I862879

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本 **(11)證書號數：TW I862879 B**

(45)公告日： 中華民國 113 (2024) 年 11 月 21 日

(21)申請案號：110139563 (22)申請日： 中華民國 104 (2015) 年 12 月 10 日

(51)Int. Cl.： ***C07K14/505 (2006.01)*** ***C07K14/555 (2006.01)***
C07K14/575 (2006.01) ***C07K14/59 (2006.01)***
C07K14/61 (2006.01) ***C12N15/85 (2006.01)***
C12N9/64 (2006.01)

(30)優先權：2014/12/10 美國 62/090,104
2014/12/10 美國 62/090,116
2014/12/10 美國 62/090,124

(71)申請人：以色列商歐科生物製品有限公司 (以色列) OPKO BIOLOGICS LTD. (IL)
以色列

(72)發明人：海斯科維茲 歐文 HERSHKOVITZ, OREN (IL)；莫斯科維奇 羅拉 MOSCHCOVICH, LAURA (IL)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

US 2013/0295072A1 WO 2013/009627A2

WO 2013/121416A1

期刊 ZHONG, Xiaotian, et al. Biological insights into therapeutic protein modifications throughout trafficking and their biopharmaceutical applications. International journal of cell biology, 2013 2013 1-19.

期刊 Fares F, Havron A, Fima E. Designing a Long Acting Erythropoietin by Fusing Three Carboxyl-Terminal Peptides of Human Chorionic Gonadotropin β Subunit to the N-Terminal and C-Terminal Coding Sequence. Int J Cell Biol. 2011; 2011:275063. Epub 2011 Aug 21.

審查人員：林佳慧

申請專利範圍項數：18 項 圖式數：16 共 416 頁

(54)名稱

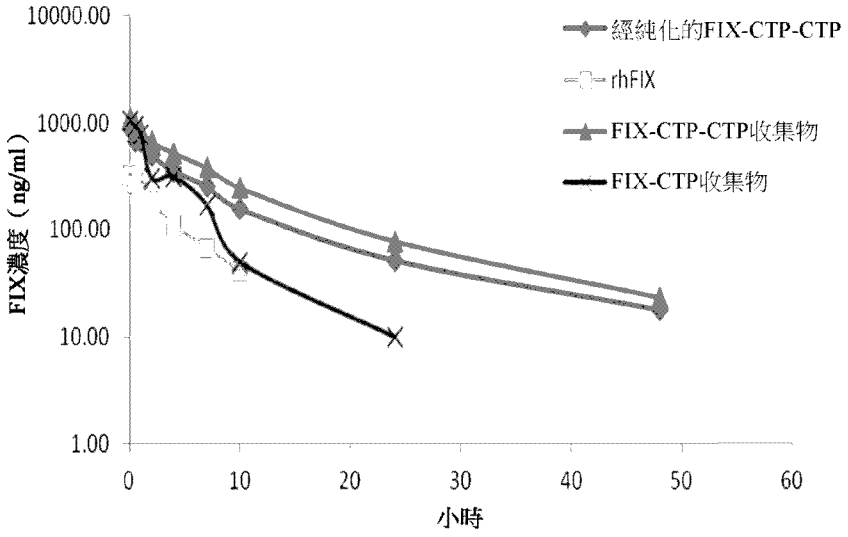
長效ＣＴＰ修飾的多肽

(57)摘要

本文揭示一種在哺乳動物細胞培養系統中製造由 CTP 延伸部分修飾的相關重組多肽之方法。

Disclosed herein is a method for manufacturing a recombinant polypeptide of interest modified by a CTP extension in a mammalian cells culture system.

指定代表圖：


10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
FIX濃度（ng/ml）
0
10
20
30
40
50
60
小時
經純化的FIX-CTP-CTP
rhFIX
FIX-CTP-CTP收集物
FIX-CTP收集物

【圖4】

分割案 公告本

I862879

【發明摘要】

【中文發明名稱】

長效CTP修飾的多肽

【英文發明名稱】

LONG ACTING CTP-MODIFIED POLYPEPTIDES

【中文】

本文揭示一種在哺乳動物細胞培養系統中製造由CTP延伸部分修飾的相關重組多肽之方法。

【英文】

Disclosed herein is a method for manufacturing a recombinant polypeptide of interest modified by a CTP extension in a mammalian cells culture system.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

長效CTP修飾的多肽

【英文發明名稱】

LONG ACTING CTP-MODIFIED POLYPEPTIDES

【技術領域】

【0001】本申請案描述一種在哺乳動物細胞培養系統中製造由CTP延伸部分修飾的相關重組蛋白或肽之方法。

【先前技術】

【0002】多肽在血液、肝臟或腎臟中易受變性或酶促降解。因此，多肽通常具有幾小時的短循環半衰期。由於其低穩定性，肽類藥物通常以持續頻率傳遞以便維持活性肽之有效血漿濃度。此外，由於肽類藥物通常藉由輸注來投予，故頻繁注射肽類藥物對個體造成大量不適。因此，需要將延長治療多肽之半衰期，同時維持其高藥理學功效的技術。此類所期望的肽類藥物應該亦符合以下要求：血清穩定性增強、活性高並且當注射至個體中時誘導非所期望的免疫反應之概率低。

【0003】不利的藥物動力學（諸如短暫血清半衰期）可能會防礙多種否則的話有前景的候選藥物之藥學開發。血清半衰期為分子之經驗特徵，並且對於每種新的潛在藥物必須以實驗方式測定。舉例而言，在較低分子量的多肽藥物之情況下，諸如腎過濾之生理清除機制可能由於所需給藥方案的成本或頻率而使得藥物之治療水準的維持不可行。相反，長血清半衰期在藥物或其代謝物具有毒性副作用時為非所期望的。

【0004】藉由提供製造相關長效CTP修飾的多肽之方法，本文中解決的為提供持久治療多肽之問題。使用此等相關持久治療多肽可免除對可能為治療性、預防性或長期性治療有需要個體所需之多次注射的需要。此種技術基於使用天然肽，亦即，人類絨膜促性腺激素（hCG）之β鏈的C端肽（CTP），其提供hCG所需壽命以維持懷孕（初始$T_{1/2}$約10小時，終末$T_{1/2}$約37小時）。CTP具有28個胺基酸以及在四至六個O鍵聯糖鏈（其均在絲胺酸殘基處）處糖基化的能力。促黃體激素（LH，一種觸發排卵之生育激素）之β鏈幾乎與hCG一致，但不包含CTP。因此，LH在血液中具有顯著較短半衰期（初始$T_{1/2}$約1小時，終末$T_{1/2}$約10小時）。

【發明內容】

【0005】在一個態樣中，本文揭示一種製造相關人類絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）修飾的多肽之方法，所述方法包括以下步驟：（a）用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分之表現載體穩定轉染預定數量的細胞，其中所述經轉染的細胞表現並分泌所述相關CTP修飾的多肽；（b）獲得過度表現所述相關CTP修飾的多肽之細胞純系；（c）將所述純系在溶液中擴增至預定規模；（d）收集所述含有所述純系之溶液；（e）過濾所述含有所述純系之溶液，獲得澄清的收集物溶液；以及（f）純化所述澄清的收集物溶液，獲得具有所期望的相關CTP修飾的多肽濃度之經純化的蛋白質溶液，從而製造相關人類絨膜促性腺激素肽（CTP）修飾的多肽。

【0006】在一相關態樣中，所述相關CTP修飾的多肽經高度糖基化。在另一相關態樣中，包括於CTP修飾的多肽中之各CTP包括在超過4個O鍵聯的糖基化位點處之糖基化。在另一相關態樣中，相關CTP修飾的多肽經

高度唾液酸化。

【0007】在一相關態樣中，相關CTP修飾的多肽包括相關CTP多肽，即CTP-CTP多肽。在另一相關態樣中，相關CTP修飾的多肽包括相關多肽，即$CTP_{(3)}$多肽。在另一相關態樣中，相關CTP修飾的多肽包括相關$CTP_{(1-5)}$多肽，即$CTP_{(1-5)}$多肽。

【0008】本文所揭示之多肽及其製造方法之其他特徵及優點將自以下[實施方式]實例及圖式變得顯而易見。然而，應瞭解，同時指示多肽、包括其之組合物及其製造方法之實施例的[實施方式]及特定實例僅以說明方式給出，因為本領域中熟習此項技術者將自此[實施方式]對在本文中揭示內容之精神及範疇內之各種變化及修改變得顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0009】本文針對多肽、其製造方法及其使用方法揭示之主題尤其在本說明書之推定部分中指出且明顯主張。然而，至於操作之組織及方法以及其目標、特徵及優點，此等可參考以下[實施方式]在與隨附圖式一起閱讀時理解，在所述隨附圖式中：

圖1A-1F為示出六個EPO-CTP構築體之圖式。**圖1A**為SEQ ID NO: 1之多肽的圖式。**圖1B**為SEQ ID NO: 2之多肽的圖式。**圖1C**為SEQ ID NO: 3之多肽的圖式。**圖1D**為SEQ ID NO: 4之多肽的圖式。**圖1E**為SEQ ID NO: 5之多肽的圖式。**圖1F**為SEQ ID NO: 6之多肽的圖式。

圖2為示出EPO-CTP變異體自經轉染的DG44細胞表現之像片。來自經轉染的細胞之最終測試樣品如在「樣品製備」下所述般製備且在SDS/PAGE上運作。蛋白質藉由西方墨點法偵測。

圖3為示出商業干擾素-β1a（AVONEX）、MOD-9013（SEQ ID NO:

9）、MOD-9016（SEQ ID NO: 10）、MOD-9015（SEQ ID NO: 11）、MOD-9012（SEQ ID NO: 12）、MOD-9011（SEQ ID NO: 13）及Mock之分子量及身分的西方墨點法。PAGE SDS凝膠使用單株抗IFN-β1A抗體（B）吸墨及染色。像片指示如商業干擾素β1a（AVONEX）、MOD-901X變異體由抗IFN-β1A抗體識別。

圖4展示繪示經純化的FIX-CTP-CTP、rhFIX、FIX-CTP-CTP之收集物及FIX-CTP之收集物之PK特徵曲線的圖式。

圖5展示融合至三個、四個或五個CTP之FIX之抗CTP及抗γ羧化抗體西方墨點。將$FIX\text{-}CTP_3$、$FIX\text{-}CTP_4$及$FIX\text{-}CTP_5$收集物加載在使用Precision plus雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞（Bio-Rad））之12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE分析使用抗CTP多株抗體（Adar Biotech Production）或抗Gla抗體（American Diagnostica）藉由西方免疫墨點執行。

圖6展示$FIX\text{-}CTP_3$、$FIX\text{-}CTP_4$及$FIX\text{-}CTP_5$之庫馬斯藍偵測。在利用木菠蘿凝集素管柱之純化製程（經糖基化蛋白之免疫親和純化）之後，將$FIX\text{-}CTP_3$、$FIX\text{-}CTP_4$及$FIX\text{-}CTP_5$加載在使用Precision Plus雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE利用庫馬斯藍染料染色以用於樣品偵測。

圖7展示FIX顯色活性。經完全純化（HA管柱）的$FIX\text{-}CTP_3$、$FIX\text{-}CTP_4$及$FIX\text{-}CTP_5$對比人類正常血漿庫之活體外效力之比較性評估使用市售顯色活性測試套組BIOPHEN（Hyphen BioMed 221802）進行。所有樣品均經連續稀釋，且效力藉由將劑量反應曲線與由正常人類血漿組成之參考製備物比較來評估。

圖8展示FIX-CTP_3、FIX-CTP_4及FIX-CTP_5之比較性藥物動力學（PK）特徵曲線。血漿樣品中之FIX濃度使用人類FIX Elisa套組（Affinity Biologicals）定量。計算藥物動力學特徵曲線，且其為在各時間點下3隻動物之平均值。終末半衰期使用PK Solutions 2.0軟體計算。

圖9A-9D展示rFVII及rFIX-CTP構築體之圖式：示出rFVII-CTP構築體（**圖9A**）、rFVII-CTP-CTP構築體（**圖9B**）、rFIX-CTP構築體（**圖9C**）及rFIX-CTP-CTP構築體（**圖9D**）之圖式。

圖10A-10D. 圖10A展示繪示在5 μg/ml維生素K3存在下用FVII-CTP變異體經有限稀釋之純系轉染及選擇之細胞的收集物的條形圖。FVII之含量使用FVII ELISA（AssayPro）定量。**圖10B**展示繪示在5 μg/ml維生素K3存在下用FVII-CTP變異體經有限稀釋轉染及選擇之細胞的收集物的條形圖。活性.FVII活性使用FVII顯色活性分析（AssayPro）定量。**圖10C**展示繪示在5 μg/ml維生素K3存在下用FVII-CTP變異體經有限稀釋轉染及選擇之細胞的收集物的條形圖。藉由將活性值除以收集物FVII濃度來計算各型式之FVII比活性。**圖10D**展示繪示FVII、FVII-CTP-CTP及FVII-CTP收集物之PK特徵曲線的圖式。

圖11A-11B展示經純化的OXM-CTP變異體：OXM-CTP-CTP-CTP、OXM-CTP 4×、OXM-CTP 5×之PAGE及西方墨點（WB）分析。**圖11A**：OXM樣品及OXM-CTP變異體（10及2 μg蛋白質/泳道）之庫馬斯染色。**圖11B**：使用抗OXM之OXM-CTP變異體之WB分析。

圖12展示來自OXM-CTP變異體：CTP-OXM-CTP、CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP及CTP-CTP-OXM之純化製程之樣品的PAGE分析。

圖13展示在SD-1大鼠中OXM肽及OXM-CTP變異體之三個連續實驗之PK特徵曲線。

圖14展示如在C57BL/6小鼠中所量測OXM肽及OXM-CTP變異體之葡萄糖耐受性測試的結果。

圖15展示CTP修飾的多肽之上游製造流程生產圖。

圖16. 呈現CTP修飾的多肽之純化製程之流程圖。

應瞭解，為了說明之簡單及清晰起見，圖式中所示之元件未必按比例繪製。舉例而言，為了清楚起見，可相對於其他元件放大一些元件之尺寸。另外，在認為適當時，已在圖中重複參考編號以指示對應或類似元件。

【實施方式】

【0010】在以下[實施方式]中，闡述許多特定細節，以便提供對本文所揭示之長效CTP修飾的多肽及其製造方法之充分理解。然而，本領域中熟習此項技術者應瞭解，本文所揭示之長效CTP修飾的多肽及製造方法可在無此等特定細節之情況下實施。在其他實例中，熟知方法、程序及組分尚未詳細地描述，以便不會混淆本文所揭示之長效多肽及製造方法。

【0011】在一個實施例中，本文揭示長效多肽及其製造方法。在另一實施例中，長效多肽包括人類絨膜促性腺激素（hCG）之至少一個羧基末端肽（CTP）。在另一實施例中，CTP充當針對相關蛋白質或肽之降解的保護劑。在另一實施例中，CTP延長相關蛋白質或肽之循環半衰期。在一些實施例中，CTP增強相關蛋白質或肽之效力。

【0012】熟練的業內人士將認識到術語「CTP肽」、「羧基末端肽」及「CTP序列」可在本文中互換使用，具有相同品質及含義。在另一實施

例中，羧基末端肽為全長CTP。在另一實施例中，羧基末端肽為截短CTP。

【0013】熟練的業內人士將認識到術語「信號序列」及「信號肽」可在本文中互換使用。熟練的業內人士將認識到術語「序列」當關於聚核苷酸時可涵蓋所述序列之編碼部分。

【0014】熟練的業內人士將認識到術語「相關多肽」、「相關肽」、「肽」及「相關多肽序列」可在本文中互換使用。在另一實施例中，相關多肽為全長蛋白。在另一實施例中，相關多肽為蛋白質片段。在一個實施例中，相關多肽為肽。在一個實施例中，相關多肽為胺基酸（AA）序列。在一些實施例中，「相關多肽」為重組多肽。

【0015】在一個實施例中，相關多肽包括紅血球生成素（EPO）。在另一實施例中，相關多肽包括干擾素（IFN）。在另一實施例中，相關多肽包括細胞激素。在另一實施例中，相關多肽包括凝血因子。在另一實施例中，凝血因子包括因子VII（FVII）、活化因子VIIa（FVIIa）或因子IX（FIX）。在另一實施例中，相關多肽包括調酸素（OXM）肽或其部分。在另一實施例中，相關多肽包括類升糖素肽1（GLP-1）肽。在另一實施例中，相關多肽包括雙重GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，相關多肽不為生長激素。在另一實施例中，相關多肽不為人類生長激素。相關CTP修飾的多肽例如描述在美國專利第8,110,376號、美國專利第8,323,636號、美國專利第8,426,166號、國際申請公開案第WO 2013/121416號、國際申請公開案第WO 2013/157002號以及國際申請公開案WO 2007/094985，其中的每一個完整地併入本文中。

【0016】在一個實施例中，本文揭示一種製造相關人類絨膜促性腺激

素羧基末端肽（CTP）修飾的多肽之方法，所述方法包括以下步驟：（a）用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分之表現載體穩定轉染預定數量的細胞，其中所述經轉染的細胞表現並分泌所述相關CTP修飾的多肽；（b）獲得過度表現所述相關CTP修飾的多肽之細胞純系；（c）將所述純系在溶液中擴增至預定規模；（d）收集所述含有所述純系之溶液；（e）過濾所述含有所述純系之溶液，獲得澄清的收集物溶液；以及（f）純化所述澄清的收集物溶液，獲得具有所期望的相關CTP修飾的多肽濃度之經純化的蛋白質溶液，從而製造相關多肽之CTP修飾的多肽。在另一實施例中，製造相關人類絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）修飾的多肽之方法包括以下步驟：（a）用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分之表現載體穩定轉染預定數量的細胞，其中所述經轉染的細胞表現所述相關CTP修飾的多肽；（b）獲得過度表現所述相關CTP修飾的多肽之細胞純系；（c）將所述純系在溶液中擴增至預定規模；（d）收集所述含有所述純系之溶液；（e）過濾所述含有所述純系之溶液，獲得澄清的收集物溶液；以及（f）純化所述澄清的收集物溶液，獲得具有所期望的相關CTP修飾的多肽濃度之經純化的蛋白質溶液，從而製造相關多肽之CTP修飾的多肽。在另一實施例中，所述所表現之相關CTP修飾的多肽自細胞純系直接分離。

