 中间体、融合蛋白 4.3 中间体）通过 Ni-NTA 镍柱：通过离心收获条件培养基（4℃，4000 rpm，40 分钟），然后过滤去除细胞碎片，交换到补充有 0.8 mM EDTA 的 PBS 缓冲液中。将 300 ml 澄清的培养基装入 5 ml Ni-NTA 柱（购自 GE），该柱用缓冲液 A（25 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0）预平衡，流速为 3ml/min。用 20 柱体积（CV）的平衡缓冲液（25 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0）洗柱。之后用洗脱缓冲液（25 mM Tris, 150 mM NaCl, 500 mM imidazole,

pH 8.0) 洗脱。将洗脱液透析至 pH 7.4 的 PBS, 最后通过 MILLEX-MP 0.22 μm (购自 MILLIPORE) 过滤。

然后, 再将上述经 Ni-NTA 镍柱纯化的各种蛋白中间体通过 Protein A 柱纯化。具体地, 通过离心收割条件培养基 (4°C, 4000 rpm, 40 min), 然后过滤以清除细胞碎片。将 50ml 澄清的培养基装入 1ml MabSelect SuRe Protein A 柱 (购自 GE), 该柱已用平衡缓冲液 (25mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0) 预平衡, 流速为 1ml/min。用 20 CV 平衡缓冲液 (25mM Tris, 150mM NaCl, pH 8.0) 洗柱。用洗脱缓冲液 (50 mM 柠檬酸钠, 150 mM NaCl, pH 3.0) 洗脱负载有蛋白的柱。之后用中和缓冲液 (1 M 精氨酸, 400 mM 琥珀酸, pH 9.0) 中和洗脱液 (洗脱液的 1/10 体积)。将洗脱液直接透析到 pH 7.4 的 PBS, 最后通过 MILLEX-MP 0.22 μm (购自 MILLIPORE) 过滤。

2.2. EK 酶切

将实施例 2.1 中初步纯化得到的含有 EK 酶识别序列 (VDDDDK) 的 KLK1 融合蛋白使用带 His 标签的 EK 酶进行酶切, 其中 KLK1 融合蛋白: EK 酶= 50: 1 (mg : mg), 20~25°C 孵育过夜。经 EK 酶切后得到的人 KLK1 蛋白或者 KLK1 融合蛋白的氨基酸序列分别如 SEQ ID NO: 56 (也称为“融合蛋白 1”)、SEQ ID NO: 57 (也称为“融合蛋白 2.1”)、SEQ ID NO: 58 (也称为“融合蛋白 2.2”或“融合蛋白 4.3”)、SEQ ID NO: 59 (也称为“融合蛋白 2.3”)、SEQ ID NO: 60 (也称为“融合蛋白 2.4”)、SEQ ID NO: 61 (也称为“融合蛋白 3.1”)、SEQ ID NO: 62 (也称为“融合蛋白 3.2”)、SEQ ID NO: 63 (也称为“融合蛋白 3.3”)、SEQ ID NO: 64 (也称为“融合蛋白 3.4”)、SEQ ID NO: 65 (也称为“融合蛋白 3.5”)、SEQ ID NO: 2 (也称为“蛋白 4.2”) 所示。

2.3. 酶切后的再次纯化

经实施例 2.2 酶切后得到的人 KLK1 蛋白或者 KLK1 融合蛋白再次用镍柱进行纯化, 将酶切后的混合产物再一次完成过镍柱操作, 收集终产物, 测定浓度, 并于 MILLEX-MP 0.22 μm 滤膜过滤后于 -80°C 储存。

实施例 3: KLK1 融合蛋白表征

3.1. 二硫键分析方法

取实施例 2.3 中制备得到的蛋白分别制备还原及非还原条件样品。对于还原条件样品，取适量样品置于离心管中，加入变性缓冲液，混匀。后加入 DTT 溶液，混匀并孵育，将样品还原。还原后的样品加入碘乙酰胺，混匀并孵育，将样品烷基化。对于非还原条件样品，取适量样品置于离心管中，加入缓冲溶液稀释样品至所需的浓度。标记。

分别将制备的还原及非还原样品转移至超滤管中，加入缓冲溶液，离心超滤。重复加入缓冲溶液离心超滤至目标浓度，混匀。向除盐后的样品中加入 PNGase F 酶，孵育酶解脱糖。向脱糖后的样品中加入适量胰蛋白酶/糜蛋白酶/Glu-C，孵育酶切。将反应完成后的样品转移至进样瓶，通过 UPLC 对酶解的片段进行分离，后通过质谱分析对于蛋白质中二硫键的半胱氨酸-SH 残基的位置和结构进行确认。

3.2. 分子量分析方法

3.2.1. 去糖还原分子量分析

(a) 去糖还原蛋白样品的制备

在离心管上标记样品名称，用超滤管对样品进行浓缩，向离心管中加入 50 μg 蛋白样品溶液，加入适量 5xQuick 反应缓冲（还原），混匀，75°C 的温度下孵育，冷却至室温，再加入适量 Quick PNGase F 酶，75°C 的温度下孵育，样品缓冲液替换成 100mM 碳酸氢铵溶液，13000 rpm 离心 10 分钟，移取上清液于样品瓶中，进样 2μL 分析。