【0017】在另一實施例中，本文揭示一種製造具有增加之糖基化水準之相關CTP修飾的多肽的方法。在另一實施例中，利用本文所揭示之方法製造之相關CTP修飾的多肽具有增加的O鍵聯的糖基化位點佔有率。

人類絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）修飾的多肽

【0018】熟練的業內人士將認識到，短語「多肽」或「相關多肽序

列」可涵蓋任何多肽或肽序列，諸如包括生物活性之多肽或肽序列。在另一實施例中，相關多肽經糖基化。在另一實施例中，相關多肽不經糖基化。在循環半衰期方面得益於延伸部分之多肽及相關肽之實例包含（但不限於）紅血球生成素（EPO）、干擾素（IFN）、升糖素樣肽-1（GLP-1）、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、OXM及GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，相關多肽包括細胞激素多肽、紅血球生成素多肽、干擾素多肽、凝血因子多肽、因子VII多肽、活化因子VII多肽、因子IX多肽、類升糖素肽1多肽、雙重GLP-1/升糖素受體促效劑多肽或調酸素多肽。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0019】在一個實施例中，本文揭示之長效多肽包括至少一個人類絨膜促性腺激素（hCG）之羧基末端肽（CTP）。在另一實施例中，至少一個CTP充當針對由其衍生之蛋白質或肽之降解的保護劑。在另一實施例中，至少一個CTP延長由其衍生之蛋白質或肽之循環半衰期。在一些實施例中，至少一個CTP增強由其衍生之蛋白質或肽之效力。

【0020】在一個實施例中，本文揭示長效紅血球生成素（EPO）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效干擾素（IFN）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效細胞激素多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效凝血因子多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效凝血因子VII（FVII）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效活化凝血因子VIIa（FVIIa）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示長效調酸素（OXM）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭

示一種長效類升糖素肽1（GLP-1）多肽及生產或製造並使用其之方法。在另一實施例中，本文揭示一種長效雙重GLP-1/升糖素受體促效劑多肽及生產或製造並使用其之方法。

【0021】在另一實施例中，提供一種多肽，其包括連接至相關多肽序列之至少兩個絨膜促性腺激素之羧基末端肽（CTP）序列，其中所述至少兩個CTP序列中之第一CTP序列連接至相關多肽序列之胺基末端，且所述至少兩個CTP序列中之第二CTP序列連接至相關多肽序列之羧基末端。在另一實施例中，羧基末端肽（CTP）序列為人類絨膜促性腺激素之羧基末端肽（CTP）序列。

【0022】在另一實施例中，CTP經由連接子連接至相關多肽序列。在另一實施例中，將CTP序列連接至相關多肽序列之連接子為共價鍵。在另一實施例中，將CTP序列連接至相關多肽序列之連接子為肽鍵。在另一實施例中，將CTP序列連接至相關多肽序列之連接子為經取代肽鍵。

【0023】在另一實施例中，CTP融合至蛋白質。在另一實施例中，CTP融合至糖蛋白。在另一實施例中，CTP融合至糖蛋白激素。在另一實施例中，CTP融合至自糖蛋白激素衍生之肽。在一些實施例中，糖蛋白激素包括EPO、FSH或TSH及由其衍生之肽。

【0024】在一些實施例中，多肽之胺基末端處及多肽之羧基末端處的CTP序列均提供針對蛋白質之降解的加強保護。在一些實施例中，多肽之胺基末端處及多肽之羧基末端處的CTP序列均提供所連接蛋白質之延長的半衰期。

【0025】在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至羧基末端處之CTP序列的至少一個額外

CTP序列提供針對蛋白質之降解的加強保護。在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至羧基末端處之CTP序列的至少一個額外CTP序列提供所連接蛋白質之延長的半衰期。在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至羧基末端處之CTP序列的至少一個額外CTP序列提供所連接蛋白質之增強的活性。

【0026】在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至胺基末端處之CTP序列的至少一個額外CTP序列提供針對所連接蛋白質之降解的加強保護。在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至胺基末端處之CTP序列的至少一個額外CTP序列提供所連接蛋白質之延長的半衰期。在一些實施例中，多肽之胺基末端處的CTP序列、多肽之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至胺基末端處之CTP序列的至少一個額外CTP序列提供所連接蛋白質之增強的活性。

【0027】在一個實施例中，CTP序列包括選自闡述在SEQ ID NO: 14及SEQ ID NO: 15中之序列的胺基酸序列。在另一實施例中，SEQ ID NO: 14包括以下胺基酸（AA）序列DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL（SEQ ID NO: 14）。在另一實施例中，SEQ ID NO: 15包括以下胺基酸（AA）序列SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 15）。

【0028】在另一實施例中，CTP肽包括來自人類絨膜促性腺激素之胺基酸112至位置145之胺基酸序列，如SEQ ID NO: 14中所闡述。在另一實施例中，CTP序列包括來自人類絨膜促性腺激素之胺基酸118至位置145之

胺基酸序列，如SEQ ID NO: 15中所闡述。在另一實施例中，CTP序列亦自人類絨膜促性腺激素之位置112-118之間的任何位置開始且在位置145處終止。在一些實施例中，CTP序列肽之長度為28、29、30、31、32、33或34個胺基酸且在CTP胺基酸序列之位置112、113、114、115、116、117或118處開始。

【0029】在另一實施例中，截短CTP包括SEQ ID NO: 15之前10個胺基酸。在另一實施例中，截短CTP包括SEQ ID NO: 15之前5個胺基酸，SEQ ID NO: 15之前6個胺基酸、前7個胺基酸、前8個胺基酸、前9個胺基酸、前11個胺基酸、前12個胺基酸、前13個胺基酸或前14個胺基酸。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0030】在另一實施例中，CTP肽為絨膜促性腺激素CTP之變異體，其與原生CTP的不同之處在於1-5個保守胺基酸取代，如美國專利第5,712,122號中所述。在另一實施例中，CTP肽為絨膜促性腺激素CTP之變異體，其與原生CTP的不同之處在於1個保守胺基酸取代、2個保守胺基酸取代、3個保守胺基酸取代、4個保守胺基酸取代或5個保守胺基酸取代。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0031】在另一實施例中，CTP肽胺基酸序列與原生CTP胺基酸序列或其肽至少70%同源，與原生CTP胺基酸序列或其肽至少80%、至少90%、至少95%或至少98%同源。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0032】在一個實施例中，CTP肽DNA序列編碼與原生CTP DNA序列或其肽至少70%同源的肽。在另一實施例中，CTP肽DNA序列編碼與原生CTP DNA序列或其肽至少80%同源的肽，與原生CTP DNA序列或其肽至少90%、至少95%同源、至少98%同源。各可能性表示本文揭示之一實

施例。

【0033】在一個實施例中，絨膜促性腺激素CTP胺基酸序列中之至少一個經截短。在另一實施例中，兩個絨膜促性腺激素CTP胺基酸序列均經截短。在另一實施例中，絨膜促性腺激素CTP胺基酸序列中之2個經截短。在一個實施例中，絨膜促性腺激素CTP胺基酸序列中之2個或更多個經截短。在另一實施例中，所有絨膜促性腺激素CTP胺基酸序列均經截短。在一個實施例中，截短CTP包括SEQ ID NO:16之前10個胺基酸。在一個實施例中，截短CTP包括SEQ ID NO:16之前11個胺基酸。在一個實施例中，截短CTP包括SEQ ID NO:16之前12個胺基酸。在另一實施例中，SEQ ID NO:16包括胺基酸（AA）序列：SSSSKAPPPSLP。

【0034】在一個實施例中，CTP胺基酸序列中之至少一個經糖基化。在另一實施例中，兩個CTP胺基酸序列均經糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之2個經糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之3個經糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之4個經糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之5個經糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之2個或更多個經糖基化。在另一實施例中，所有CTP胺基酸序列均經糖基化。

【0035】在一個實施例中，本文揭示之CTP序列包括至少一個糖基化位點。在另一實施例中，本文揭示之CTP序列包括2個糖基化位點、3個糖基化位點、4個糖基化位點、5個糖基化位點或6個糖基化位點。在一個實施例中，CTP胺基酸序列中之一個或多個經完全糖基化。在另一實施例中，CTP胺基酸序列中之一個或多個經部分糖基化。在一個實施例中，經部分糖基化指示，CTP糖基化位點中之一個經糖基化。在另一實施例中，

CTP糖基化位點中之兩個經糖基化。在另一實施例中，CTP糖基化位點中之三個經糖基化。

【0036】在一些實施例中，CTP序列修飾在允許使用較低劑量時有利。在一些實施例中，CTP序列修飾在允許更少劑量時有利。在一些實施例中，CTP序列修飾在允許安全長效作用時有利。

【0037】在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：細胞激素、連接至細胞激素之胺基末端的單個CTP及連接至細胞激素之羧基末端的兩個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：細胞激素、連接至細胞激素之胺基末端的單個CTP、連接至細胞激素之羧基末端的兩個CTP及連接至絨膜促性腺激素羧基末端肽之胺基末端的信號肽。

【0038】在另一實施例中，細胞激素為低分子量蛋白質。在另一實施例中，細胞激素為由細胞分泌之蛋白質。在另一實施例中，細胞激素引起及/或調節免疫反應。在另一實施例中，細胞激素具有結合於特異性受體之高親和力。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包含可用以抑制或強化其活體內作用之細胞激素的模擬物。在另一實施例中，細胞激素包括自分泌活性。在另一實施例中，細胞激素包括旁分泌活性。在另一實施例中，細胞激素包括內分泌活性。

【0039】在另一實施例中，細胞激素為造血素細胞激素。在另一實施例中，細胞激素為干擾素細胞激素。在另一實施例中，細胞激素為趨化因子。在另一實施例中，細胞激素為腫瘤壞死因子細胞激素。在另一實施例中，如本文所用之細胞激素包括生物活性及臨床功效。在另一實施例中，如本文所用之細胞激素為治療蛋白。

【0040】在另一實施例中，如本文中所述之CTP修飾的細胞激素與無CTP之相同細胞激素相比具有增強的生物活性。在另一實施例中，包括連接至其胺基末端之至少一個CTP及連接至其羧基末端之至少兩個CTP的細胞激素與無CTP之相同細胞激素相比具有增強的活體內生物活性。在另一實施例中，包括連接至其胺基末端之一個CTP及連接至其羧基末端之兩個CTP的細胞激素與無CTP之相同細胞激素相比具有增強的活體內生物學活性。

【0041】在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於促進器官移植。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於減少發炎。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於誘導紅血球生成。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於誘導生長。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於誘導體重增加。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於癌症療法，如本領域中一般技術者將易於理解的。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於誘導免疫反應。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於感染性疾病療法，如本領域中一般技術者將易於理解的。在另一實施例中，CTP修飾的細胞激素用於治療過敏症，如本領域中一般技術者將易於理解的。

【0042】在另一實施例中，如本文中所述之CTP-細胞激素-CTP-CTP包括細胞激素或其經由肽鍵連接於至少一個CTP單元的活性片段。在另一實施例中，如本文中所述之CTP-細胞激素-CTP-CTP包括細胞激素或其經由肽鍵連接於至少一個CTP單元的活性片段，所述至少一個CTP單元經由肽鍵連接於另一CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述包括其細胞激素片段及CTP單元及/或其片段的多肽經由肽鍵互連。在另一實施例中，一個核酸分子編碼如本文所述包括細胞激素及/或其片段及CTP單元及/或

其片段的多肽。

【0043】熟練的業內人士將瞭解，本文揭示之相關多肽可涵蓋同系物。在一個實施例中，同系物包括其缺失、插入或取代（包含胺基酸取代）變異體及其生物學活性多肽片段。在另一實施例中，同系物包括與相關多肽至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源之多肽，如使用美國國家生技資訊中心（National Center of Biotechnology Information，NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0044】在一個實施例中，細胞激素為同系物。

【0045】在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：細胞激素拮抗劑、連接至細胞激素拮抗劑之胺基末端的單個絨膜促性腺激素羧基末端肽及連接至細胞激素拮抗劑之羧基末端的兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：細胞激素拮抗劑、連接至細胞激素拮抗劑之胺基末端的單個絨膜促性腺激素羧基末端肽、連接至細胞激素拮抗劑之羧基末端的兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽及連接至絨膜促性腺激素羧基末端肽之胺基末端的信號肽。

【0046】在另一實施例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑作為抗細胞激素策略施加。在另一實施例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑有效減少發炎反應。在另一實施例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑與未經修飾之細胞激素拮抗劑相比更有效減少發炎反應。在另一實施例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑與未經修飾之細胞激素拮抗劑相比更穩定。在另一實施

例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑與未經修飾之細胞激素拮抗劑相比在活體內更穩定。在另一實施例中，經CTP修飾之細胞激素拮抗劑與未經修飾之細胞激素拮抗劑相比更具生物活性。

【0047】在另一實施例中，細胞激素拮抗劑為細胞激素同系物。在另一實施例中，細胞激素拮抗劑為細胞激素受體之可溶性片段。在另一實施例中，細胞激素拮抗劑為趨化因子受體同系物。

【0048】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素涉及包括Ras-MAP激酶路徑之細胞激素信號級聯。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素涉及誘導JNK。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素涉及誘導p38MAP。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素引起細胞增殖。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素涉及包括JAK/STAT路徑之細胞激素信號級聯。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素引起細胞生長抑制。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素引起分化。

【0049】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為四個α-螺旋束細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為長鏈4-螺旋束細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為短鏈4-螺旋束細胞激素。

【0050】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為β-車軸草細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為β-三明治細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為EGF樣細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括胱胺酸結二聚域。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括α及β鏈兩者。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為α超家族細胞激素，諸如IL-2、IL-4、IL-5、GM-

CSF、IL-3、IFN-α或IL-13。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為二聚4-螺旋束細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為細胞激素之IL家族之成員。

【0051】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為長鏈4-螺旋束超家族細胞激素，諸如G-CSF、骨髓單核細胞性生長因子、IL-6、IL-3、IL-7、LIF、抑瘤素M、睫神經營養因子（CNTF）或膽鹼激導性分化因子（CDF）。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為短鏈4-螺旋束超家族細胞激素，諸如IL-2、IL-4、IL-13、IFN-α、IL-5、GM-CSF、IL-3、巨噬細胞群落刺激因子（M-CSF）在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為二聚4-螺旋束，諸如IFN-γ、IL-10或IFN-β。

【0052】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為β-車軸草細胞激素，諸如IL1-A、IL1-B或FGF。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為β-三明治細胞激素，諸如TNF-α或TNF-β。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為EGF樣細胞激素，諸如TGF-α。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括胱胺酸結二聚域。在另一實施例中，促性腺激素、神經生長因子（NGF）、血小板衍生生長因子（PDGF）及TGF-β2包括胱胺酸結二聚域。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括α及β鏈兩者。在另一實施例中，IL-8、IP10、血小板因子4（PF-4）、bTG、GRO、9E3、HLA-A2、巨噬細胞發炎性蛋白1α（MIP-1α）、巨噬細胞發炎性蛋白1β（MIP-1β）及黑素瘤生長刺激活性（MGSA）包括α及β鏈兩者。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0053】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素結合造血素-受體家族成員（亦稱為I類細胞激素受體家族）。在另一實施例中，如本文

中所述之細胞激素結合II類細胞激素受體（干擾素或干擾素樣細胞激素）。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素結合腫瘤壞死因子-受體（TNFR）。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素結合趨化因子-受體。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素結合G蛋白偶聯受體。

【0054】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為IL-2細胞激素，為干擾素，為IL-10細胞激素，為紅血球生成素（EPO）、血小板生成素（THPO），為IL-1、IL-18或IL-17。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素促進T細胞之增殖。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0055】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素接近由睫神經營養因子及顆粒球群落刺激因子（CSF）形成之簇

【0056】在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素增強1類細胞激素反應（IFN-γ、TGF-β等）。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素增強2類抗體反應（IL-4、IL-10、IL-13等）。

【0057】在另一實施例中，細胞激素為肽。在另一實施例中，細胞激素經糖基化。在另一實施例中，細胞激素為多肽。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為經修飾之細胞激素，其包括連接至所述細胞激素之胺基末端的至少一個CTP肽及連接至所述細胞激素之羧基末端的至少兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為經修飾之細胞激素，其由以下各者組成：細胞激素、連接至所述細胞激素之胺基末端的一個CTP肽及連接至所述細胞激素之羧基末端的至少兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為經修飾之細胞激素，其由以下各者組成：細胞激素、連接至所述細胞激素之胺基末端的至少一個CTP肽及連接至所述細胞激素之羧基末端的兩個

絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素為經修飾之細胞激素，其由以下各者組成：細胞激素、連接至所述細胞激素之胺基末端的一個CTP肽及連接至所述細胞激素之羧基末端的兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽。

【0058】在另一實施例中，羧基末端肽（CTP）經由連接子連接至細胞激素。

【0059】在一個實施例中，本文揭示之聚核苷酸進一步包括信號序列，其編碼用於本文揭示之相關CTP修飾的多肽之分泌的信號肽。在另一實施例中，信號序列為CTP序列之N端，所述CTP序列又為相關多肽序列之N端；例如序列為（a）信號序列-（b）CTP-（c）相關序列-（d）視情況選用之1個或更多個額外CTP序列。在另一實施例中，1個或更多個CTP序列插入在相關多肽序列之信號序列與相關多肽序列自身之間，由此間雜相關野生型序列。在另一實施例中，信號序列為相關序列之多肽的N端，所述相關序列之多肽又為至少一個CTP序列之N端。在另一實施例中，在表現並分泌相關CTP修飾的多肽之後，信號肽自前驅蛋白裂解，得到成熟蛋白。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以包含信號肽之前驅蛋白形式表現，其中當自細胞分泌時，信號肽自前驅蛋白裂解，引起相關CTP修飾的多肽之成熟形式的分泌。

【0060】在一些實施例中，信號序列包含（但不限於）如SEQ ID NO: 19中所闡述之用於EPO的內源性信號序列或如SEQ ID NO: 108中所闡述之用於IFN-β1的內源性信號序列。在另一實施例中，信號序列為CTP序列之N端，所述CTP序列又為相關多肽序列之N端；例如序列為（a）信號序列-（b）CTP-（c）相關序列-（d）視情況選用之1個或更多個額外

CTP序列。在另一實施例中，1個或更多個CTP序列插入在相關多肽序列之信號序列與相關多肽序列自身之間，由此間雜相關野生型序列。

【0061】在一些實施例中，細胞激素之胺基末端處及細胞激素之羧基末端處的CTP序列均提供針對細胞激素之降解的加強保護。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少一個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP單元提供針對清除之加強保護。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少一個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP單元提供延長的清除時間。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少一個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP單元增強細胞激素之Cmax。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少一個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP單元增強細胞激素之Tmax。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少一個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP單元增強T1/2。

【0062】在一些實施例中，細胞激素之胺基末端處及細胞激素之羧基末端處的CTP序列均延長所連接細胞激素之半衰期。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的至少單個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的至少兩個CTP序列為經修飾之細胞激素提供延長的半衰期。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的單個CTP序列及細胞激素之羧基末端處的兩個CTP序列為所連接細胞激素提供延長的半衰期。在另一實施例中，細胞激素之胺基末端處的單個CTP序列及細胞激素之羧基末端處串聯的兩個CTP序列為細胞激素提供延長的半衰期。

【0063】在一些實施例中，細胞激素之胺基末端處的CTP序列、細胞激素之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至CTP序列之羧基末端的至少一

個額外CTP序列提供針對細胞激素之降解的加強保護。在一些實施例中，細胞激素之胺基末端處的CTP序列、細胞激素之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至CTP序列之羧基末端的至少一個額外CTP序列延長細胞激素之半衰期。在一些實施例中，細胞激素之胺基末端處的CTP序列、細胞激素之羧基末端處的CTP序列及串聯連接至CTP序列之羧基末端的至少一個額外CTP序列增強細胞激素的生物活性。

【0064】在另一實施例中，本文揭示之CTP結合的細胞激素以與未經修飾之細胞激素相同的方式使用。在另一實施例中，本文揭示之結合的細胞激素具有延長的循環半衰期及血漿停留時間、降低的清除率及增加的活體內臨床活性。在另一實施例中，由於如本文中所述之結合的細胞激素之改進的特性，此等結合物與未經修飾之細胞激素相比較不頻繁地投予。在另一實施例中，如本文中所述之結合的細胞激素一週一次投予，代替未經修飾之細胞激素的一週三次。在另一實施例中，減少的投予頻率將引起改進的患者順應性，引起改進的治療結果，以及改進的患者生活品質。在另一實施例中，與細胞激素鍵聯至聚(乙二醇)之常規結合物相比，已發現，具有本文揭示之結合物的分子量及連接子結構之結合物具有改進的效力、改進的穩定性、提高的AUC水準、加強的循環半衰期。在另一實施例中，與細胞激素鍵聯至聚(乙二醇)之常規結合物相比，已發現，具有本文揭示之結合物的分子量及連接子結構之EPO具有改進的效力、改進的穩定性、提高的AUC水準、加強的循環半衰期。在另一實施例中，結合的細胞激素之治療有效量為對於活體內可量測的預期生物活性所必需的結合物之量。

【0065】在另一實施例中，結合的EPO之治療有效量為對於誘導骨髓

細胞以增加網織球及紅血球產生之生物活性所必需的EPO結合物之量。在另一實施例中，結合的細胞激素之治療有效量根據如待治療病況之確切類型、待治療患者之健康狀況以及組合物中之其他成分的因素測定。在另一實施例中，結合的細胞激素之治療有效量為每公斤體重投予0.01至10 μg一週一次。在另一實施例中，結合的細胞激素之治療有效量為每公斤體重投予0.1至1 μg一週一次。在另一實施例中，包括結合的細胞激素之醫藥組合物以對於利用各種手段投予人類患者有效的強度調配。

【0066】在另一實施例中，將如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽用作抗腫瘤劑。在另一實施例中，將如本文中所述包括IFN α及CTP單元之多肽用作抗腫瘤劑。在另一實施例中，包括IFN α及CTP單元之多肽以投予罹患癌症之患者的醫藥組合物形式調配。

【0067】在另一實施例中，如本文中所述包括IFN蛋白及CTP單元之多肽與如本領域中一般技術者已知的常規或重組干擾素等效地使用。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽與如本領域中一般技術者已知的常規或重組干擾素等效地使用。

【0068】在另一實施例中，如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽調節免疫反應。在另一實施例中，如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽調節細胞免疫反應。在另一實施例中，如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽調節抗體免疫反應。在另一實施例中，如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽抑制如本文中所述之免疫反應。在另一實施例中，如本文中所述包括細胞激素及CTP單元之多肽觸發如本文中所述之免疫反應。

【0069】在另一實施例中，包括IFN之多肽抑制T細胞之活性，同時

減少產生在引起感染及損傷之發炎反應中起作用之細胞激素。在另一實施例中，如本文中所述包括IFN蛋白及CTP單元之多肽增強T細胞之活性，同時減少產生在引起感染及損傷之發炎反應中起作用之細胞激素。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽以投予需要T細胞活性增強之患者的醫藥組合物形式調配。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽以投予罹患多發性硬化症之患者的醫藥組合物形式調配。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽以投予罹患C型肝炎感染之患者的醫藥組合物形式調配。

【0070】在另一實施例中，細胞激素為干擾素（IFN）。在另一實施例中，細胞激素為I型干擾素。在另一實施例中，干擾素（IFN）為IFN-α2a。在另一實施例中，干擾素（IFN）為IFN-α2b。在另一實施例中，干擾素（IFN）為IFN-β1a。在另一實施例中，干擾素（IFN）為IFN-α2b。在另一實施例中，干擾素（IFN）為IFN-β1b。在另一實施例中，IFN-β1之信號肽闡述在SEQ ID NO: 108中：MTNKCLLQIALLLCFSTTALS（SEQ ID NO: 108）。

【0071】熟練的業內人士將瞭解，術語紅血球生成素（EPO）可涵蓋術語「EPO肽」及「EPO序列」，且可在本文中互換使用。在另一實施例中，EPO肽為EPO蛋白。

【0072】在一些實施例中，紅血球生成素（EPO）根據本文所揭示之教示內容使用。在一些實施例中，任何EPO編碼胺基酸序列為EPO序列。在一些實施例中，任何EPO編碼核酸序列為EPO序列。在一些實施例中，與重組EPO及EPO與CTP之其他組合相比，CTP序列與EPO蛋白之胺基及羧基末端兩者的連接引起在刺激紅血球生成時的效力增加。在一些實施例

中，連接至三個CTP序列之EPO不削弱結合於其受體，如美國專利第8,110,376號中所證明，所述專利完整地併入本文中，其展示出連接至三個CTP序列之EPO在刺激TF-1細胞之增殖時與野生型EPO同樣有效。在一些實施例中，本文揭示之CTP修飾的EPO多肽闡述在SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 6中。

【0073】熟練的業內人士將瞭解，術語「紅血球生成素」可涵蓋哺乳動物紅血球生成素。

【0074】熟練的業內人士將瞭解，本文揭示之術語「EPO序列」亦可涵蓋同系物。在一個實施例中，本文揭示之紅血球生成素胺基酸序列與本文揭示之EPO序列至少50%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。在另一實施例中，本文揭示之EPO胺基酸序列與本文揭示之EPO序列至少60%、至少70%同源、至少80%、至少90%或至少95%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。在一個實施例中，EPO取代變異體包括EPO胺基酸序列之位置104中的甘胺酸經絲胺酸取代（SEQ ID NO: 7）。

【0075】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，SEQ ID NO: 1包括以下胺基酸（AA）序列：

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGL ALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGA QKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACR TGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個額外CTP胺基酸肽，用於治療貧血。

【0076】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，SEQ ID NO: 2 包括以下胺基酸（AA）序列：MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGL ALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGA QKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACR TGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPG PSDTPILPQ。

【0077】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在一個實施例中，SEQ ID NO: 3 包括以下胺基酸（AA）序列：MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS

DTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP DTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQP WEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT ADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSR LPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ。

【0078】在一個實施例中，在表現之後，分泌成熟CTP修飾的EPO多肽，信號肽已自前驅蛋白裂解，得到成熟蛋白。舉例而言，在闡述在SEQ ID NO: 3中之前驅物CTP修飾的EPO多肽中，胺基酸1-27：MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLG（SEQ ID NO: 19）表示前驅物CTP修飾的EPO多肽之信號肽，且胺基酸SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEA ENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGL ALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGA QKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACR TGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPG PSDTPILPQ（SEQ ID NO: 109）表示缺乏信號肽之成熟工程化CTP修飾的EPO多肽。在一個實施例中，無信號肽之CTP修飾的EPO之胺基酸序列闡述在SEQ ID NO: 109中。在另一實施例中，CTP修飾的EPO之信號肽闡述在SEQ ID NO: 19中。

【0079】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在一個實施例中，SEQ ID NO: 4包括以下胺基酸（AA）序列：

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK
EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQ
GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRAL
GAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEA
CRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYL
LEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVE
VWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTL
LRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLY
TGEACRTGDR。

【0080】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，SEQ ID NO: 5包括以下胺基酸（AA）序列：
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP
DTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQP
WEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT
ADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR。

【0081】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在一個實施例中，SEQ ID NO: 6包括以下胺基酸（AA）序列：
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS

DTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVP
DTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQP
WEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTIT
ADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSR
LPGPSDTPILPQ。

【0082】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在一個實施例中，SEQ ID NO: 7包括以下胺基酸（AA）序列：
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK
EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQGL
ALLSEAVLRSQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRALGA
QKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACR
TGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ。

【0083】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在一個實施例中，SEQ ID NO: 8包括以下胺基酸（AA）序列：
MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAK
EAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNFYAWKRMEVGQQAVEVWQ
GLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLLRAL
GAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEA
CRTGDR。

【0084】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於治療貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，SEQ ID NO: 17包括核苷酸（nt）序列：tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctccccc gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc ccgactcccg gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc ggccgc。

【0085】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID

NO: 18中之核酸，其編碼用於治療貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，SEQ ID NO: 18包括nt序列：tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctccccc gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc tcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc。

【0086】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑

制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造CTP修飾的EPO，其具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於抑制貧血。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID

NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於治療貧血。

【0087】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於抑制貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於抑制貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0088】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例

中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於治療腫瘤相關的貧血。

【0089】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID

NO: 17中編碼EPO肽之核酸，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中編碼EPO肽之核酸，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤相關的貧血。

【0090】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO:

5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於抑制腫瘤相關的貧血。

【0091】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制腫瘤相關的貧血。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於抑制腫瘤相關的貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於抑制腫瘤相關的貧血的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0092】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具

有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一

實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於治療腫瘤低氧。

【0093】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於治療腫瘤低氧的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中編碼EPO肽之核酸，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療腫瘤低氧。

【0094】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事

件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個

CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。

【0095】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於治療慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0096】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法

製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如

HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。

【0097】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，前編碼用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於抑制慢性感染（諸如HIV、發炎性腸病或敗血性事件）的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0098】在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在

C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學

療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。

【0099】在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於治療在癌症化學療法之後的疲乏症候群的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0100】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺

基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用於改善幹細胞移植。

【0101】 在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於改善幹細胞移植。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於改善幹細胞移植的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用其闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於改善幹細胞移植的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0102】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 1中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少額外一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所

揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 2中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 3中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 4中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 5中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 6中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 8中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造EPO肽，其闡述在SEQ ID NO: 7中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，具有闡述在SEQ ID NO: 109中之胺基酸序列之CTP修飾的EPO用

於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。

【0103】 在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用編碼EPO肽之核酸序列，所述EPO肽另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 17中之核酸，其編碼用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，本文所揭示之方法使用闡述在SEQ ID NO: 18中之核酸，其編碼用於提高患有再生不全性貧血或骨髓發育不良症候群之患者之存活率的EPO肽及在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽。

【0104】 在另一實施例中，細胞激素進一步包括信號肽用於其分泌。在一些實施例中，信號序列包含（但不限於）IFN之內源性信號序列。在一些實施例中，信號序列包含（但不限於）任何已知細胞激素之內源性信號序列。在另一實施例中，本文所揭示之多肽及方法製造細胞激素，所述細胞激素另外具有SEQ ID NO:19之信號肽及在N端上之至少一個CTP肽及在C端上之至少一個CTP肽。在另一實施例中，本文所揭示之多肽及方法製造細胞激素，所述細胞激素另外具有在N端上SEQ ID NO:19之信號肽及在N端上之至少一個CTP肽及在C端上之至少兩個CTP肽。在另一實施例中，本文所揭示之多肽及方法製造細胞激素，所述細胞

激素另外具有在N端上SEQ ID NO: 19之信號肽及在N端上之單個CTP肽及在C端上之兩個CTP肽。在另一實施例中，SEQ ID NO: 19包括以下胺基酸（AA）序列：MTNKCLLQIALLLCFSTTALS（SEQ ID NO: 19）。

【0105】 在另一實施例中，細胞激素為干擾素。在一些實施例中，干擾素根據本文所揭示之教示內容使用。在一些實施例中，CTP序列與干擾素蛋白之胺基及羧基末端兩者的連接引起效力增加。在一些實施例中，CTP序列與干擾素蛋白之胺基及羧基末端兩者的連接引起活體內活性延長。

【0106】 熟練的業內人士將瞭解，術語「干擾素」可涵蓋哺乳動物I型干擾素多肽。在另一實施例中，「干擾素」包括哺乳動物II型干擾素多肽。在一些實施例中，使用如本領域中普通技術人員已知的其他合適的干擾素多肽。在一些實施例中，干擾素為α-干擾素。在一些實施例中，干擾素為β-干擾素。在一些實施例中，干擾素為γ-干擾素。在一些實施例中，干擾素為ω-干擾素。在一些實施例中，干擾素為亞種干擾素。在一個實施例中，亞種干擾素（IFN）為IFN-α2a。在一個實施例中，亞種干擾素（IFN）為IFN-α2b。在一個實施例中，亞種干擾素（IFN）為IFN-β2a。在一個實施例中，干擾素（IFN）亞種為IFN-β2b。

【0107】 在一個實施例中，本文揭示之干擾素展現干擾素活性，諸如抗病毒或抗增殖活性。在一些實施例中，干擾素之非限制性實例在下**表1**中列出。

【0108】 熟練的業內人士將瞭解術語「干擾素」亦可涵蓋同系物。在一個實施例中，本文揭示之干擾素胺基酸序列與**表1**中列出之干擾素序

列至少50%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。在一個實施例中，本文揭示之干擾素胺基酸序列與表1中列出之干擾素序列至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。熟練的業內人士將瞭解，同源性可涵蓋其缺失、插入或取代（包含胺基酸取代）變異體及其生物學活性多肽片段。在一個實施例中，干擾素β之位置17中之半胱胺酸經絲胺酸取代（SEQ ID NO: 20）。在一個實施例中，SEQ ID NO: 20包括胺基酸（AA）序列：MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN。

【0109】 下**表1**列出干擾素之實例與其對應的NCBI序列號。

表 1

干擾素名稱
干擾素，α 1
干擾素，α 10
干擾素，α 13
干擾素，α 14
干擾素，α 16
干擾素，α 17
干擾素，α 2
干擾素，α 21
干擾素，α 4
干擾素，α 5
干擾素，α 6
干擾素，α 7
干擾素，α 8
干擾素，β 1
干擾素，ε1
干擾素，γ
干擾素，ε
干擾素，Ω1

【0110】 在另一實施例中，治療或減輕個體之可利用細胞激素或包括其之醫藥調配物治療或減輕之疾病的方法包括以下步驟：向個體投予治療有效量之如本文所述之包括細胞激素及CTP單元的多肽，從而治療或減輕個體之可利用細胞激素治療或減輕之疾病。

【0111】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造干擾素β1肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制多發性硬化症。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造干擾素β1肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制多發性硬化症。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造干擾素β1肽，其闡述在SEQ ID NO: 20中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制多發性硬化症。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造干擾素β1肽，其闡述在SEQ ID NO: 20中，另外具有在N端上SEQ ID NO: 19之信號肽及在N端上SEQ ID NO: 19之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上SEQ ID NO: 20之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制多發性硬化症。

【0112】 在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括細胞激素及至少三個CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括干擾素（IFN）肽及三個CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括由包括闡述在SEQ ID NO: 13中之胺基酸序列之胺基酸序列編碼的干擾素（IFN）肽-CTP多肽。在另一實施例中，SEQ ID NO: 13包括以下胺基酸（AA）序列：

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNG

RLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDS
SSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLH
LKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSS
SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 13，MOD-9011）。

【0113】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽及CTP之細胞激素由闡述在SEQ ID NO: 22中的核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 22包括以下核苷酸（NA）序列：
tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccct
gagcatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtg
gcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatc
aagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatctt
cgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggcc
aacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttca
ccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcagaatcctgcactacctgaa
ggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgaggaacttctacttcat
caacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggcccctccaccttccctgcccagtc
caagccgactccctgggccctccgatacaccaattctgccacagtgatga（SEQ ID NO: 22，MOD-9011）。