将反应完成后的样品转移至进样瓶，通过 HPLC 对制备完成的样品进行分离，后通过质谱确定样品去糖分子量。

(b) 仪器参数

HPLC（购自 Agilent，型号 1290 Infinity II）参数如下：

- 色谱柱：Waters, BioResolve, RP mAb, Polyphenyl, 450A, 2.1 x 50 mm, 2.7 μm

- 柱温：75°C
- 自动进样器温度：8°C
- 流动相：流动相 A（去离子水，含 0.1% 甲酸）；流动相 B（乙腈，含 0.1% 甲酸）。

5 质谱（购自 Agilent，型号 6545XT）参数如下：

Scan range: 50-3200 m/z

Ion polarity: positive

ESI GAS Temp: 325°C

Fragmentor Voltage: 225V

10 (c) 检测结果

以融合蛋白 2.4 为例（实施例 2.3 中制备得到的其他蛋白表征结果未显示），融合蛋白 2.4 的总离子流（TIC）图谱、质谱（MS）图谱和去卷积图谱如图 4 所示。检测结果表明，融合蛋白 2.4 的去糖还原分子量为 51801 Da，与目的蛋白的分子量一致。

15 3.2.2. 去糖完整分子量分析

(a) 去糖完整蛋白样品的制备

在离心管上标记样品名称，向离心管中加入 50 µg 蛋白样品溶液，加入适量 5xQuick 反应缓冲液（非还原），混匀，75°C 的温度下孵育，冷却至室温，再加入适量 Quick PNGase F 酶，50°C 的温度下孵育，样品缓冲液替换成 100 mM 碳酸氢铵溶液，13000 rpm 离心 10 分钟，移取上清液于样品瓶中，进样 2 µl 分析。

20 铵溶液，13000 rpm 离心 10 分钟，移取上清液于样品瓶中，进样 2 µl 分析。

(b) 仪器参数

HPLC（购自 Agilent，型号 1290 Infinity II）参数如下：

- 色谱柱：Waters, BioResolve, RP mAb, Polyphenyl, 450A, 2.1 x 50 mm, 2.7 µm

25 ● 柱温：75°C

- 自动进样器温度：8℃
- 流动相：流动相 A（去离子水，含 0.1% 甲酸）；流动相 B（乙腈，含 0.1% 甲酸）。

质谱（购自 Agilent，型号 6545XT）参数如下：

- 5 Scan range: 500-5000 m/z
- Ion polarity: positive
- ESI GAS Temp: 325℃
- Fragmentor Voltage: 380V

(c) 检测结果

- 10 以融合蛋白 2.4 为例（实施例 2.3 中制备得到的其他蛋白表征结果未显示），融合蛋白 2.4 的总离子流（TIC）图谱、质谱（MS）图谱和去卷积图谱如图 5 所示。检测结果表明，融合蛋白 2.4 的去糖完整分子量为 103568 Da。

3.3. 序列覆盖度分析方法

3.3.1. 样品变性、还原、烷基化

- 15 用以下公式计算所需样品体积：

所需样品体积 (μL) = 300 (μg) / 样品蛋白度(μg/μL)。

- 移取 300 μg 待测样品溶液于超滤管中，12000 rpm 离心 10 分钟，添加变性溶液至该超滤管 100 μL 刻度处，混匀后转移至 1.5 mL 离心管中，加入 200 μL 变性溶液，溶液终体积为 300 μL，混匀。再加入 5 μL 1M DTT 溶液，混匀。将混合液在 37℃ 的温度下育 60 分钟。再加入 10 μL 1M 碘乙酰胺溶液，混匀。将混合液在 10-30℃ 的温度下避光育 15 分钟（平行制备 3 份：第 1 组、第 2 组、第 3 组）。
- 20

3.3.2. 样品除盐

- 第 1 组、第 2 组：分别在超滤管上标记样品名称，向每个超滤管中加入 300 μL 100mM 碳酸氢铵溶液，12000rpm 离心 5 分钟。分别转移样品至超滤管中，
- 25

12000 rpm 离心 10 分钟，用 300 μ L 100mM 碳酸氢铵溶液清洗样品两次，每次 12000 rpm 离心 10 分钟。再向每个超滤管中加入 300 μ L 100mM 碳酸氢铵溶液，12000 rpm 离心 15 分钟。添加 100mM 碳酸氢铵溶液至该超滤管 100 μ L 刻度处，混匀后将样品溶液转移至离心管中，加入 100 μ L 100mM 碳酸氢铵溶（样品终浓
5 度约为 1.5mg/mL），混匀。

第 3 组：把上述第 1 组、第 2 组操作步骤中的 100mM 碳酸氢铵溶液换成 100mM 磷酸盐缓冲液，其余实验操作均相同。

3.3.3 酸解/去糖

酶解：移取 15 μ L 胰蛋白酶溶液加至第 1 组样品中、15 μ L 糜蛋白酶加至第
10 2 组样品中、15 μ L Glu-C 蛋白酶加至第 3 组样品中，分别在 37°C 的温度下孵育 120 分钟。