【0114】 在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括干擾素（IFN）肽及兩個連接至其羧基末端的CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括由包括闡述在SEQ ID NO:12中之胺基酸序列之胺基酸序列編碼的干擾素（IFN）肽-CTP（×2）。在另一實施例中，SEQ ID NO: 12包括以下胺基酸（AA）序列：

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNG
RLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDS
SSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLH
LKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSS
SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILP
Q（SEQ ID NO: 12，MOD-9012）。

【0115】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽及兩個連接至其羧基末端的CTP單元的細胞激素由闡述在SEQ ID NO: 23中之核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 23包括以下核苷酸（NA）序列：

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccct
gagcatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtg
gcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatc
aagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatctt
cgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggcc
aacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttca
ccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcagaatcctgcactacctgaa
ggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcctgaggaacttctacttcat
caacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggcccctccaccttccctgcccagtc
caagccgactccctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcct
ccatccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggt
ctggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 23，MOD-9012）。

【0116】 在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括干擾素

（IFN）肽、單個連接至IFN的胺基末端之CTP單元及兩個連接至IFN的羧基末端之CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括干擾素（IFN）肽、單個連接至IFN的胺基末端之CTP單元及兩個串聯連接至IFN的羧基末端之CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括（自胺基至羧基末端）：CTP（×1）-干擾素（IFN）肽-CTP（×2），其包括闡述在SEQ ID NO: 9中之胺基酸序列。在另一實施例中，SEQ ID NO: 9包括以下胺基酸（AA）序列：MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 9，MOD-9013）。

【0117】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽、單個連接至IFN的胺基末端之CTP單元及兩個連接至IFN的羧基末端之CTP單元的細胞激素由闡述在SEQ ID NO: 24中的核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 24包括以下核苷酸（NA）序列：tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcagactgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacga

gatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatc
gtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagct
ggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcag
aatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc
tgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggcccct
ccaccttccctgcccagtccaagccgactccctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcag
ctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatc
ctgcctcagtgatgaaggtctggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 24, MOD-9013）。

【0118】 在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括干擾素（IFN）肽、單個連接至IFN的胺基末端之CTP及單個位於IFN編碼序列內之CTP。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括（自胺基至羧基末端）：CTP（×1）-干擾素（IFN）肽（片段1）-CTP-干擾素（IFN）肽（片段2），其包括闡述在SEQ ID NO: 25中之胺基酸序列。在另一實施例中，SEQ ID NO: 25包括以下胺基酸（AA）序列：
MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQM
SYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQ
QFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQIN
HLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCA
WTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIK
QLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVY
HQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYS
HCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN（SEQ ID NO: 25，MOD-

9014）。

【0119】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽、單個連接至IFN的胺基末端的CTP單元及單個位於IFN編碼序列內的CTP單元的細胞激素由闡述在SEQ ID NO: 26中之核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 26包括以下核苷酸（NA）序列：

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccct
gagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcaggctgccaggcccca
gcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttcc
agtgccagaaactgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggaccggatgaacttc
gacatccccgaagagatcaagcagctgcagcagttccagaaagaggacgccgccctgaccatctacg
agatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatc
gtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagct
ggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcag
aatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc
tgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggcccct
ccaccctccctgccctccccaagcagactgcccggaccctccgacacaccaattctgccacagatgtc
ctacaatctgctcggatttctgcagcgctcctccaactttcagtgtcagaagctcctctggcagctcaatg
gccgcctggaatattgtctgaaagacagaatgaattttgacatcccagaggaaattaaacagctccagca
gtttcagaaagaagatgctgctctcacaatctatgaaatgctccagaatatctttgcaatctttcgccagga
cagctcctccaccgggtggaatgagacaattgtcgagaatctgctcgccaatgtctatcatcagatcaat
cacctcaagacagtcctcgaagaaaaactcgaaaaagaagatttcacacgcggcaaactgatgtcctcc
ctgcatctgaagcgctactatgggcgcatcctgcattatctgaaagctaaagaatactcccactgtgcttg
gacaattgtgcgcgtcgagatcctgagaaacttttatttcattaaccgcctgacaggatacctgcgcaact

gatgaaggtctggatgcggccgc（SEQ ID NO: 26，MOD-9014）。

【0120】 在另一實施例中，如本文中所述之細胞激素包括干擾素（IFN）肽及單個連接至其胺基末端的CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括干擾素（IFN）肽-CTP，其包括闡述在SEQ ID NO: 11中之胺基酸序列。在另一實施例中，SEQ ID NO: 11包括以下胺基酸（AA）序列：

MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQM
SYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQ
QFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQIN
HLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCA
WTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN*（SEQ ID NO: 11，MOD-9015）。

【0121】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽及單個連接至其胺基末端的CTP的多肽由闡述在SEQ ID NO: 27中之核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 27包括以下核苷酸（NA）序列：

tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccct
gagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcaggctgccaggcccca
gcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttcc
agtgccagaaactgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggaccggatgaacttc
gacatccccgaagagatcaagcagctgcagcagttccagaaagaggacgccgccctgaccatctacg
agatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatc
gtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagct
ggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcag
aatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc

tgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaactgatgagtccgcggccgc（SEQ ID NO: 27, MOD-9015）。

【0122】 在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括干擾素（IFN）肽、單個連接至其胺基末端的CTP單元及單個連接至其羧基末端的CTP單元。在另一實施例中，如本文中所述之多肽包括干擾素（IFN）肽-CTP，其包括闡述在SEQ ID NO: 10中之胺基酸序列。在另一實施例中，SEQ ID NO: 10 包括以下胺基酸（AA）序列：MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 10，MOD-9016）。

【0123】 在另一實施例中，如本文中所述之包括干擾素（IFN）肽、單個連接至其胺基末端的CTP單元及單個連接至其羧基末端的CTP單元的細胞激素由闡述在SEQ ID NO: 28中之核酸分子編碼。在另一實施例中，SEQ ID NO: 28 包括以下核苷酸（NA）序列：tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccctgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcagactgccaggccccagcgacacccccatcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatc

gtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaaccgtgctggaagagaagct
ggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtactacggcag
aatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc
tgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggcccct
ccaccttccctgcccagtccaagccgactccctgggccctccgatacaccaattctgccacagtgatga
aggtctggatgcggccgc（SEQ ID NO: 28，MOD-9016）。

【0124】 在另一實施例中，干擾素β肽包括SEQ ID NO: 29，其包括以下胺基酸（AA）序列：MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQL
QQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI
NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHC
AWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRN（SEQ ID NO: 29）。

【0125】 在另一實施例中，相關多肽包括細胞激素，所述細胞激素另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽。在另一實施例中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽的細胞激素係選自淋巴介質、單核球激素、趨化因子及介白素。在另一實施例中，細胞激素包括自分泌作用活性。在另一實施例中，細胞激素包括旁分泌作用活性。在另一實施例中，細胞激素包括內分泌作用活性。

【0126】 在一些實施例中，升糖素樣肽-1根據本文揭示之教示內容使用。在一些實施例中，CTP序列與「升糖素樣肽-1」之胺基及羧基末端兩者的連接引起效力增加。在一些實施例中，CTP與肽之胺基及羧基末端兩者的連接引起活體內活性延長。在一些實施例中，CTP與類升糖素肽之

胺基及羧基末端兩者的連接引起活體內活性延長。

【0127】 熟練的業內人士將瞭解，術語「升糖素樣肽-1」（GLP-1）可涵蓋哺乳動物多肽。另外，熟練的業內人士將瞭解，術語「升糖素樣肽-1」（GLP-1）可涵蓋人類多肽。在一些實施例中，GLP-1自升糖素前原蛋白裂解，其能夠結合於GLP-1受體且啟動信號轉導路徑，產生促胰島素活性。熟練的業內人士將瞭解，術語「促胰島素活性」可涵蓋對升高的葡萄糖含量起反應刺激胰島素分泌之能力，從而引起細胞對葡萄糖之攝取且降低血漿葡萄糖含量。在一些實施例中，GLP-1多肽包含（但不限於）美國專利第5,118,666號中描述之彼等；所述專利以引用的方式併入本文中。

【0128】 在一個實施例中，GLP-1之胺基酸序列包括SEQ ID NO: 21中闡述之序列：HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR。熟練的業內人士將認識到，本文揭示之GLP-1亦可涵蓋GLP-1同系物。在一個實施例中，本文揭示之GLP-1胺基酸序列與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少50%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。在另一實施例中，本文揭示之GLP-1胺基酸序列與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少60%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定，與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少70%同源，與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少80%同源，與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少90%同源，與闡述在SEQ ID NO: 21中之GLP-1序列至少95%同源，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。

【0129】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造GLP-1肽，其另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制II型糖尿病。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造GLP-1肽，其另外具有在N端上之一個CTP胺基酸肽及在C端上之兩個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制II型糖尿病。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造GLP-1肽，其闡述在SEQ ID NO: 21中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，用於治療或抑制II型糖尿病。

【0130】 在一個實施例中，本文揭示長效凝血因子以及其製造及使用方法。在另一實施例中，長效凝血因子包括羧基末端肽（CTP，亦稱為CTP單元）。在另一實施例中，包括凝血因子之長效多肽進一步包括人類絨膜促性腺激素（hCG）之羧基末端肽（CTP）。在另一實施例中，CTP充當針對凝血因子之降解的保護劑。在另一實施例中，CTP延長凝血因子之C_{max}。在另一實施例中，CTP延長凝血因子之T_{max}。在另一實施例中，CTP延長凝血因子之循環半衰期。在一些實施例中，CTP增強凝血因子之效力。

【0131】 在另一實施例中，本文揭示之一種延長凝血因子之生物半衰期之方法，其包括將一至十個CTP連接至凝血因子之羧基末端之步驟，從而延長凝血因子之生物半衰期。在另一實施例中，本文揭示一種延長凝血因子之生物半衰期之方法，其包括將一至五個CTP連接至凝血因子之羧基末端之步驟，從而延長凝血因子之生物半衰期。在另一實施例中，本文揭示一種用於延長凝血因子之循環半衰期之方法。在另一實施例中，本文揭示一種用於延長凝血因子之半衰期之方法。在另一實施例中，本文揭示

一種用於延長凝血因子之半衰期之方法。

【0132】 凝血因子VII（FVII）為444個胺基酸糖蛋白（50 KDa），其以不活化酶原形式由肝細胞分泌至血流中。當組織損傷及暴露於循環血液時，FVII與組織因子（TF）形成複合物，所述組織因子為FVII之真正的受體蛋白且由位於更深層血管壁中之各種細胞表現。此FVII-TF複合物之形成引起FVII活化。活化FVII（FVIIa）藉由使因子IX及因子X活化來啟動外源性凝血路徑。

【0133】 FVII屬於與凝血系統相關之維生素K依賴性糖蛋白之組。除FVII以外，此組由因子IX、因子X、蛋白質C及凝血酶原組成。此等蛋白質具有類似的域組織，且以具有N端前肽後接成熟胺基酸序列之前驅物形式合成。前肽含有用於會將麩胺酸（Glu）轉化成γ羧基麩胺酸（Gla）之γ羧化酶的對接位點。此域後接兩個表皮生長因子樣（EGF）域、一個連接區（CR）及一個C端絲胺酸蛋白酶域。在分泌之前，FVII前肽裂解，形成406個胺基酸單鏈酶原FVII糖蛋白。在分泌之後，蛋白質可藉由CR中之裂解活化成二硫鍵連接的二鏈雜二聚體FVIIa。FVII之血漿濃度為10 nM且約1%以活性形式在健康個體中循環。

【0134】 因子IX（FIX）為415個胺基酸（55 KDa）糖蛋白；其屬於與凝血系統相關之維生素K依賴性糖蛋白之組。FIX具有與因子FVII、因子X、蛋白質C及凝血酶原類似的域組織，其以具有N端前肽後接成熟胺基酸序列之前驅物形式合成。

【0135】 FIX以單鏈分子形式分泌，其經歷複雜轉錄後修飾，許多所述轉錄後修飾對其生物化學及藥物動力學特性至關重要。在所有轉錄後修飾當中，利用維生素K依賴性γ羧化酶經γ羧化之接近FIX之胺基末端的12

個麩胺酸殘基為最重要的轉錄後修飾。羧化為FIX與磷脂表面之相互作用以及最佳FIX活性所需的。胺基末端前肽充當γ羧化酶之識別位點，且由此，在γ羧化之後，其利用稱為成對鹼性胺基酸裂解酶（PACE/弗林蛋白酶）之高基氏體（Golgi apparatus）絲胺酸蛋白酶裂解掉。四種其他轉錄後修飾可在高基氏體處進行：酪胺酸155之硫酸化，絲胺酸158之磷酸化，Ser 63及61上之O-糖基化以及最後Asn 157及16上之N-糖基化，但展示出不為FIX之適當活性所必需的。

【0136】 FIX以單鏈不活化酶原形式在血漿（平均濃度為5 μg/ml）中循環。當二肽鍵：Arg 145及Arg 180處利用一種或兩種生理活化劑FVIIa-TF複合物或FIXa進行蛋白質水解裂解時，活化肽被移除，將FIX轉化成由利用單個二硫鍵結合在一起之輕鏈及重鏈組成的完全活性酶。N端輕鏈含有非催化性γ羧基麩胺酸（Gla）及兩個表皮生長因子樣域，而C端重鏈含有所述分子之胰蛋白酶樣催化域。單獨FIXa之特徵在於催化活性較差。然而，當與FVIII複合時，其對其天然受質FX之蛋白質分解活性增加4-5個數量級。

【0137】 在另一實施例中，本文揭示一種延長凝血因子之生物半衰期的方法或一種改進凝血因子之曲線下面積（AUC）的方法，其包括將一至十個CTP連接至凝血因子之羧基末端之步驟，從而延長凝血因子之生物半衰期或改進凝血因子之AUC。在另一實施例中，本文揭示一種延長凝血因子之生物半衰期的方法或一種改進凝血因子之曲線下面積（AUC）的方法，其包括將一至五個CTP連接至凝血因子之羧基末端之步驟，從而延長凝血因子之生物半衰期或改進凝血因子之AUC。在另一實施例中，本文揭示一種延長FIX之生物半衰期的方法或一種改進FIX之曲

線下面積（AUC）的方法，其包括將一至五個CTP連接至FIX之羧基末端之步驟，從而延長FIX之生物半衰期或改進FIX之AUC。在另一實施例中，本文揭示一種延長FVII或FVIIa之生物半衰期的方法或一種改進FVII或FVIIa之曲線下面積（AUC）的方法，其包括將一至五個CTP連接至FVII或FVIIa之羧基末端之步驟，從而延長FVII或FVIIa之生物半衰期或改進FVII或FVIIa之AUC。

【0138】 在另一實施例中，本文揭示一種延長因子IX（FIX）多肽之生物半衰期的方法，其包括將三個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FIX多肽之羧基末端之步驟，從而延長所述FIX多肽之生物半衰期。在另一實施例中，延長因子VIIa（FVIIa）多肽之生物半衰期的方法包括將至多五個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的步驟，從而延長所述FVIIa多肽之生物半衰期。在一個實施例中，三個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。在另一實施例中，四個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。在另一實施例中，五個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。

【0139】 在另一實施例中，本文揭示一種改進因子IX（FIX）多肽之曲線下面積（AUC）的方法，其包括將三個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FIX多肽之羧基末端之步驟，從而改進所述FIX多肽之AUC。在另一實施例中，本文揭示一種改進因子VIIa（FVIIa）多肽之曲線下面積（AUC）的方法，其包括將至多五個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端之步驟，從而改進所述FVIIa多肽之AUC。在一個實施例中，三個絨膜促性腺激素羧基末端肽

（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。在另一實施例中，四個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。在另一實施例中，五個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）連接至所述FVIIa多肽之羧基末端。

【0140】 在另一實施例中，本文揭示之凝血因子為蛋白質。在另一實施例中，本文揭示之凝血因子為肽。在另一實施例中，本文揭示之凝血因子為多肽。在另一實施例中，凝血因子為酶。在另一實施例中，凝血因子為絲胺酸蛋白酶。在另一實施例中，凝血因子為糖蛋白。在另一實施例中，凝血因子為轉麩醯胺酸酶。在另一實施例中，凝血因子為不活化酶原。在另一實施例中，凝血因子為本領域中熟習此項技術者已知的任何凝血因子。

【0141】 在另一實施例中，凝血因子為因子VIII（FVIII）。在另一實施例中，凝血因子為因子V（FV）。在另一實施例中，凝血因子為因子XIII（FXIII）。在另一實施例中，凝血因子為因子X（FX）。在另一實施例中，凝血因子為血纖維蛋白。

【0142】 在另一實施例中，凝血因子為因子VIIa（FVIIa）。在另一實施例中，凝血因子為因子VII（FVII）。在另一實施例中，凝血因子為因子IX（FIX）。在另一實施例中，凝血因子為因子X（FX）。在另一實施例中，凝血因子為因子XIa（FXIa）。在另一實施例中，凝血因子為因子XII（FXII）。在另一實施例中，凝血因子為因子Xa（FXa）。在另一實施例中，凝血因子為因子Va（FVa）。在另一實施例中，凝血因子為凝血酶原。在另一實施例中，凝血因子為凝血酶。在另一實施例中，凝血因子為因子XI（FXI）。在另一實施例中，凝血因子為馮威里氏因子（Von