去糖、去唾液酸：移取 2 μ L Quick PNGaseF 酶溶液和 2 μ L α 2-3,6,8,9 Neuraminidase A 分别加至第 1 组、第 2 组和第 3 组样品中，在 37°C 的温度下孵育 60 分钟，取 5 μ L 10%甲酸溶液到各离心管中，混匀，样品即准备好。

15 将准备完成后的样品转移至进样瓶，通过 MS 和 MS/MS 对于不同酶切样品的肽段氨基酸序列进行分析，并与样品理论序列进行匹配，确定待测样品的序列覆盖度。

实施例 4：KLK 酶活性测定

4.1. 方法

20 用 BCA 蛋白检测试剂盒（Bradford 法）或 Pierce™ 660nm 蛋白检测试剂（Biuret 法）测定实施例 2.3 纯化后样品中的蛋白含量。

首先，配制如下试剂：

- 孵育缓冲液：200 mM Tris-HCl, pH8.0
- 样品稀释缓冲液：20 mM Tris-HCl, pH 8.0
- 25 ● 试剂：分别制备 100 mM 4-nitroaniline 和 H-D-Val-Leu-Arg-pNA 的 DMSO 储液。

- 样品：将实施例 2.3 纯化后的人 KLK1 蛋白或者 KLK1 融合蛋白样品储存在-80℃，并在室温下解冻，未稀释的储备液用于蛋白浓度测定，以 2 倍、5 倍、10 倍的不同倍数稀释液用于 KLK1 的酶活性测定。
- 阳性对照样品（凯力康®）：将小瓶中粉末用 100 μl 品稀释缓冲液溶解。取 50 μl 样品溶液用于蛋白浓度测定，剩余的样品溶液稀释 2、5、10 倍用于 KLK1 的酶活性测定。

然后，按照如下步骤测定各个样品的酶活性：

- 1) 确定 PNA 标准曲线的适当范围。0、0.0625、0.125、0.25、0.5mM 和 1 mM 的 PNA 在无样品或底物的培养缓冲液中，在分光光度计上于 405nm 处读数；
- 2) 将稀释后的样品和孵化缓冲液添加到检测板中，孵育 5 分钟，在分光光度计上以 405nm 波长读取平板的背景值；
- 3) 加入 20ml 的 H-D-Val-Leu-Arg-pNA 使反应开始，在 37℃的分光光度计上，在 405nm 处读取平板的动力学值 15 分钟；
- 4) 进行 0-100 nmol 的 PNA（p-nitroaniline）浓度的标准曲线，根据 PNA 标准曲线计算出样品释放的 PNA 的确切数量，从而计算样品中 KLK1 的酶活性。测试样品中的 KLK1 酶活性被描述为：每毫克 KLK1 融合蛋白于每分钟切割底物而产生的 PNA 量，以微摩尔计（μmole/min/mg）（PNAU/mg），数值越高，说明酶活性越好。

4.2. 结果

如表 2 和图 2 所示，在制备过程中带有 EK 酶识别序列并且经 EK 酶切之后得到的 KLK1 融合蛋白均具有 KLK1 酶催化活性，而在制备过程中不带有 EK 酶识别序列，或者虽然带有 EK 酶识别序列但未经 EK 酶切的 KLK1 融合蛋白均不具有 KLK1 酶催化活性。

表 2. 各种 KLK1 融合蛋白的酶催化活性对比

样品名称	描述	KLK1 酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	结论
凯力康 [®]	阳性对照	4.428-5.636	有酶催化活性
融合蛋白 1	融合蛋白 1 中间体经 EK 酶切后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 56）	0.4565-0.5608	有酶催化活性
融合蛋白 3.6	不带有 EK 酶识别序列的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 93）	NA	无酶催化活性
融合蛋白 3.2 中间体	带有 EK 酶识别序列但未经 EK 酶切的 KLK1 融合蛋白（即，SEQ ID N: 42）	NA	无酶催化活性

如表 3 和图 3 所示，在制备过程中带有 EK 酶识别序列并且经 EK 酶切之后得到的不同序列的人 KLK1 蛋白或者 KLK1 融合蛋白均具有 KLK1 酶催化活性。

5 表 3. 各种 KLK1 融合蛋白的酶催化活性对比

样品名称	描述	KLK1 酶活性 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)	结论
凯力康 [®]	阳性对照	3.893-6.791	有酶催化活性
融合蛋白 2.1	融合蛋白 2.1 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 57）	1.685-2.121	有酶催化活性
融合蛋白 2.2	融合蛋白 2.2 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 58）	0.9151-1.105	有酶催化活性

融合蛋白 2.3	融合蛋白 2.3 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 59）	0.964-1.283	有酶催化活性
融合蛋白 2.4	融合蛋白 2.4 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 60）	1.044-1.631	有酶催化活性
融合蛋白 3.1	融合蛋白 3.1 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 61）	0.9874-2.105	有酶催化活性
融合蛋白 3.2	融合蛋白 3.2 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 62）	0.7128-1.490	有酶催化活性
融合蛋白 3.3	融合蛋白 3.3 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 63）	1.222-2.067	有酶催化活性
融合蛋白 3.4	融合蛋白 3.4 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 64）	0.5391-1.655	有酶催化活性
融合蛋白 3.5	融合蛋白 3.5 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白（即，SEQ ID NO: 65）	0.3338-0.8944	有酶催化活性
蛋白 4.1	人野生型 KLK1 蛋白去掉信号肽之后形成的 prepro-hKLK1（即，SEQ ID NO: 94）	3.744-6.243	有酶催化活性

蛋白 4.2	蛋白 4.2 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 (即, SEQ ID NO: 2)	5.105-8.499	有酶催化活性
融合蛋白 4.3	融合蛋白 4.3 中间体经 EK 酶切之后形成的 hKLK1 融合蛋白 (即, SEQ ID NO: 58)	4.879-5.867	有酶催化活性

实施例 5: CD-1 小鼠静脉注射融合蛋白 2.1 和凯力康®后血清中融合蛋白 2.1 和凯力康®蛋白浓度的药代动力学研究

对 CD-1 小鼠静脉注射给予供试品融合蛋白 2.1 和凯力康®后, 采集各时间点
5 的小鼠血清。利用商业试剂盒检测 CD-1 小鼠血清中融合蛋白 2.1 和凯力康®蛋白浓度, 并进行药代动力学分析。平均体重为 25~30g 的 24 只雌性 CD-1 小鼠被分成 2 组, 按表 4 的给药方案给药。每只小鼠均用尾标号标记, 并在实验用笼盒上进行标记。各组动物均不禁食, 实验过程中可自由饮水。

表 4. 给药方案

组别	供试品	给药途径	动物号	剂量 (mg/kg)	体积 (mL/kg)	浓度 (mg/mL)
1	融合蛋白 2.1	I.V.	M01~M12	1	5	0.2
2	凯力康®	I.V.	M13~M24	0.25	5	0.05

10

表 5. 用于 PK 测样的血清样品采集方案

组别	供试品	动物号	交叉取血点
1	融合蛋白 2.1	M01~M03	给药前采血
		M04~M06	T0 (2.5 min)、1、24 h
		M07~M09	T0 (2.5 min)、2、48 h
		M10~M12	T0 (2.5 min)、6、120 h
2	凯力康®	M13~M15	给药前采血

		M16~M18	T0 (2.5 min)、1 h
		M19~M21	T0 (2.5 min)、4 h
		M22~M24	T0 (2.5 min)、24 h

用于 PK 测样的血清样品采集以及预处理方式如下：按照表 5 中的各时间点由尖端采集全血，第 1 组每个时间点采集约 85 μL，第 2 组每个时间点采集约 130 μL，给药前采血点采集 260 μL 全血，置于无抗凝剂的采血离心管中，冰上静置 30 min 后，离心处理（3,000 g，2~8℃，离心 10 分钟）后取上清。血清保存至离心管中，于干冰中速冻，随后储存在-60℃ 或更低的超低温冰箱中。

所有动物给药后耐受良好。动物给药期间及给药后临床观察均未见异常。对 CD-1 小鼠静脉注射给予 1 mg/kg 的融合蛋白 2.1 或者 0.25 mg/kg 的凯力康®后，利用商业试剂盒法检测小鼠体内血清中融合蛋白 2.1 和凯力康®的蛋白浓度，并计算融合蛋白 2.1 和凯力康®的平均 PK 参数。

采用非房室模型，使用 Phoenix® WinNonlin®（Version 8.2，Pharsight，Mountain View，NCA）对血药浓度-时间数据进行分析。PK 参数包括达峰浓度（C_{max}）、达峰时间（T_{max}），消除半衰期（T_{1/2}），血清浓度-时间曲线下面积（AUC），清除率（CL），平均滞留时间（MRT）等。PK 参数的计算公式和结果如表 6 所示。

表 6. PK 参数的计算与结果

参数	计算公式	融合蛋白 2.1	凯力康®
Rsq		1.00	0.852
λ _z (1/h)	由消除相浓度点取半对数线性回归而得	0.0172	0.941
T _{1/2} (h)	t _{1/2} =Ln(2)/ λ _z	40.2	0.737
C ₀ (ng/mL)	实测值	7060	2120
C _{max} (ng/mL)	实测值	6760	1900
T _{max} (h)	实测值	0.0417	0.0417
AUC _{0-t} (h*ng/mL)	采用梯形法计算：	63500	1350

	$AUC(i,i+1)=(t_{i+1}-t_i) \times (C_i+C_{i+1})/2,$ AUC 为所有 AUC(i,i+1)之和		
$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/mL)	$AUC_{0-\infty}=AUC_{0-t} + C_t/\lambda_z$ (C_t 为最后一个可测得血药浓度时间点)	69700	1380
%AUC _{ex} (%)	$AUC_{extrap}(\%)=((AUC_{0-\infty}-AUC_{0-t})/AUC_{0-\infty})\times 100$	8.98	2.22
CL (mL/min/kg)	$CL/F = Dose / AUC_{0-\infty}$	0.239	3.01
V_z (L/kg)	$V_z/F=Dose/(AUC_{0-\infty}\times\lambda_z)$	0.832	0.192
V_{ss} (L/kg)		0.584	0.0893
MRT_{last} (h)	$MRT_{last} = AUMC_{last}/ AUC_{0-t}$	27.2	0.391
MRT_{inf} (h)	$MRT_{inf} = AUMC_{inf}/ AUC_{0-\infty}$	40.7	0.495