Willebrand factor，vWF）。在另一實施例中，凝血因子為活化因子VIIIa（FVIIIa）。在另一實施例中，凝血因子為B缺失域FVIII（FVIIIBDD）。在另一實施例中，凝血因子為B域缺失之FVIII（FVIIIBDD）。在另一實施例中，凝血因子為β域缺失之FVIII（FVIIIBDD）。在另一實施例中，凝血因子為因子IXa（FIXa）。在另一實施例中，凝血因子為前激肽釋放酶。在另一實施例中，凝血因子為激肽釋放酶。在另一實施例中，凝血因子為因子XIIa（FXIIa）。在另一實施例中，凝血因子為纖維蛋白原。在另一實施例中，凝血因子為凝血調節蛋白。在另一實施例中，凝血因子為因子II（FII）。

【0143】 在另一實施例中，凝血因子為糖蛋白。在另一實施例中，凝血因子為維生素K依賴性糖蛋白。在另一實施例中，凝血因子為維生素K非依賴性糖蛋白。

【0144】 在另一實施例中，凝血因子為重組蛋白。在另一實施例中，凝血因子為重組糖蛋白。在另一實施例中，凝血因子為重組糖蛋白FV。在另一實施例中，凝血因子為重組FVI。在另一實施例中，凝血因子為重組FVII。在另一實施例中，凝血因子為重組FVIII。在另一實施例中，凝血因子為重組FIX。在另一實施例中，凝血因子為重組FX。在另一實施例中，凝血因子為重組FXI。在另一實施例中，凝血因子為重組FXII。在另一實施例中，凝血因子為重組FvW。在另一實施例中，凝血因子為重組FII。在另一實施例中，凝血因子為重組FIXa。在另一實施例中，凝血因子為重組FXIa。在另一實施例中，凝血因子為重組血纖維蛋白。在另一實施例中，凝血因子為重組FVIIa。在另一實施例中，凝血因子為重組FXa。在另一實施例中，凝血因子為重組FVa。在另一實施例

中，凝血因子為重組凝血酶原。在另一實施例中，凝血因子為重組凝血酶。在另一實施例中，凝血因子為重組FVIIIa。在另一實施例中，凝血因子為重組前激肽釋放酶。在另一實施例中，凝血因子為重組激肽釋放酶。在另一實施例中，凝血因子為重組FXIIa。在另一實施例中，凝血因子為任何已知重組凝血因子。在另一實施例中，包括信號肽之凝血因子為任何已知重組凝血因子。

【0145】 在另一實施例中，凝血因子包括1至10個連接至C端之CTP重複序列且無CTP連接至N端。在另一實施例中，凝血因子包括至少一個連接至C端之CTP且無CTP連接至N端。在另一實施例中，包括1至10個連接至C端之CTP重複序列且無CTP連接至N端的凝血因子為工程化凝血因子。在另一實施例中，包括至少一個連接至C端之CTP且無CTP連接至N端的凝血因子為工程化凝血因子。在另一實施例中，包括1至10個連接至C端之CTP重複序列且無CTP連接至N端的凝血因子為結合之凝血因子。在另一實施例中，包括至少一個連接至C端之CTP且無CTP連接至N端的凝血因子為結合之凝血因子。

【0146】 在一個實施例中，本文揭示一種CTP修飾的因子IX（FIX）多肽，其由FIX多肽及三個連接至所述CTP修飾的FIX多肽之羧基末端的促性腺激素羧基末端肽（CTP）組成。

【0147】 在另一實施例中，本文所揭示之CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽由FVIIa多肽及五個連接至所述FVIIa之羧基末端的促性腺激素羧基末端肽（CTP）組成。

【0148】 在另一實施例中，凝血因子為包括類似於或等同於FIX、FVII、因子X、蛋白質C或凝血酶原之域組織的域組織之凝血因子。在另

一實施例中，凝血因子以具有N端前肽之前驅物形式合成。在另一實施例中，如本文所用之凝血因子呈不活化的酶原形式。在另一實施例中，凝血因子在肝細胞中製造。在另一實施例中，凝血因子包括用於將麩胺酸（Glu）轉化成γ羧基麩胺酸（Gla）之γ羧化酶的對接位點。在另一實施例中，如本文所用之凝血因子為市售凝血因子。

【0149】 在一個實施例中，編碼因子VII之核酸序列包括以下核酸序列：ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttct

gcttgggcttcagggctgcctggctgcagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcacc

ggcgccggcgcgccaacgcgttcctggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaag

gaggagcagtgctccttcgaggaggcccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttct

ggatttcttacagtgatggggaccagtgtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggacc

agctccagtcctatatctgcttctgcctccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatg

accagctgatctgtgtgaacgagaacggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaa

gcgctcctgtcggtgccacgaggggtactctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttg

aatatccatgtggaaaaatacctattctagaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgg

ggggcaaggtgtgccccaaaggggagtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgt

gtgggggaccctgatcaacaccatctgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaact

ggaggaacctgatcgcggtgctgggcgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagc

cggcgggtggcgcaggtcatcatccccagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcg

ctgctccgcctgcaccagcccgtggtcctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacg

ttctctgagaggacgctggccttcgtgcgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgt

ggcgccacggccctggagctcatggtcctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagc

agtcacggaaggtgggagactccccaaatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggca

gcaaggactcctgcaaggggacagtggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacc tgacgggcatcgtcagctggggccagggctgcgcaaccgtgggccactttggggtgtacaccagggt ctcccagtacatcgagtggctgcaaaagctcatgcgctcagagccacgcccaggagtcctcctgcgag ccccatttccctgaggatgcggccgc（SEQ ID NO: 30）。

【0150】 在另一實施例中，因子VII之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHG VLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDD QLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYP CGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGT LINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQV IIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVR FSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNI TEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGC ATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP（SEQ ID NO: 31）。

【0151】 在另一實施例中，因子VII之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHG VLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLF WISYSDGDQCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDD QLICVNENGGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYP CGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGT LINTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQV

IIPSTYVPGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVR
FSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNI
TEYMFCAGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGC
ATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP*GCGR
（SEQ ID NO: 32）。

【0152】 在另一實施例中，編碼因子VII-CTP（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctg
cagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct
ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggc
ccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagt
gtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcct
ccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaac
ggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggt
actctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattct
agaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggggcaaggtgtgccccaaagggga
gtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggggaccctgatcaacaccatc
tgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggg
cgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtc
ctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtg
cgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggt
cctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccca

aatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggggacag

tggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacc

tgaccggcatcgtgagctggggccagggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggt

gtcccagtacatcgagtggctgcagaaactgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgaga

gccccttccccagcagcagctccaaggcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgg

gcccagcgacacccccatcctgccccagtgaggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 33）。

【0153】 在另一實施例中，因子VII-CTP（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEEL

RPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQ

NGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS

DHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQ

GRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFD

KIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIA

LLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRG

ATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSK

DSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQ

YIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL

PQ*（SEQ ID NO: 34）。

【0154】 在另一實施例中，編碼因子VII-CTP-CTP（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctg

cagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct

ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggc
ccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagt
gtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcct
ccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaac
ggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggt
actctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattct
agaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaaggtgtgccccaaagggga
gtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggacccctgatcaacaccatc
tgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggg
cgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtc
ctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtg
cgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggt
cctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccca
aatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggggacag
tggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccag
ggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgagtggctgcagaa
actgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagccccttccccagcagcagctccaag
gcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggccctccgacacaccaatcctgccaca
gagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgccaggcccctctgacac
ccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 35）。

【0155】 在另一實施例中，因子VII-CTP-CTP（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEEL
RPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQ
NGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS
DHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQ
GRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFD
KIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIA
LLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRG
ATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSK
DSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 36）。

【0156】 在一個實施例中，因子VII-CTP-CTP-CTP為活化的因子VII-CTP-CTP-CTP（FVIIa-CTP-CTP-CTP）。

【0157】 在另一實施例中，編碼因子VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctg
cagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct
ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggc
ccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagt
gtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcct
ccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaac
ggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggt
actctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattct

agaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaaggtgtgccccaaagggga
gtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggaccctgatcaacaccatc
tgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggg
cgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtc
ctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtg
cgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggt
cctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccca
aatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggacag
tggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccag
ggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgagtggctgcagaa
actgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagccccttccccagcagcagctccaag
gcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctca
gtccagctccagcaaggccccacccctagcctgccttctccttctcggctgcctggccccagcgatac
tccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatcccccagcagactgcca
ggcccttctgatacacccatcctcccacagtgatgaggatccgcggccgcttaattaa（SEQ ID NO: 37）。

【0158】 在另一實施例中，因子VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：
MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEEL
RPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQ
NGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS
DHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQ

GRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAHCFD
KIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIA
LLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRG
ATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYSDGSK
DSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQ
YIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQ（SEQ ID NO: 38）。

【0159】 在一個實施例中，在表現之後，分泌成熟CTP修飾的FVII多肽，信號肽已自前驅蛋白裂解，得到成熟蛋白。舉例而言，在闡述在SEQ ID NO: 38中之前驅物CTP修飾的FVII多肽中，胺基酸1-38：MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRR（SEQ ID NO: 110）表示前驅物CTP修飾的FVII多肽之信號肽，且胺基酸：ANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGD
QCASSPCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNEN
GGCEQYCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILE
KRNASKPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWV
VSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYV
PGTTNHDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSG
WGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFC
AGYSDGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHF
GVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSR
LPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLP

SPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 111）表示缺乏信號肽之成熟工程化CTP修飾的FVII多肽。在一個實施例中，無信號肽之CTP修飾的FVII之胺基酸序列闡述在SEQ ID NO: 111中。在另一實施例中，無信號肽之活化的CTP修飾的FVII之胺基酸序列闡述在SEQ ID NO: 111中。在另一實施例中，CTP修飾的FVII之信號肽闡述在SEQ ID NO: 110中。

【0160】 在另一實施例中，活化的因子VII-CTP-CTP-CTP（連接至羧基末端）（FVIIa-CTP3）之胺基酸序列缺乏信號肽且包括如SEQ ID NO: 111中提出之胺基酸序列。類似地，雖然術語MOD-5014與術語FVIIa-CTP3可互換，亦即，表示CTP修飾的凝血因子之活性形式，但在某些例子中，術語MOD-5014可以用於表示FVII之活性形式或編碼FVII-CTP3之核苷酸序列，其接著將自細胞表現並分泌，且在活體外純化並活化，得到存在於MOD-5014分子中之FVIIa之活性形式。

【0161】 在另一實施例中，編碼因子VII-$(CTP)_4$（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctg
cagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct
ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggc
ccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagt
gtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcct
ccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaac
ggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggt
actctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattct
agaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggcaaggtgtgccccaaagggga

gtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggggaccctgatcaacaccatc

tgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggg

cgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc

cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtc

ctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtg

cgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggt

cctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccca

aatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggggacag

tggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccag

ggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgagtggctgcagaa

actgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagccccttccccagcagcagctccaag

gcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctca

gtccagctccagcaaggccccacccccctagcctgccttctccttctcggctgcctggccccagcgatac

tccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatcccccagcagactgcca

ggcccttctgatacacccatcctcccacagtgatgaggatccgc（SEQ ID NO: 39）。

【0162】 在另一實施例中，因子VII-$(CTP)_4$（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFL

EELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASS

PCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQ

YCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNAS

KPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH

CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN

HDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQL
LDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYS
DGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYT
RVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRL
PGPSDTPILPQG（SEQ ID NO: 40）。

【0163】 在另一實施例中，編碼因子VII-$(CTP)_5$（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctcgaggacatggtctcccaggccctcaggctcctctgccttctgcttgggcttcagggctgcctggctg
cagtcttcgtaacccaggaggaagcccacggcgtcctgcaccggcgccggcgcgccaacgcgttcct
ggaggagctgcggccgggctccctggagagggagtgcaaggaggagcagtgctccttcgaggaggc
ccgggagatcttcaaggacgcggagaggacgaagctgttctggatttcttacagtgatggggaccagt
gtgcctcaagtccatgccagaatgggggctcctgcaaggaccagctccagtcctatatctgcttctgcct
ccctgccttcgagggccggaactgtgagacgcacaaggatgaccagctgatctgtgtgaacgagaac
ggcggctgtgagcagtactgcagtgaccacacgggcaccaagcgctcctgtcggtgccacgaggggt
actctctgctggcagacggggtgtcctgcacacccacagttgaatatccatgtggaaaaatacctattct
agaaaaaagaaatgccagcaaaccccaaggccgaattgtgggggggcaaggtgtgccccaaagggga
gtgtccatggcaggtcctgttgttggtgaatggagctcagttgtgtgggggggaccctgatcaacaccatc
tgggtggtctccgcggcccactgtttcgacaaaatcaagaactggaggaacctgatcgcggtgctggg
cgagcacgacctcagcgagcacgacggggatgagcagagccggcgggtggcgcaggtcatcatccc
cagcacgtacgtcccgggcaccaccaaccacgacatcgcgctgctccgcctgcaccagcccgtggtc
ctcactgaccatgtggtgcccctctgcctgcccgaacggacgttctctgagaggacgctggccttcgtg
cgcttctcattggtcagcggctggggccagctgctggaccgtggcgccacggccctggagctcatggt

cctcaacgtgccccggctgatgacccaggactgcctgcagcagtcacggaaggtgggagactcccca
aatatcacggagtacatgttctgtgccggctactcggatggcagcaaggactcctgcaaggggacag
tggaggcccacatgccacccactaccggggcacgtggtacctgaccggcatcgtgagctggggccag
ggctgcgccaccgtgggccacttcggcgtgtacaccagggtgtcccagtacatcgagtggctgcagaa
actgatgagaagcgagcccagacccggcgtgctgctgagagccccttccccagcagcagctccaag
gcccctcccctagcctgcccagccctagcagactgcctgggccctctgacacccctatcctgcctcag
tccagctcctctaaggctccaccaccttccctgcctagcccttcaagactgccaggccctagcgatacac
caattctgccccagtcctccagcagcaaggctcccccacctagcctgccttctccatcaaggctgcctg
gcccatccgataccccaattttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccccccagtctgccctctcc
aagcagactccctggcccttcagacactccaatcctcccacagtcctctagctctaaagctccacctccc
agcctgcccagccctagtagactccccggaccttctgatacccccatcttgccccagtgatgaggatcc
gc（SEQ ID NO: 41）。

【0164】 在另一實施例中，因子VII-$(CTP)_5$（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

LEDMVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFL
EELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASS
PCQNGGSCKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQ
YCSDHTGTKRSCRCHEGYSLLADGVSCTPTVEYPCGKIPILEKRNAS
KPQGRIVGGKVCPKGECPWQVLLLVNGAQLCGGTLINTIWVVSAAH
CFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTN
HDIALLRLHQPVVLTDHVVPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQL
LDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSPNITEYMFCAGYS
DGSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYT

RVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRL
PGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQGS（SEQ ID NO: 42）。

【0165】 在另一實施例中，編碼因子IX之核酸序列包括以下核酸序列：gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatca
ccaggcctcatcaccattgccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaa
cgccaacaaaattctgaatcggccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaac
cttgagagagaatgtatggaagaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaa
gaacaactgaattttggaagcagtatgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggc
agttgcaaggatgacattaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaatta
gatgtaacatgtaacattaagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtgg
tttgctcctgtactgagggatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttcc
atgtggaagagtttctgtttcacaaacttctaagctcacccgtgctgagactgtttttcctgatgtggactat
gtaaattctactgaagctgaaaccattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcact
cgagttgttggtggagaagatgccaaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttga
tgcattctgtggaggctctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgt
taaaattacagttgtcgcaggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgt
gattcgaattattcctcaccacaactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctgga
actggacgaacccttagtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaac
atcttcctcaaatttggatctggctatgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagcttt
agttctccagtaccttagagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctat
aacaacatgttctgtgctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccc

catgttactgaagtggaagggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatga
aaggcaaatatggaatatataccaaggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctca
cttgaacgcggccgc（SEQ ID NO: 43）。

【0166】 在另一實施例中，因子IX之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVF
LDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVF
ENTERTTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFE
GKNCELDVTCNIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSC
EPAVPFPCGRVSVSQTSKLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQST
QSFNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVT
AAHCVETGVKITVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKY
NHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVF
HKGRSALVLQYLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDS
CQGDSGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVN
WIKEKTKLT（SEQ ID NO: 44）。

【0167】 在另一實施例中，編碼因子IX-CTP（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：
gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgcctttta
ggatatctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcggcca
aagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgtatggaagaa
aagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagt
atgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcc
tatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaat

ggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtggtttgctcctgtactgagggatatc
gacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcaca
aacttctaagctcacccgtgctgagactgtttttcctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaac
cattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgagttgttggtggagaagatgc
caaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgt
taatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcgcaggtg
aacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaa
ctacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaa
acagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaacatcttcctcaaatttggatctggct
atgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagctttagttcttcagtaccttagagttcca
cttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttc
catgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtggaagggac
cagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaatatatacca
aggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctcactagctccagcagcaaggcccctc
ccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagtgatga
aggtctggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 45）。

【0168】 在另一實施例中，因子IX-CTP（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：
MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRY
NSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVD
GDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGR
CEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTS
KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAK

PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAG
EHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNS
YVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPL
VDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTS
FLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPS
LPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 46）。

【0169】 在另一實施例中，編碼因子IX-CTP-CTP之核酸序列（連接至羧基末端）包括以下核酸序列：

gcgatcgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatctgcctttta
ggatatctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaatcggcca
aagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgtatggaagaa
aagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttggaagcagt
atgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacattaattcc
tatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacattaagaat
ggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtggtttgctcctgtactgagggatatc
gacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtttcaca
aacttctaagctcacccgtgctgagactgtttttcctgatgtggactatgtaaattctactgaagctgaaac
cattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgagttgttggtggagaagatgc
caaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggctctatcgt
taatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcgcaggtg
aacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctcaccacaa
ctacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttagtgctaa
acagctacgttacacctatttgcattgctacaaggaatacacgaacatcttcctcaaatttggatctggcta

tgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagctttagttcttcagtaccttagagttccac
ttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtgctggcttcc
atgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtggaagggacc
agtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaatatataccaa
ggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctcactagctccagcagcaaggcccctcc
cccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagc
tcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcc
tgcctcagtgatgaaggtctggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 47）。