单次静脉注射给予 1 mg/kg 的融合蛋白 2.1 后，CD-1 小鼠体内融合蛋白 2.1 的清除率（CL）为 0.239 mL/min/kg，表观分布容积（V_z）为 0.832 L/kg，半衰期（t_{1/2}）为 40.2 h，平均滞留时间（MRT）为 27.2 h，从零时间点到最后一个已知浓度采血点的血浆浓度时间曲线下面积（AUC_{0-t}）为 63500 h*ng/mL。最后一个可测浓度采血点为 120 h，平均浓度为 108 ng/mL。

单次静脉注射给予 0.25 mg/kg 的凯力康®后，CD-1 小鼠体内凯力康®的清除率（CL）为 3.01 mL/min/kg，表观分布容积（V_z）为 0.192 L/kg，半衰期（t_{1/2}）为 0.737 h，平均滞留时间（MRT）为 0.391 h，从零时间点到最后一个已知浓度采血点的血浆浓度时间曲线下面积（AUC_{0-t}）为 1350 h*ng/mL。最后一个可测浓度的采血点为 4 h，平均浓度为 28.9 ng/mL。

对 CD-1 小鼠单次静脉注射分别给予 1 mg/kg 的融合蛋白 2.1 和 0.25 mg/kg 的凯力康®后，动物体内的血药浓度时间曲线如图 6 所示。本实验中融合蛋白 2.1 小鼠仅给药一次，并在给药后第 3 天（Day 3）时仍能检测到融合蛋白 2.1 血药浓度。凯力康®亦给药一次，但 24h 后已无法检测其血药浓度。而且，融合蛋白 2.1 的半衰期相对于凯力康®增加了 54 倍。

实施例 6：hKLK1 融合蛋白对大鼠短暂性脑缺血再灌注（tMCAO）模型的药效

研究

6.1. 实验药物

本实施例中使用的实验药物信息如下：

- 5
- 依达拉奉注射液：阳性对照品，购自南京先声东元制药有限公司（生产批号：80-190516）
 - 实施例 2 中制备得到的融合蛋白 2.1

实验过程中使用的试剂信息如表 7 所示：

表 7. 试剂信息

试剂	供应商	生产批号
0.9%氯化钠注射液	华裕（无锡）制药有限公司	20011402
舒泰 50	法国维克	82T7A
赛拉嗪注射液	京华牧场动物保健品有限公司	20201118
硫酸庆大霉素注射液	华中药业股份有限公司	20180622
美洛西康注射液	齐鲁动物保健品有限公司	907101001
TTC（2,3,5-三苯基氯四氮唑）	西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司	BCBZ6388

6.2. tMCAO 动物模型构建

10

将 50 只 SPF 级健康 6-7 周龄雄性 SD 大鼠（200g~250g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司）纳入实验以进行受试样品对大鼠短暂性脑缺血再灌注（tMCAO）模型的药效研究。

15

实验当天，各组的大鼠用舒泰 50（50 mg/kg，*i.m.*）+赛拉嗪（8 mg/kg，*i.p.*）复合麻醉后，将大鼠仰卧位固定，颈部正中切开皮肤，钝性分离各层组织，暴露左侧颈总动脉，分离出颈外动脉和颈内动脉。于颈总动脉近心端打活结。颈外动脉穿双线，远心端的线打死结，近心端打一个松结固定线栓用。动脉夹夹闭颈内动脉，在颈外动脉双线之间剪一个小口，从小口向颈内动脉方向插入线栓，固定线轻轻扎住线栓，松开动脉夹，继续向颈内方向轻轻推入线栓直到线栓标记处（约

- 18mm±0.5mm)，颈外动脉处扎紧固定线固定线栓，缝合大鼠颈部，缺血 1.5 小时后将线栓拔出至颈外动脉处，恢复颈总到颈内动脉的供血。大鼠脑缺血区域脑血流下降 70% (rCBF≥70%)，判定为造模成功，术后保持大鼠体温在 37℃直到大鼠清醒。分别于术前、缺血后使用激光多普勒仪记录脑血流量验证模型，共 2 次。
- 5 术中给予美洛昔康镇痛，术后给予庆大霉素预防感染。
- 实验药物的药效通过以下终点检测指标进行评估：
- 缺血区域脑血流检测：基础值和 MCAO 造模后分别检测 1 次，共 2 次；
 - 行为学检测：分别在大鼠缺血 24h、48h、72h 后用 Longa 评分法进行检测，共 3 次；
 - 脑梗死面积：脑缺血后 72h 通过 TTC 染色确定。
- 10

6.3. 实验方法

根据表 8 对实验大鼠进行分组和给药。实验终点采集血液，制备血清用于后续血清标记物检测。实验结束后，采用二氧化碳吸入的方法对所有组的大鼠实施安乐死。

15 表 8. 大鼠的分组及给药方案

组号	组别	动物数	剂量	给药体积 (ml/kg)	给药方式	给药频率
1	假手术组	10	-	5	I.V.	再灌注后给药 1 次。
2	模型组	10	-	5	I.V.	
3	阳性对照组 (依达拉奉)	10	6 mg/kg	5	I.V.	
4	低剂量融合蛋白 2.1	10	25 µg/kg	5	I.V.	
5	高剂量融合蛋白 2.1	10	150 µg/kg	5	I.V.	

各组动物的行为学评分结果如图 7 所示。如图 7 所示，低剂量（25 µg/kg）和高剂量（150 µg/kg）的融合蛋白 2.1 对大鼠在缺血-再灌注后 72 小时的行为学上均有改善，其中高剂量组（150 µg/kg）可实现显著改善。

各组动物的脑梗死面积的 TTC 染色结果如图 8 所示，各组动物的缺血-再灌注后的脑组织图如图 9 所示。如图 8 和图 9 所示，与模型组相比，低剂量（25 $\mu\text{g/kg}$ ）和高剂量（150 $\mu\text{g/kg}$ ）的融合蛋白 2.1 在大鼠缺血-再灌注后的脑组织中均表现出剂量依赖性的保护趋势。

- 5 虽然本申请通过引用特定实施例的方式对发明进行特定的展现和描述，但是本领域技术人员都应该理解，在不脱离本发明披露的主旨和保护范围的情况下，上述内容还可以进行各种形式和细节上的变化。

权 利 要 求 书

1. 一种制备包含组织激肽释放酶 1 (KLK1) 的融合蛋白的方法, 所述方法包括步骤(1): 将含有编码融合蛋白的核酸分子的重组载体置于适合的蛋白表达系统中进行表达, 其中, 所述融合蛋白包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽, 所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接, 并且,
 - a) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列;
 - b) 所述第一多肽包含 KLK1 蛋白或其变体; 并且
 - c) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。
2. 根据权利要求 1 所述的方法, 其进一步包括步骤(2): 将步骤(1)中得到的所述融合蛋白与所述蛋白酶混合进行特异性酶切反应, 去除所述掩蔽肽。
3. 根据权利要求 2 所述的方法, 其中在所述步骤(2)进行特异性酶切反应之前纯化步骤(1)中得到的所述融合蛋白。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述掩蔽肽选自下组: 肠激酶 (EK) 识别序列、凝血酶识别序列、凝血因子 Xa 识别序列、烟草蚀纹病毒 (TEV) 蛋白酶识别序列、SUMO 蛋白酶识别序列和转肽酶 (Sortase) 识别序列。
5. 根据权利要求 4 所述的方法, 其中所述掩蔽肽为肠激酶 (EK) 识别序列。
6. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述肠激酶 (EK) 识别序列由如 SEQ ID NO: 4 (DDDDK) 或者 SEQ ID NO: 5 (VDDDDK) 所示的氨基酸序列组成。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一多肽为人 KLK1 蛋白或者其变体。
8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%、至少 95%或至少 98%序列同一性, 但仍然保留 KLK1 的功能或活性。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第二多肽为 Fc 结构域或白蛋白。
11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域来源于人 IgG Fc 结构域。
12. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域来源于人 IgG1 Fc 结构域。
13. 根据权利要求 11 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域来源于人 IgG4 Fc 结构域。
14. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含与如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性的氨基酸序列。
15. 根据权利要求 14 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列; 或者所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 11 所示的氨基酸序列组成。
16. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含与如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%或至少 95%的序列同一性的氨基酸序列。
17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列; 或者所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 12 所示的氨基酸序列组成。
18. 根据权利要求 10 至 17 中任一项所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含一个、两个、三个、四个、五个或更多个氨基酸位点的突变。
19. 根据权利要求 18 所述的方法, 其中所述突变为 M252Y、S254T 和 T256E。

20. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列, 或者所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列组成。
21. 根据权利要求 19 所述的方法, 其中所述 Fc 结构域包含如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列, 或者所述 Fc 结构域由如 SEQ ID NO: 14 所示的氨基酸序列组成。
22. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中所述白蛋白包含人血清白蛋白的一个或多个结构域。
23. 根据权利要求 22 所述的方法, 其中所述白蛋白包含人血清白蛋白的 D3 结构域。
24. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第二多肽位于所述第一多肽的 N 末端或者 C 末端。
25. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述融合蛋白从 N 末端到 C 末端依次为所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽。
26. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述掩蔽肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 5 所示, 所述第一多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 115、SEQ ID NO: 117、SEQ ID NO: 118、SEQ ID NO: 119、SEQ ID NO: 120、SEQ ID NO: 121 或 SEQ ID NO: 122 所示, 并且所述第二多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 或 SEQ ID NO: 15 所示。
27. 根据权利要求 2 至 26 中任一项所述的方法, 其中经步骤(2)去除所述掩蔽肽之后得到的融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 56、SEQ ID NO: 57、SEQ ID NO: 58、SEQ ID NO: 59、SEQ ID NO: 60、SEQ ID NO: 61、SEQ ID NO: 62、SEQ ID NO: 63、SEQ ID NO: 64、SEQ ID NO: 65、SEQ ID NO: 114 或 SEQ ID NO: 128 所示。
28. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述融合蛋白进一步包含标签。