【0170】 在另一實施例中，因子IX-CTP-CTP（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：
MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRY
NSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVD
GDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGR
CEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTS
KLTRAETVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAK
PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAG
EHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNS
YVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPL
VDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTS
FLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPS
LPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 48）。

【0171】 在另一實施例中，編碼因子IX-$(CTP)_3$（連接至羧基末端）

之核酸序列包括以下核酸序列：

tctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatc

tgccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctga

atcggccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgtat

ggaagaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttgg

aagcagtatgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgaca

ttaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacat

taagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtggtttgctcctgtactgag

ggatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctg

tttcacaaacttctaagctcacccgtgctgaggcagtttttcctgatgtggactatgtaaattctactgaagc

tgaaaccattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgagttgttggtggaga

agatgccaaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggct

ctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcg

caggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctca

ccacaactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttа

gtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaacatcttcctcaaatttgg

atctggctatgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagctttagttcttcagtacctta

gagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtg

ctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtgg

aagggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaat

atataccaaggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctcactagctccagcagcaa

ggcccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggcccagtgacacccctatcctgcctc

agtccagctccagcaaggccccacccccctagcctgccttctccttctcggctgcctggccccagcgata

ctccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccctccatctctgccatcccccagcagactgcc aggcccttctgatacacccatcctcccacagtgatgaggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 49）。

【0172】 在另一實施例中，因子IX-$(CTP)_3$（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRY NSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYVD GDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNGR CEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTS KLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDAK PGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVAG EHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNS YVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRVPL VDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEGTS FLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPS LPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSK APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 50）。

【0173】 在一個實施例中，在表現之後，分泌成熟CTP修飾的FIX多肽，信號肽已自前驅蛋白裂解，得到成熟蛋白。舉例而言，在闡述在SEQ ID NO: 50中之前驅物CTP修飾的FIX多肽中，胺基酸：1-46：MQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKR（SEQ ID NO: 112）表示前驅物CTP修飾的FIX多肽之信號肽，且胺基酸：YNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWKQYV

DGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNIKNG
RCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT
SKLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGGEDA
KPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKITVVA
GEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVL
NSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQYLRV
PLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTEVEG
TSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPP
PSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 113）表示缺乏信號肽之成熟工程化CTP修飾的FIX多肽。在一個實施例中，無信號肽之CTP修飾的FIX之胺基酸序列闡述在SEQ ID NO: 113中。在另一實施例中，CTP修飾的FIX之信號肽闡述在SEQ ID NO: 112中。

【0174】 在另一實施例中，編碼因子IX-$(CTP)_4$（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

tctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatc
tgccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctga
atcggccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgtat
ggaagaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttgg
aagcagtatgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgaca
ttaattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacat
taagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtggtttgctcctgtactgag
ggatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctg

tttcacaaacttctaagctcacccgtgctgaggcagtttttcctgatgtggactatgtaaattctactgaagc
tgaaaccattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgagttgttggtggaga
agatgccaaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggct
ctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcg
caggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctca
ccacaactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttа
gtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaacatcttcctcaaatttgg
atctggctatgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagctttagttcttcagtaccttа
gagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtg
ctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggacccccatgttactgaagtgg
aagggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaat
atataccaaggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctcactagctccagcagcaa
ggcccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctctgacacccctatcctgcctc
agtccagctcctctaaggccccaccaccttccctgcctagcccttcaagactgccaggccctagcgata
caccaattctgccccagtcctccagcagcaaggctcccccacctagcctgccttctccatcaaggctgc
ctggcccatccgataccccaattttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccccccagtctgccctc
tccaagcagactccctggcccttcagacactcccattctgccacagtgatgaggatccgcggccgc
（SEQ ID NO: 51）。

【0175】 在另一實施例中，因子IX-(CTP)$_4$（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：
SRVDPAMQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKIL
NRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFW
KQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTC

NIKNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRV
SVSQTSKLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVG
GEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKI
TVVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDE
PLVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQ
YLRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHV
TEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSS
SSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL
PQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPS
DTPILPQGSAA（SEQ ID NO: 52）。

【0176】 在另一實施例中，編碼因子IX-$(CTP)_5$（連接至羧基末端）之核酸序列包括以下核酸序列：

ctagagtcgaccccgccatgcagcgcgtgaacatgatcatggcagaatcaccaggcctcatcaccatct
gccttttaggatatctactcagtgctgaatgtacagtttttcttgatcatgaaaacgccaacaaaattctgaa
tcggccaaagaggtataattcaggtaaattggaagagtttgttcaagggaaccttgagagagaatgtatg
gaagaaaagtgtagttttgaagaagcacgagaagtttttgaaaacactgaaagaacaactgaattttgga
agcagtatgttgatggagatcagtgtgagtccaatccatgtttaaatggcggcagttgcaaggatgacat
taattcctatgaatgttggtgtccctttggatttgaaggaaagaactgtgaattagatgtaacatgtaacatt
aagaatggcagatgcgagcagttttgtaaaaatagtgctgataacaaggtggtttgctcctgtactgagg
gatatcgacttgcagaaaaccagaagtcctgtgaaccagcagtgccatttccatgtggaagagtttctgtt
tcacaaacttctaagctcacccgtgctgaggcagtttttcctgatgtggactatgtaaattctactgaagct
gaaaccattttggataacatcactcaaagcacccaatcatttaatgacttcactcgagttgttggtggaga
agatgccaaaccaggtcaattcccttggcaggttgttttgaatggtaaagttgatgcattctgtggaggct

ctatcgttaatgaaaaatggattgtaactgctgcccactgtgttgaaactggtgttaaaattacagttgtcg
caggtgaacataatattgaggagacagaacatacagagcaaaagcgaaatgtgattcgaattattcctca
ccacaactacaatgcagctattaataagtacaaccatgacattgcccttctggaactggacgaacccttа
gtgctaaacagctacgttacacctatttgcattgctgacaaggaatacacgaacatcttcctcaaatttgg
atctggctatgtaagtggctggggaagagtcttccacaaagggagatcagctttagttcttcagtaccttа
gagttccacttgttgaccgagccacatgtcttcgatctacaaagttcaccatctataacaacatgttctgtg
ctggcttccatgaaggaggtagagattcatgtcaaggagatagtgggggaccccatgttactgaagtgg
aagggaccagtttcttaactggaattattagctggggtgaagagtgtgcaatgaaaggcaaatatggaat
atataccaaggtatcccggtatgtcaactggattaaggaaaaaacaaagctcactagctccagcagcaa
ggcccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgggccctctgacacccctatcctgcctc
agtccagctcctctaaggctccaccaccttccctgcctagcccttcaagactgccaggccctagcgatac
accaattctgccccagtcctccagcagcaaggctcccccacctagcctgccttctccatcaaggctgcct
ggcccatccgataccccaattttgcctcagagcagctctagcaaggcacctccccccagtctgccctctc
caagcagactccctggcccttcagacactccaatcctcccacagtcctctagctctaaagctccacctcc
cagcctgcccagccctagtagactccccggaccttctgatacccccatcttgccccagtgatgaggatc
cgcggccgc（SEQ ID NO: 53）。

【0177】 在另一實施例中，因子IX-$(CTP)_5$（連接至羧基末端）之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：
RVDPAMQRVNMIMAESPGLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILN
RPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEKCSFEEAREVFENTERTTEFWK
QYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTCNI
KNGRCEQFCKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVS
VSQTSKLTRAEAVFPDVDYVNSTEAETILDNITQSTQSFNDFTRVVGG

EDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIVTAAHCVETGVKIT VVAGEHNIEETEHTEQKRNVIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEP LVLNSYVTPICIADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFHKGRSALVLQY LRVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSGGPHVTE VEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVSRYVNWIKEKTKLTSSSS KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILP QSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSD TPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQGSAA（SEQ ID NO: 54）。

【0178】 熟練的業內人士將瞭解，術語凝血因子可涵蓋已知凝血因子之同系物。在一個實施例中，同系物具有凝血活性。在另一實施例中，凝血因子之同系物為包括保守取代、或並不顯著改變凝血因子之三維結構之缺失、插入或取代的變異體。在另一實施例中，缺失、插入或取代不改變凝血因子之相關功能，所述凝血因子在一個實施例中結合於具體結合搭配物。在另一實施例中，本文揭示具有功能結合之凝血因子之同系物。

【0179】 在另一實施例中，將弗林蛋白酶添加至表現本文所揭示之凝血因子-CTP之細胞中。在另一實施例中，弗林蛋白酶增加本文所揭示之凝血因子-CTP在細胞中之製造效率。在另一實施例中，弗林蛋白酶與包括本文所揭示之凝血因子-CTP之編碼序列的載體共轉染。在另一實施例中，弗林蛋白酶由單獨載體編碼。在另一實施例中，弗林蛋白酶及凝血因子-CTP由一個載體編碼。在另一實施例中，弗林蛋白酶之編碼序列插入至pCI-DHFR中。在另一實施例中，弗林蛋白酶之編碼序列在pCI-dhfr/smaI+NotI、弗林蛋白酶/AsisI F.I.+NotI中經工程化。

【0180】 在另一實施例中，編碼弗林蛋白酶之核酸序列包括以下核酸序列：tctagagtcgaccccgccatggagctgaggccctggttgcta

tgggtggtagcagcaacaggaaccttggtcctgctagcagctgatgctcagggccagaaggtcttcac

caacacgtgggctgtgcgcatccctggaggcccagcggtggccaacagtgtggcacggaagcatgg

gttcctcaacctgggccagatcttcggggactattaccacttctggcatcgaggagtgacgaagcggtc

cctgtcgcctcaccgcccgcggcacagccggctgcagagggagcctcaagtacagtggctggaaca

gcaggtggcaaagcgacggactaaacgggacgtgtaccaggagcccacagaccccaagtttcctcag

cagtggtacctgtctggtgtcactcagcgggacctgaatgtgaaggcggcctgggcgcagggctacac

agggcacggcattgtggtctccattctggacgatggcatcgagaagaaccacccggacttggcaggca

attatgatcctggggccagttttgatgtcaatgaccaggaccctgacccccagcctcggtacacacagat

gaatgacaacaggcacggcacacggtgtgcgggggaagtggctgcggtggccaacaacggtgtctgt

ggtgtaggtgtggcctacaacgcccgcattggaggggtgcgcatgctggatggcgaggtgacagatg

cagtggaggcacgctcgctgggcctgaaccccaaccacatccacatctacagtgccagctggggccc

cgaggatgacggcaagacagtggatgggccagcccgcctcgccgaggaggccttcttccgtggggtt

agccagggccgaggggggctgggctccatctttgtctgggcctcggggaacgggggccgggaacat

gacagctgcaactgcgacggctacaccaacagtatctacacgctgtccatcagcagcgccacgcagttt

ggcaacgtgccgtggtacagcgaggcctgctcgtccacactggccacgacctacagcagtggcaacc

agaatgagaagcagatcgtgacgactgacttgcggcagaagtgcacggagtctcacacgggcacctc

agcctctgccccttagcagccggcatcattgctctcaccctggaggccaataagaacctcacatggcg

ggacatgcaacacctggtggtacagacctcgaagccagcccacctcaatgccaacgactgggccacc

aatggtgtgggccggaaagtgagccactcatatggctacgggcttttggacgcaggcgccatggtggc

cctggcccagaattggaccacagtggcccccccagcggaagtgcatcatcgacatcctcaccgagccc

aaagacatcgggaaacggctcgaggtgcggaagaccgtgaccgcgtgcctgggcgagcccaaccac

atcactcggctggagcacgctcaggcgcggctcaccctgtcctataatcgccgtggcgacctggccat
ccacctggtcagccccatgggcacccgctccaccctgctggcagccaggccacatgactactccgca
gatgggtttaatgactgggccttcatgacaactcattcctgggatgaggatccctctggcgagtgggtcc
tagagattgaaaacaccagcgaagccaacaactatgggacgctgaccaagttcaccctcgtactctatg
gcaccgcccctgaggggctgcccgtacctccagaaagcagtggctgcaagaccctcacgtccagtca
ggcctgtgtggtgtgcgaggaaggcttctccctgcaccagaagagctgtgtccagcactgccctccag
gcttcgcccccccaagtcctcgatacgcactatagcaccgagaatgacgtggagaccatccgggccagc
gtctgcgcccccctgccacgcctcatgtgccacatgccaggggccggccctgacagactgcctcagctg
ccccagccacgcctccttggaccctgtggagcagacttgctcccggcaaagccagagcagccgagag
tccccgccacagcagcagccacctcggctgcccccggaggtggaggcggggcaacggctgcgggc
agggctgctgccctcacacctgcctgaggtggtggccggcctcagctgcgccttcatcgtgctggtctt
cgtcactgtcttcctggtcctgcagctgcgctctggctttagttttcgggggggtgaaggtgtacaccatgg
accgtggcctcatctcctacaaggggctgccccctgaagcctggcaggaggagtgcccgtctgactca
gaagaggacgagggccggggcgagaggaccgcctttatcaaagaccagagcgccctctgaacgcgg
ccgc（SEQ ID NO: 55）。在另一實施例中，弗林蛋白酶之胺基酸序列包括以下胺基酸序列：

MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVA
NSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQ
VQWLEQQVAKRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAA
WAQGYTGHGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQDPDPQ
PRYTQMNDNRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNARIGGVRML
DGEVTDAVEARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPARLAEEAF
FRGVSQGRGGLGSIFVWASGNGGREHDSCNCDGYTNSIYTLSISSAT

QFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTS
ASAPLAAGIIALTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATN
GVGRKVSHSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVAPQRKCIIDILTEPKDI
GKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSP
MGTRSTLLAARPHDYSADGFNDWAFMTTHSWDEDPSGEWVLEIENT
SEANNYGTLTKFTLVLYGTAPEGLPVPPESSGCKTLTSSQACVVCEE
GFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASC
ATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQQPPRLPP
EVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSF
RGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQEECPSDSEEDEGRGERTAFIKDQ
SAL（SEQ ID NO: 56）。

【0181】 在另一實施例中，本文揭示弗林蛋白酶之同系物。在另一實施例中，本文揭示維持相關功能之弗林蛋白酶之同系物，其在一個實施例中為前驅蛋白之裂解物。在另一實施例中，同系物，例如與弗林蛋白酶至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源之多肽，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。

【0182】 在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的一至十個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的一至三個促性腺激素羧基末端肽（CTP）。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的一至五個促性腺激素羧基末端

肽（CTP）。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括在其羧基末端上具有至少一個CTP的凝血因子。

【0183】 在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的一至五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的一至五個CTP組成。

【0184】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的兩個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至三個CTP、連接至凝血之羧基末端的兩至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的兩至十個CTP。

【0185】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的三個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的三至十個CTP。

【0186】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至八個

CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至九個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至十個CTP。

【0187】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至九個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至十個CTP。

【0188】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的兩個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至三個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至九個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至十個CTP。

【0189】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的三個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的三至十個CTP。

【0190】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的四個CTP、連接至凝血因子

之羧基末端的四至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的四至十個CTP。

【0191】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的五至十個CTP。

【0192】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的兩個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至三個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的兩至九個CTP或連接至凝血因子之羧基末端的兩至十個CTP。

【0193】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的三個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的三至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的三至十個CTP。

【0194】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的四個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的四至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的四至十個CTP。

【0195】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：凝血因子及連接至凝血因子之羧基末端的五個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至六個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至七個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至八個CTP、連接至凝血因子之羧基末端的五至九個CTP、或連接至凝血因子之羧基末端的五至十個CTP。

【0196】 在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上不具有CTP之凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上缺乏CTP之凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其羧基末端上具有至少一個CTP且在其胺基末端上無CTP之凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：如本文中所述在其羧基末端上具有CTP數目且在其胺基末端上無CTP之凝血因子。

【0197】 在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之組合物，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子IX（FIX）多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個CTP組

成。

【0198】 在另一實施例中，本文揭示一種編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由活化因子VIIa（FVIIa）多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個CTP組成。

【0199】 在一個實施例中，本文揭示一種如本文中所述之重組凝血因子。在一個實施例中，本文揭示一種如本文中所述之工程化凝血因子。熟練的業內人士將瞭解，術語「工程化凝血因子」可涵蓋CTP修飾的凝血因子。

【0200】 在一個實施例中，連接至凝血因子之羧基末端的CTP串聯連接至羧基末端。

【0201】 在一個實施例中，如本文中所述之工程化凝血因子與非CTP修飾的凝血因子相比具有等效或改進的生物活性。在另一實施例中，如本文中所述之工程化凝血因子與非CTP修飾的凝血因子相比具有等效或改進的藥理學量測值。在另一實施例中，如本文中所述之工程化凝血因子與非CTP修飾的凝血因子相比具有等效或改進的藥物動力學。在另一實施例中，如本文中所述之工程化凝血因子與非CTP修飾的凝血因子相比具有等效或改進的藥效學。

【0202】 在一個實施例中，本文揭示一種預防或治療凝血或凝血病症之方法。在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防並治療個體之血友病之方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之血友病之方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的因子VII。

【0203】 在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括投予如SEQ ID NO: 111中所闡述之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防並治療個體之血友病之方法，其包括投予如SEQ ID NO: 111中所闡述之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括投予如SEQ ID NO: 113中所闡述之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防並治療個體之血友病之方法，其包括投予如SEQ ID NO: 113中所闡述之CTP修飾的凝血因子。

【0204】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之血友病之方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的因子IX。在一個實施例中，血友病為B型血友病。在一個實施例中，B型血友病稱為因子IX缺陷或克氏病（Christmas disease）。在一個實施例中，血友病為重度血友病，其在一個實施例中描述其中凝血因子含量為0-1%之血友病。在另一實施例中，血友病為中度血友病，其在一個實施例中描述其中凝血因子含量為1-5%之血友病。在另一實施例中，血友病為輕度血友病，其在一個實施例中描述其中凝血因子含量為5-50%之血友病。

【0205】 在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之凝血或凝血病症之方法，其包括向所述個體投予包括FIX多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）多肽，從而預防或治療所述個體之凝血或凝血病症。在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之凝血或凝血病症之方法，其包括向所述個體投予包括FVIIa多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的活化CTP修飾的因子VII（FVIIa）多肽，從而預防或治療所述個體之凝血或凝血病

症。

【0206】 在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予包括FIX多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予包括FVIIa多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的活化CTP修飾的因子（FVIIa）多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。

【0207】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予如本文中所述之一種或多種CTP修飾的凝血因子。因此，在一個實施例中，本文揭示一種治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予包括FIX多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）多肽及包括活化FVII（FVIIa）多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的活化CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽，從而治療所述個體之血友病。在一個實施例中，CTP修飾的FIX及活化CTP修飾的FVIIa在同一組合物中同時投予。在另一實施例中，CTP修飾的FIX及活化CTP修飾的FVIIa在各別組合物中同時投予。在另一實施例中，CTP修飾的FIX及活化CTP修飾的FVIIa在各別組合物中在不同時間下投予。

【0208】 在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予包括FIX或FVII多肽及連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）或CTP修飾的因子VII多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。在另一實

施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體投予包括FIX或FVII多肽及連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的四個絨膜CTP、連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的五個絨膜CTP、連接至所述FIX或所述FVII之羧基末端的三至五個絨膜CTP、連接至所述FIX及所述FVII之羧基末端的三個絨膜CTP、或連接至所述FIX及所述FVII多肽之羧基末端的三至五個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）或CTP修飾的因子VII多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。

【0209】 在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體皮下或靜脈內投予包括FIX或FVII多肽及連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的三個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）或CTP修飾的因子VII多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。在另一實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，其包括向所述個體皮下或靜脈內投予包括FIX或FVII多肽及連接至所述FIX或所述FVII之羧基末端的四個絨膜CTP、連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的五個絨膜CTP、連接至所述FIX或所述FVII多肽之羧基末端的三至五個絨膜CTP、連接至所述FIX及所述FVII多肽之羧基末端的三個絨膜CTP、或連接至所述FIX及所述FVII多肽之羧基末端的三至五個絨膜CTP的CTP修飾的因子IX（FIX）或CTP修飾的因子VII多肽，從而預防或治療所述個體之血友病。

【0210】 在一些實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，所述方法包括以下步驟：向所述個體投予包括連接至所述凝血因子多肽之羧基末端的三至五個絨膜CTP的CTP修飾的凝血因子，其中所述CTP修飾的凝血因子之序列選自由以下各者組成之群：SEQ ID NO: 38、

40、42、111或113，從而預防所述個體之血友病。

【0211】 在一些實施例中，本文揭示一種預防或治療個體之血友病之方法，所述方法包括以下步驟：向所述個體皮下投予包括連接至所述FVII多肽之羧基末端的三至五個絨膜CTP的CTP修飾的因子VII，其中所述CTP修飾的FVII之序列選自由以下各者組成之群：SEQ ID NO: 38、40、42、111或113，從而預防所述個體之血友病。

【0212】 在其他實施例中，工程化凝血因子用於治療B型血友病患者。在一個實施例中，包括其羧基末端中之3個串聯CTP之凝血因子IX用於治療B型血友病患者。在另一實施例中，包括其羧基末端中之4個串聯CTP、其羧基中之5個串聯CTP、其羧基末端中之2個串聯CTP或其羧基末端中之1個CTP重複序列的凝血因子IX用於治療B型血友病患者。在其他實施例中，工程化凝血因子可減少患者所需的輸注次數、減少患者所需劑量或其組合。

【0213】 在一個實施例中，包括其羧基末端中之3個串聯CTP的凝血因子IX相對於FIX-CTP-CTP收集物、FIX-CTP收集物或rhFIX展現出改進的PK特徵曲線，同時維持其凝血活性。在一個實施例中，在大鼠及FIX缺陷型小鼠中，rFIX-CTP3之消除半衰期與rFIX相比長2.5至4倍。在一個實施例中，投予rFIX-CTP3顯著延長FIX缺陷型小鼠中之促凝血作用持續給藥後至少76小時。在一個實施例中，投予rFIX-CTP3與rFIX相比在FIX缺陷型小鼠中產生較高活性峰值。在另一實施例中，包括其羧基末端中之2個串聯CTP的凝血因子IX相對於FIX-CTP收集物或rhFIX展現出改進的PK特徵曲線，同時維持其凝血活性。在另一實施例中，包括其羧基末端中之2個串聯CTP的凝血因子IX與rhFIX相比展現出半衰期增加3倍且AUC高

4.5倍。

【0214】 在另一實施例中，與重組FVII相比，皮下（SC）投予引起CTP修飾的FVII之較高生物可用性。在另一實施例中，當與SC投予NovoSeven®相比時，在FVII-CTP3及5 SC投予之後半衰期較長，且生物可用性（AUC SC/AUC IV）較高。在另一實施例中，皮下注射MOD-5014及MOD-5019展示出與重組FVII（NovoSeven®）相比改進的小鼠存活率（參見以下實例8）。

【0215】 在另一實施例中，信號肽連接至CTP修飾的凝血因子之胺基末端，如US 7,553,940中所述，其以全文引用的方式併入本文中。在另一實施例中，信號肽自本文揭示之CTP修飾的凝血因子之胺基末端裂解。

【0216】 熟練的業內人士將瞭解，術語工程化凝血因子可涵蓋缺乏信號肽之成熟凝血因子之胺基酸序列。在一個實施例中，工程化凝血因子之成熟形式不包含信號肽。在另一實施例中，CTP修飾的凝血因子之成熟形式不包含信號肽。在其他實施例中，術語工程化凝血因子包括包含其信號序列或信號肽之凝血因子之胺基酸序列。

【0217】 在另一實施例中，包括至少一個如本文中所述之CTP的工程化凝血因子與不具有至少一個CTP之相同凝血因子相比具有增強的活體內生物活性。在一個實施例中，增強的生物活性源自工程化凝血因子在維持至少一些生物活性同時之較長半衰期。在另一實施例中，增強的生物活性源自由CTP修飾產生之增強的生物活性。在另一實施例中，增強的生物活性源自CTP修飾的凝血因子之較長半衰期及增強的功能性兩者。

【0218】 在一些實施例中，凝血因子之羧基末端處的至少一個CTP序列提供針對凝血因子之降解的增強的保護。在一些實施例中，凝血因子

之羧基末端處的至少一個CTP序列提供針對清除之增強的保護。在一些實施例中，凝血因子之羧基末端處的至少一個CTP序列提供延長的清除時間。在一些實施例中，凝血因子之羧基末端處的至少一個CTP序列增強其Cmax。在一些實施例中，凝血因子之羧基末端處的至少一個CTP序列增強其Tmax。在一些實施例中，凝血因子之羧基末端處的至少一個CTP序列延長其T½。

【0219】 在另一實施例中，本文揭示之結合之凝血因子以與未經修飾之結合之凝血因子相同的方式使用。在另一實施例中，本文揭示之結合之凝血因子具有延長的循環半衰期及血漿停留時間、降低的清除率及增加的活體內臨床活性。在另一實施例中，因如本文中所述之結合之凝血因子之改進的特性，此結合物與相同凝血因子之未經修飾之形式相比較不頻繁地投予。

【0220】 在另一實施例中，降低之投予頻率將引起改進的治療策略，其在一個實施例中將引起改進的患者順應性，產生改進的治療結果以及改進的患者生活品質。在另一實施例中，與凝血因子之習知結合物相比，已發現具有本文揭示之結合物之分子量及連接子結構之結合物具有改進的效力、改進的穩定性、升高的AUC水準以及增強的循環半衰期。

【0221】 在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括CTP修飾的因子IX（FIX）多肽，所述多肽由FIX多肽及連接至所述CTP修飾的FIX多肽之羧基末端之三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括CTP修飾的因子IX（FIX）多肽，所述多肽由FIX多肽及連接至所述CTP修飾的FIX多肽之羧基末端的三個CTP組成，如SEQ ID NO: 113中所闡述。

【0222】 在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括活化CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽，所述多肽由FVIIa多肽及連接至所述FVIIa之羧基末端的五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括活化CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽，所述多肽由FVIIa多肽及連接至所述FVIIa之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括活化CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽，所述多肽由FVIIa多肽及連接至羧基末端之三個CTP組成，如SEQ ID NO: 111中所闡述。

【0223】 在另一實施例中，本文揭示一種組合物，其包括如本文中所述之結合之凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括如本文中所述之結合之凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括治療有效量之如本文中所述之結合之凝血因子。在一個實施例中，結合之凝血因子之治療有效量根據諸如以下因素測定：待治療之特定病況、待治療之患者之健康狀況以及組合物中之其他成分。

【0224】 在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患血友病之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於血友病的預防性療法，由此降低出血及相關併發症之風險。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患血友病的個體，同時降低出現針對外源投予之凝血因子的抑制性抗體的風險。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患血友病的個體，由此誘導內穩定。

【0225】 在一個實施例中，本文揭示之CTP修飾的凝血因子具有治療性用途。在另一實施例中，本文揭示之CTP修飾的凝血因子具有預防性

用途。

【0226】 在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療經歷過度出血或瘀傷或具有延長的凝血酶原時間（PT）或部分凝血活酶時間（PTT）之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療具有會引起出血的後天性病況（諸如維生素K缺陷或肝病）之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療具有後天性（歸因於其他疾病）或遺傳性、輕度或重度、永久性或暫時性凝血因子缺陷之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患A型血友病之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患B型血友病之個體。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療具有後天性缺陷的個體，所述後天性缺陷歸因於慢性疾病，諸如肝病或癌症；急性病況，諸如散播性血管內凝血（DIC），其會以很快的速度耗盡凝血因子；或維生素K缺陷或使用維生素K拮抗劑（如華法林（warfarin））之治療（因子II、VII、IX及X之產生需要維生素K）。在另一實施例中，如本文中所述之結合之凝血因子適用於治療罹患其中會引起凝血不平衡之疾病的個體，所述疾病諸如（但不限於）：肝病、尿毒症、癌症、骨髓病症、暴露於蛇毒、維生素K缺陷、抗凝療法、偶然攝入抗凝血劑華法林、多次輸血（血液之儲存單元失去其凝血因子中的一些）或其組合。在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之深靜脈血栓之方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防患有血友病之個體之不受控制出血的方法，其包括投予本文揭示之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種預防患有血友病之個體之出血事件的方法，其包括投予

本文揭示之CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種控制患有B型血友病（先天性因子IX缺陷）之個體之出血事件的方法。

【0227】 在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法用於治療使用FVIII或FIX抑制劑之A型或B型血友病患者及患有後天性血友病之患者的出血事件；預防使用FVIII或FIX抑制劑之A型或B型血友病患者及患有後天性血友病之患者的手術干預或侵入性程序中的出血；治療具有先天性FVII缺陷之患者的出血事件以及預防具有先天性FVII缺陷之患者的手術干預或侵入性程序中的出血。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法用於治療或預防肌肉出血。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法用於治療或預防關節出血。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備流鼻血及牙齦出血、黏膜出血、出血至中樞神經系統中之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備胃腸道或腦出血之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備低頻輕度出血之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備低頻中度出血之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備高頻輕度出血之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備高頻中度出血之治療性或預防性治療。

【0228】 在一個實施例中，本文揭示之組合物及方法製備無征狀血友病之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備輕度至中度血友病之治療性或預防性治療。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備重度血友病之治療性或預防性治療。

【0229】 在一個實施例中，本文揭示之組合物及方法製備出血之治

療性或預防性治療，所述出血在一個實施例中為不可控制的出血，且在另一實施例中為腦內出血。在另一實施例中，本文揭示之組合物及方法製備以下各者之治療性或預防性治療：新生兒凝血病；重度肝臟疾病；高風險手術程序；創傷失血；骨髓移植；血小板減少症及血小板功能病症；口服抗凝藥的緊急逆轉；因子V、VII X及XI之先天性缺陷；或馮威里氏病，在一個實施例中，使用馮威里氏因子抑制劑之馮威里氏病。

【0230】 在一個實施例中，本文揭示之CTP修飾的凝血因子用於治療個體之血友病或如本文中所述之相關疾病。

【0231】 在另一實施例中，如本文中所述之[(CTP)n>1-凝血因子]包括全長凝血因子或其活性片段，其在其羧基末端上經由肽鍵連接於至少一個CTP單元且在其胺基末端上無CTP的。在另一實施例中，如本文中所述之[(CTP)n>1-凝血因子]包括凝血因子或其活性片段，其經由肽鍵連接於至少一個CTP單元，所述至少一個CTP單元經由肽鍵連接於其他CTP單元且在其胺基末端上無CTP。在另一實施例中，一個核酸分子編碼工程化凝血因子，所述工程化凝血因子包括連接至其C端之至少一個CTP且在其胺基末端上無CTP。

【0232】 在另一實施例中，本文揭示一種表現載體，其包括如本文中所述之聚核苷酸分子。在另一實施例中，本文揭示一種表現載體，其包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子IX（FIX）多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種表現載體，其包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子VIIa（FVIIa）多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個CTP組成。

【0233】 在另一實施例中，本文揭示一種細胞，其包括如本文中所述之表現載體。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子IX（FIX）多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子VIIa（FVIIa）多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個CTP組成。

【0234】 在另一實施例中，本文揭示一種組合物，其包括如本文中所述之表現載體。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之組合物，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子IX（FIX）多肽及連接至所述FIX多肽之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之組合物，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由因子VIIa（FVIIa）多肽及連接至所述FVIIa多肽之羧基末端的三個CTP組成。

【0235】 在另一實施例中，本文揭示一種組合物，其包括如本文中所述之細胞。在另一實施例中，細胞為真核細胞。在另一實施例中，細胞為原核細胞。

【0236】 在另一實施例中，本文揭示一種製造CTP修飾的凝血因子之方法，其包括將一至十個絨膜CTP連接至所述凝血因子之羧基末端之步驟，從而製造CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本文揭示一種製造CTP修飾的凝血因子之方法，其包括將一至十個編碼絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）之聚核苷酸序列連接至編碼所述凝血因子之聚核苷酸序列之羧基末端的步驟，從而製造CTP修飾的凝血因子。在另一實施例中，本

文揭示一種製造CTP修飾的因子IX（FIX）多肽之方法，其包括將三個絨膜CTP連接至所述FIX多肽之羧基末端之步驟，從而製造CTP修飾的FIX多肽。在另一實施例中，本文揭示一種製造CTP修飾的因子VIIa（FVIIa）多肽之方法，其包括將三個絨膜CTP連接至所述FVIIa多肽之羧基末端之步驟，從而製造CTP修飾的FVIIa多肽。

【0237】 在另一實施例中，本文揭示之工程化凝血因子使用編碼本文揭示之多肽的聚核苷酸分子合成。在一些實施例中，編碼本文揭示之工程化凝血因子的聚核苷酸分子接合至表現載體，包括轉錄控制順式調節序列（例如啟動子序列）。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化凝血因子之組成性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化凝血因子之組織特異性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化凝血因子之誘導型表現。

【0238】 在一個實施例中，本文揭示長效雙重GLP-1/升糖素受體促效劑以及其製造及使用方法。在另一實施例中，長效GLP-1/升糖素受體促效劑包括羧基末端肽（CTP，亦稱為CTP單元）。在另一實施例中，包括GLP-1/升糖素受體促效劑之長效多肽進一步包括人類絨膜促性腺激素（hCG）之羧基末端肽（CTP）。在另一實施例中，CTP充當針對GLP-1/升糖素受體促效劑之降解的保護劑。在另一實施例中，CTP延長GLP-1/升糖素受體促效劑之Cmax。在另一實施例中，CTP延長GLP-1/升糖素受體促效劑之Tmax。在另一實施例中，CTP延長GLP-1/升糖素受體促效劑之循環半衰期。在一些實施例中，CTP增強GLP-1/升糖素受體促效劑之效力。

【0239】 在另一實施例中，本文揭示一種延長GLP-1/升糖素受體促

效劑之生物半衰期之方法，其包括將一至十個CTP連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端之步驟，從而延長GLP-1/升糖素受體促效劑之生物半衰期。在另一實施例中，本文揭示一種延長GLP-1/升糖素受體促效劑之生物半衰期的方法，其包括將一至五個CTP連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端之步驟，從而延長GLP-1/升糖素受體促效劑之生物半衰期。在另一實施例中，本文揭示一種用於延長GLP-1/升糖素受體促效劑之循環半衰期之方法。在另一實施例中，本文揭示一種延長GLP-1/升糖素受體促效劑之半衰期的方法。在另一實施例中，本文揭示一種用於延長GLP-1/升糖素受體促效劑之半衰期之方法。

【0240】 在一個實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽，其包括雙重GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）。

【0241】 在另一實施例中，促效劑為蛋白質、多肽或肽。在另一實施例中，肽為調酸素（OXM）。

【0242】 在另一實施例中，CTP修飾的多肽包括：包括少於50個胺基酸之肽及連接至所述肽之胺基或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，肽為OXM。

【0243】 調酸素肽適用於治療代謝病症，諸如糖尿病及肥胖症。然而，歸因於肽之短半衰期及其在活體內的低穩定性，需要重複的每天投予超生理劑量以便達成在人類中之藥理學作用。如以下本文中所展現（參見實例），本文揭示之所有OXM-CTP變異體展現出與原生OXM相比在大鼠中優異的藥物動力學特徵曲線，伴有相當大的暴露增加及延長的半衰期。出人意料地，OXM-CTP-CTP變異體展現出與融合至3個CTP複本（一個