29. 根据权利要求 28 所述的方法，其中所述标签选自下组：荧光标签、发光标签、纯化标签和生色标签。
30. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述标签为纯化标签。
31. 根据权利要求 29 所述的方法，其中所述标签选自下组：HIS 标签、GST 标签、MBP 标签、Myc 标签、NusA 标签、SUMO 标签、FLAG 标签、Avi 标签、Halo 标签、SNAP 标签、Strep-II 标签和 TrX 标签。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中所述标签是 HIS 标签。
33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中所述标签是包含 5 个、6 个、7 个、8 个、9 个或 10 个组氨酸的 HIS 标签。
34. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中，LB 表示不存在或标签，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键或第一连接子，P1 表示所述第一多肽，L2 表示键或第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述第一连接子和所述第二连接子独立地选自下组：可切割连接子、不可切割连接子、柔性连接子、刚性连接子、螺旋连接子和非螺旋连接子。
36. 根据权利要求 35 所述的方法，其中所述刚性连接子含有包括如 SEQ ID NO: 23 (EAAAK) 所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。
37. 根据权利要求 35 所述的方法，所述柔性连接子包括含有甘氨酸和丝氨酸的连接子。
38. 根据权利要求 37 所述的方法，其中所述含有甘氨酸和丝氨酸的连接子包括如 SEQ ID NO: 17、SEQ ID NO: 18、SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21 或 SEQ ID NO: 22 所示的一个、两个、三个、四个或更多个重复。

39. 根据权利要求 34 至 38 中任一项所述的方法，其中所述第一连接子或所述第二连接子包括如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列，或者由如 SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO: 21、SEQ ID NO: 22 或 SEQ ID NO: 23 所示的氨基酸序列组成。
40. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36~55、SEQ ID NO: 100~109、SEQ ID NO: 111~113、SEQ ID NO: 125~127 中的任一个序列所示。
41. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述融合蛋白进一步包括信号肽。
42. 根据权利要求 41 所述的方法，其中所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 24 或 SEQ ID NO: 25 所示，或与如 SEQ ID NO: 24 或 SEQ ID NO: 25 所示的氨基酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的序列同一性。
43. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中经特异性酶切反应去除所述掩蔽肽之后得到的融合蛋白在受试者体内的血循环中的半衰期为至少 1 天、至少 2 天、至少 3 天、至少 4 天、至少 5 天、至少 6 天、至少 7 天、至少 8 天、至少 9 天、至少 10 天、至少 11 天、至少 12 天、至少 13 天、至少 14 天。
44. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述编码所述融合蛋白的核酸分子包含：
- (a) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列；
 - (b) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列；
 - (c) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列；

- (d) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 77 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列；
 - (e) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列；
 - (f) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列；
 - (g) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列；
 - (h) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 123 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列；
 - (i) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 78 所示的核苷酸序列；
 - (j) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 79 所示的核苷酸序列；
 - (k) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 80 所示的核苷酸序列；或者
 - (l) 如 SEQ ID NO: 76 所示的核苷酸序列、如 SEQ ID NO: 130 所示的核苷酸序列和如 SEQ ID NO: 81 所示的核苷酸序列。
45. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述编码所述融合蛋白的核酸分子包含与如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列具有至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90% 或至少 95% 的序列同一性的核苷酸序列。
46. 根据权利要求 44 或 45 所述的方法，其中所述编码所述融合蛋白的核酸分子包含如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO:

69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列；或者所述编码所述融合蛋白的核酸分子由如 SEQ ID NO: 66、SEQ ID NO: 67、SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 69、SEQ ID NO: 70、SEQ ID NO: 71、SEQ ID NO: 72、SEQ ID NO: 73、SEQ ID NO: 74、SEQ ID NO: 75、SEQ ID NO: 116 或 SEQ ID NO: 129 所示的核苷酸序列组成。

47. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述重组载体选自下组：质粒、人工染色体和病毒载体。
48. 根据权利要求 47 所述的方法，其中所述重组载体为 pcDNA 质粒（例如，pcDNA3.4 质粒）。
49. 根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述蛋白表达系统为细胞表达系统，所述细胞表达系统选自下组：细菌、真菌、植物细胞或动物细胞。
50. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述细菌选自下组：芽孢杆菌属（*Bacilli*）、梭菌属（*Clostridia*）、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）、贪铜菌属（*Cupriavidus*）、代尔夫特菌属（*Delftia*）、埃希氏菌属（*Escherichia*）、肠杆菌属（*Enterobacter*）、欧文氏菌属（*Erwinia*）、克雷伯氏菌属（*Klebsiella*）、乳杆菌属（*Lactobacillus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）、变形杆菌属（*Proteus*）、假单胞菌属（*Pseudomonas*）、红球菌属（*Rhodococcus*）、沙门氏菌属（*Salmonella*）、沙雷氏菌属（*Serratia*）、志贺氏菌属（*Shigella*）和链霉菌属（*Streptomyces*）。
51. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述细菌选自下组：大肠杆菌（*Escherichia coli*）、鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）、粘质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）、枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、地衣芽孢杆菌（*B. licheniformis*）和铜绿假单胞菌（*P. aeruginosa*）。
52. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述真菌选自下组：假丝酵母（*Candida*）、酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、克鲁维酵母（*Kluyveromyces*）、巴斯德毕赤酵母（*Pichia pastoris*）和粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）。
53. 根据权利要求 49 所述的方法，其中所述动物细胞是哺乳动物细胞。

54. 根据权利要求 53 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞是人细胞或中国仓鼠卵巢（CHO）细胞。
55. 根据权利要求 53 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞是人胚胎肾细胞 293（HEK293 细胞）。
56. 根据权利要求 53 所述的方法，其中所述哺乳动物细胞是 CHO 细胞（例如，CHO-K1 细胞、CHO-S 细胞）。
57. 根据前述权利要求所述的方法制备得到的融合蛋白，其裂解激肽原释放激肽的活性为 0.3~3 PNAU/mg。
58. 一种融合蛋白，其包含掩蔽肽、第一多肽和第二多肽，其中，所述掩蔽肽、所述第一多肽和所述第二多肽之间直接连接或通过连接子共价连接，并且，
- a) 所述掩蔽肽具有能够被蛋白酶特异性识别和切割的氨基酸序列；
 - b) 所述第一多肽包含 KLK1 或其变体；并且
 - c) 所述第二多肽用于延长所述第一多肽的半衰期。
59. 根据权利要求 58 所述的融合蛋白，其中所述掩蔽肽选自下组：肠激酶（EK）识别序列、凝血酶识别序列、凝血因子 Xa 识别序列、烟草蚀纹病毒（TEV）蛋白酶识别序列、SUMO 蛋白酶识别序列和转肽酶（Sortase）识别序列。
60. 根据权利要求 59 所述的融合蛋白，其中所述肠激酶（EK）识别序列为 SEQ ID NO: 5（VDDDDK）。
61. 根据权利要求 57 至 60 中任一项所述的融合蛋白，其中所述第一多肽为人 KLK1 蛋白或者其变体。
62. 根据权利要求 61 所述的融合蛋白，其中所述第一多肽的氨基酸序列与如 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列具有至少 90%、至少 95%或至少 98%序列同一性，但仍然保留 KLK1 的功能或活性。
63. 根据权利要求 57 至 62 中任一项所述的融合蛋白，其中所述第二多肽为 Fc 结构域或白蛋白。

64. 根据权利要求 57 至 63 中任一项所述的融合蛋白，其进一步包含标签。
65. 根据权利要求 64 所述的融合蛋白，其中所述标签是 HIS 标签。
66. 根据权利要求 57 至 65 中任一项所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白从 N 末端到 C 末端包含如下结构：

LB-MP-L1-P1-L2-P2,

其中，LB 表示不存在或标签，MP 表示所述掩蔽肽，L1 表示键或第一连接子，P1 表示所述第一多肽，L2 表示键或第二连接子，P2 表示所述第二多肽。

67. 根据权利要求 66 所述的融合蛋白，其中所述融合蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 36~55、SEQ ID NO: 100~109、SEQ ID NO: 111~113、SEQ ID NO: 125~127 中的任一个序列所示。
68. 一种核酸分子，其包含编码如权利要求 57 至 67 中任一项所述融合蛋白的核苷酸序列。
69. 一种载体，其包含根据权利要求 68 所述的核酸分子。
70. 一种蛋白表达系统，其包含根据权利要求 68 所述的核酸分子或根据权利要求 69 所述的载体。
71. 一种药物组合物，其包含根据权利要求 57 至 67 中任一项所述融合蛋白、包含根据权利要求 68 所述的核酸分子、包含根据权利要求 69 所述的载体或包含根据权利要求 70 所述的蛋白表达系统，以及药学上可接受的载体。
72. 一种蛋白表达系统的构建方法，包括：将编码根据权利要求 57 至 67 中任一项所述的融合蛋白的核酸分子引入载体中以构建表达载体；将所述表达载体导入蛋白表达系统中。
73. 一种治疗或预防疾病的方法，其包括向需要治疗或预防的受试者施用根据权利要求 1 至 56 中任一项所述的方法制备得到的分离的融合蛋白，其中，所述疾病选自下组：缺血性疾病、出血性疾病、肾病、代谢性疾病和神经退行性疾病。

74. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述缺血性疾病选自下组：脑缺血（缺血性中风）、心肌缺血、缺血性结肠炎、肢体缺血、皮肤缺血、缺血型脑中风（例如，急性缺血型脑中风）、短暂性脑缺血发作（TIA）和创伤性脑损伤（TBI）。
75. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述缺血性疾病为急性缺血型脑中风。
76. 根据权利要求 73 所述的方法，其中所述肾病为慢性肾病或急性肾损伤。