位於N端上且兩個串聯位於C端上）之CTP-OXM-CTP-CTP變異體相比優異的PK參數。

【0244】 在SC投予之後，與原生肽半衰期相比，2及3個CTP融合至OXM之C端引起類似的增加倍數（分別為21.6倍及21倍）（參見以下實例）。因此，預期四及五個CTP融合至OXM之C端將不顯著延長半衰期高於20倍。然而，展現出OXM-4CTP變異體及OXM-5CTP變異體之OXM半衰期之出人意料地顯著增加（亦即50倍），且暴露增加30倍，如由曲線下面積（AUC）參數所反映（參見本文中實例）。

【0245】 因此，在一個實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽，其包括OXM肽及連接至調酸素肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）。

【0246】 在一個實施例中，如本文中所述之CTP修飾的OXM包括全長OXM或其活性片段，其在其胺基或羧基末端上經由肽鍵連接於至少一個CTP單元，且在其胺基末端上無CTP。在另一實施例中，如本文中所述之CTP修飾的OXM包括全長OXM或其活性片段，其在其羧基末端上經由肽鍵連接於至少一個CTP單元，且在其胺基末端上無CTP。在另一實施例中，如本文中所述之CTP修飾的OXM包括全長OXM或其活性片段，其在其胺基末端上經由肽鍵連接於至少一個CTP單元，且在其羧基末端上無CTP。在另一實施例中，本文揭示一種編碼如上文所描述之工程化OXM之核酸分子，所述工程化OXM在一個實施例中包括連接至其羧基末端或其胺基末端的至少一個CTP。

【0247】 在另一實施例中，CTP修飾的多肽包括：包括少於50個胺基酸之肽及連接至所述肽之胺基或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧

基末端肽。在一個實施例中，本文揭示之CTP修飾的多肽包括：包括少於40個胺基酸之肽及連接至所述肽之胺基或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽。在另一實施例中，本文揭示之CTP修飾的多肽包括：包括少於30、20或10個胺基酸之肽。在一個實施例中，包括少於50個胺基酸之肽為雙重GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，包括少於50個胺基酸之肽為OXM。

【0248】 在另一實施例中，OXM包括以下胺基酸（AA）序列：HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA（SEQ ID NO: 57）。在另一實施例中，OXM由SEQ ID NO: 57之胺基酸序列組成。

【0249】 在另一實施例中，OXM為人類OXM或任何哺乳動物OXM。熟練的業內人士將瞭解，OXM亦可稱為升糖素-37或生物活性腸升糖素。在另一實施例中，OXM為雙重GLP-1/升糖素受體促效劑。熟練的業內人士將瞭解，術語OXM可涵蓋OXM之生物學活性片段。在另一實施例中，生物學活性OXM自SEQ ID NO: 57之胺基酸30延伸至胺基酸37。在另一實施例中，生物學活性OXM自SEQ ID NO: 57之胺基酸19延伸至胺基酸37。在另一實施例中，本文揭示之OXM對應於兩個C端胺基酸自其缺失的八肽。在另一實施例中，本文揭示之OXM對應於保留如本文中所述之OXM活性的SEQ ID NO: 57之任何片段。

【0250】 在一個實施例中，兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM，一個CTP位於OXM肽之羧基末端上且一個CTP位於胺基末端上。在另一實施例中，兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽在OXM肽之羧基末端上連接至OXM。在另一實施例中，兩個絨膜促性腺激素羧基末端肽均在

OXM肽之胺基末端上連接至OXM。在另一實施例中，三個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM，一個CTP在OXM肽之胺基末端上，且兩個CTP在羧基末端上。在另一實施例中，三個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM肽之羧基末端。在另一實施例中，四個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM肽之羧基末端。在另一實施例中，五個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM肽之羧基末端。在另一實施例中，1-10個CTP連接至OXM之胺基或羧基末端。在另一實施例中，1-10個CTP連接至OXM之胺基末端。在另一實施例中，1-10個CTP連接至OXM之羧基末端。

【0251】 在另一實施例中，本文揭示一種製造CTP修飾的多肽之方法，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，所述方法包括以下步驟：將所連接的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至OXM肽之胺基末端或羧基末端。

【0252】 在一個實施例中，本文揭示一種延長包括少於50個胺基酸之肽之生物半衰期的方法，其包括將至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至促效劑之胺基或羧基末端之步驟，從而改進促效劑之生物半衰期。

【0253】 在一個實施例中，本文揭示一種延長雙重GLP-1/升糖素受體促效劑之生物半衰期的方法，其包括將至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽連接至促效劑之胺基或羧基末端之步驟，從而改進促效劑之生物半衰期。

【0254】 在另一實施例中，本文揭示一種延長OXM之生物半衰期之方法，其包括將至少一個CTP連接至OXM之胺基或羧基末端之步驟，從而改進OXM之生物半衰期。

【0255】 在一個實施例中，本文揭示一種改進包括少於50個胺基酸

之肽之AUC的方法，其包括將至少一個CTP連接至促效劑之羧基末端的步驟，從而改進促效劑之AUC。

【0256】 在一個實施例中，本文揭示一種改進雙重GLP-1/升糖素受體促效劑之AUC之方法，其包括將至少一個CTP連接至促效劑之羧基末端之步驟，從而改進促效劑之AUC。

【0257】 在另一實施例中，本文揭示一種改進OXM之AUC之方法，其包括將至少一個CTP連接至OXM之羧基末端之步驟，從而改進OXM之AUC。

【0258】 在一個實施例中，術語OXM進一步包含已知OXM之同系物。在一個實施例中，同系物為功能同系物。熟練的業內人士將瞭解，術語「功能」可涵蓋本文揭示之OXM同系物、肽或蛋白質抑制食慾之能力。另外，熟練的業內人士將瞭解本文揭示之OXM同系物、肽或蛋白質具有延長另一蛋白質或肽之生物半衰期的能力。熟練的業內人士將瞭解，所揭示之OXM蛋白、肽或同系物之生物半衰期（T½）將涵蓋一半量之所述蛋白質、肽或同系物降解或不存在於個體中的生物介質中所需的時間。在另一實施例中，生物介質為血清、腦脊髓液、組織、黏膜及其類似介質。

【0259】 在一個實施例中，OXM結合於受體且介導食慾抑制。在另一實施例中，受體為雙重GLP-1/升糖素受體。在另一實施例中，受體為GLP-1受體。在另一實施例中，受體為升糖素受體。在又另一實施例中，受體為本領域中已知結合於OXM之任何受體。

【0260】 在另一實施例中，本文揭示OXM之同系物。熟練的業內人士將瞭解，OXM同系物可涵蓋SEQ ID NO: 57之肽之肽同系物。

【0261】 在另一實施例中，本文揭示具有食慾抑制活性之OXM之同系物。在另一實施例中，本文揭示具有功能結合之OXM之同系物。在另一實施例中，本文揭示如本文中所述之具有食慾抑制及活性之OXM之同系物。在另一實施例中，本文揭示如本文中所述之具有功能結合之OXM之同系物。在另一實施例中，同系物包括與OXM至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源之多肽，如使用美國國家生技資訊中心（NCBI）之BlastP軟體使用預設參數測定。

【0262】 在一個實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括本文所揭示之CTP修飾的多肽。

【0263】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP、兩至九個CTP、或兩至十個CTP。

【0264】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的兩個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個CTP、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP、兩至九個CTP或兩至十個CTP。

【0265】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖

素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0266】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的三個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0267】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0268】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的四個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0269】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五至六個CTP、五至七個

CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0270】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的五個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括OXM及連接至OXM之羧基末端的五至六個CTP、五至七個CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0271】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP、兩至九個CTP或兩至十個CTP。

【0272】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的兩個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個CTP、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的兩至九個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的兩至十個CTP組成。

【0273】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個

CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0274】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0275】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0276】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的四個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0277】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五至六個CTP、五至七個CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0278】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其由OXM及連接至OXM之羧基末端的五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的五至六個CTP、五至七個CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0279】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個CTP、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP、兩至九個CTP或兩至十個CTP。

【0280】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由OXM及連接至OXM之羧基末端的兩個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的兩至三個CTP、兩至四個CTP、兩至五個CTP、兩至六個CTP、兩至七個CTP、兩至八個CTP、兩至九個CTP或兩至十個CTP。

【0281】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0282】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由OXM及連接至OXM之羧基末端的三個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一

種多肽，其基本上由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的三至四個CTP、三至五個CTP、三至六個CTP、三至七個CTP、三至八個CTP、三至九個CTP或三至十個CTP。

【0283】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0284】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由OXM及連接至OXM之羧基末端的四個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的四至五個CTP、四至六個CTP、四至七個CTP、四至八個CTP、四至九個CTP或四至十個CTP。

【0285】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至GLP-1/升糖素受體促效劑之羧基末端的五至六個CTP、五至七個CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0286】 在一個實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由OXM及連接至OXM之羧基末端的五個CTP組成。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其基本上由以下各者組成：OXM及連接至OXM之羧基末端的五

至六個CTP、五至七個CTP、五至八個CTP、五至九個CTP或五至十個CTP。

【0287】 在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上不具有CTP之GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上缺乏CTP之GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其羧基末端上具有至少一個CTP且在其胺基末端上無CTP之GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：如本文中所述在其羧基末端上具有CTP數目且在其胺基末端上無CTP之GLP-1/升糖素受體促效劑。

【0288】 在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上無CTP之OXM。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其胺基末端上缺乏CTP之OXM。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：在其羧基末端上具有至少一個CTP且在其胺基末端上無CTP之OXM。在另一實施例中，本文揭示一種多肽，其包括以下各者、基本上由以下各者組成或由以下各者組成：如本文中所述在其羧基末端上具有CTP數目且在其胺基末端上無CTP之OXM。

【0289】 在一個實施例中，CTP修飾的多肽之胺基酸序列包括本文進一步揭示之SEQ ID NO: 58、59、60、61、62、63或64。在另一實施

例中，CTP修飾的多肽之胺基酸序列選自由以下各者組成之群：本文進一步揭示之SEQ ID NO: 58、59、60、61、62、63或64。

【0290】 在一個實施例中，在表現之後，分泌成熟CTP修飾的OXM多肽，信號肽已自前驅蛋白裂解，得到成熟蛋白。舉例而言，在闡述在SEQ ID NO: 62中之前驅物CTP修飾的OXM多肽中，胺基酸1-26：M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A（SEQ ID NO: 115）表示前驅物CTP修飾的OXM多肽之信號肽，且胺基酸H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T K R N R N N I A S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q（SEQ ID NO: 114）表示缺乏信號肽之成熟工程化CTP修飾的OXM多肽。在一個實施例中，無信號肽之CTP修飾的OXM之胺基酸序列闡述在SEQ ID NO: 114中。在另一實施例中，CTP修飾的OXM之信號肽闡述在SEQ ID NO: 115中。

【0291】 在另一實施例中，本文揭示一種聚核苷酸，其編碼如本文中所述之多肽。在另一實施例中，聚核苷酸包括本文進一步揭示之SEQ ID NO: 65、66、67、68、69、70或71。在另一實施例中，聚核苷酸選自由以下各者組成之群：本文進一步揭示之SEQ ID NO: 65、66、67、68、69、70或71。

【0292】 在一個實施例中，本文揭示一種降低個體之膽固醇之方法，其包括將至少一個CTP連接至OXM之胺基或羧基末端之步驟，從而降低個體之膽固醇。

【0293】 在另一實施例中，本文揭示一種降低個體之甘油之方法，

其包括將至少一個CTP連接至OXM之胺基或羧基末端之步驟，從而降低個體之甘油。

【0294】 在一個實施例中，本文揭示一種長效OXM。在一個實施例中，本文揭示之長效OXM維持未經修飾之OXM之生物活性。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM包括OXM生物活性。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括減少消化分泌物。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括減少及延遲胃排空。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制小腸中的饋送運動模式。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制由五肽胃泌素刺激的酸分泌。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括增加胃生長抑素釋放。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括增強肽YY之作用。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制胃內激素釋放。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括刺激胺基比林聚積及cAMP產生。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括結合GLP-1受體。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括藉由活化腺苷酸環化酶來刺激H+產生。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制組胺刺激的胃酸分泌。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制食物攝入。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括刺激胰島素釋放。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制外分泌胰臟分泌。

【0295】 在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括抑制經由迷走神經間接機制的胰臟分泌。在另一實施例中，本文揭示之長效

OXM之生物活性包括減少經由小腸的水礦物運送。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括刺激葡萄糖攝取。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括控制/刺激生長抑素分泌。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括食物攝入及體重增加兩者的降低。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括肥胖減少。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括食慾抑制。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括誘導食慾不振。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括減輕超重及肥胖個體之體重。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性包括誘導脂肪激素瘦素及脂聯素之含量變化。在另一實施例中，本文揭示之長效OXM之生物活性除了減少超重及肥胖個體之能量攝取之外亦包括增加能量消耗。

【0296】 因此，在一個實施例中，本文揭示一種藉由投予本文揭示之CTP修飾的OXM來實現上述OXM生物學活性中之任一者的方法。在另一實施例中，本文揭示一種在個體中減少食物攝入、減輕體重或兩者之方法，其包括向個體投予CTP修飾的OXM肽之步驟。在另一實施例中，個體具有糖尿病。在另一實施例中，個體為超重。在另一實施例中，個體為肥胖。

【0297】 熟練的業內人士將瞭解，術語「減輕、減少、降低等」當相對於本文所揭示之方法使用時可涵蓋自先前量測或測定之水準或自正常水準減少100%。在另一實施例中，自先前測定之水準減少89-99%。79-88%、69-78%、59-68%、49-58%、39-48%、29-38%、19-28%、9-18%、5-8%或1-4%。

【0298】 OXM-CTP變異體之活體內生物活性在兩種動物模式中評估，IPGTT在小鼠中，其評估OXM在葡萄糖投予之後誘導葡萄糖耐受性之能力，而食物攝入抑制在瘦大鼠中，其評估OXM抑制動物之食物消耗之能力。已展現出，OXM-CTP變異體：CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP-CTP-CTP及OXM-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP誘導葡萄糖耐受性，如由與媒劑組相比血糖AUC減少20-30%所反映（參見實例4，本文中）。此等結果指示，OXM-CTP變異體之生物活性在活體內不因CTP融合體對OXM與其受體之結合之潛在空間干擾而受到抑制。由此等變異體誘導之葡萄糖顯著減少與其改進的PK特徵曲線相關。因此，在一個實施例中，本文揭示一種誘導個體之葡萄糖耐受性之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而誘導個體之葡萄糖耐受性。

【0299】 在另一實施例中，本文揭示一種誘導個體之葡萄糖耐受性之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而誘導個體之葡萄糖耐受性。

【0300】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括雙重GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於誘導個體之葡萄糖耐受性。在一個實施例中，所述雙重GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0301】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括雙重GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於製備供誘導個體之葡萄糖耐受性用之藥物。在一個實施例中，所述雙重GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0302】 在一個實施例中，本文揭示一種增加個體之胰島素敏感性之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而增加個體之胰島素敏感性。

【0303】 在一個實施例中，本文揭示一種減少個體之胰島素抵抗之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而減少個體之胰島素抵抗。

【0304】 在一個實施例中，本文揭示一種在個體中增加胰島素敏感性並減少胰島素抵抗之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而在個體中增加胰島素敏感性並減少胰島素抵抗。

【0305】 評估OXM-CTP變異體OXM-3CTP、OXM-4CTP及OXM-5CTP抑制食物攝入之能力。原生OXM僅在投予後第一個小時內抑制食物

攝入，然而所有變異體顯現出與OXM相比在食物攝入方面相當大的延長的改進抑制。OXM-5CTP之累積食物抑制出人意料地持續至少141小時，突出此變異體之延長的半衰期（參見本文中實例）。

【0306】 因此，在一個實施例中，本文揭示一種誘導個體之食物攝入抑制之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM（OXM）肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而誘導個體之食物攝入抑制。

【0307】 在另一實施例中，本文揭示一種誘導個體之食物攝入抑制之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而誘導個體之食物攝入抑制。

【0308】 在另一實施例中，本文揭示一種預防、減少或抑制個體之食物攝入之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而預防、減少或抑制個體之食物攝入。在另一實施例中，預防、減少或抑制個體之食物攝入會降低個體出現非所期望的體重增加之幾率。在另一實施例中，預防、減少或抑制個體之食物攝入會降低個體出現肥胖症之幾率。

【0309】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基

末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於預防個體之非所期望的體重增加。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0310】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於製備供預防個體之非所期望的體重增加用之藥物。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0311】 在另一實施例中，本文揭示一種預防、減少或抑制個體之食物攝入之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM（OXM）肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而預防、減少或抑制個體之食物攝入。在另一實施例中，預防、減少或抑制個體之食物攝入會降低個體出現非所期望的體重增加之幾率。在另一實施例中，預防、減少或抑制個體之食物攝入會降低個體出現肥胖症之幾率。

【0312】 在另一實施例中，本文揭示一種預防個體之非所期望的體重增加之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而預防個體之體重增加。在另一實施例中，體重增加導致或引起個體之肥胖症。在另一實施例中，獲得體重增加之風險歸因於心理病況，或歸因於個體增加體重之遺傳傾向。在另一實施例中，心理病況為抑鬱症、焦慮症或創傷後壓力症（PTSD）。

【0313】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述

CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於預防個體之非所期望的體重增加。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0314】 在另一實施例中，本文揭示CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，其用於製備供預防個體之非所期望的體重增加用之藥物。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0315】 在另一實施例中，本文揭示一種預防個體之非所期望的體重增加之方法，所述方法包括以下步驟：向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個CTP，從而預防個體之體重增加。在另一實施例中，體重增加導致或引起個體之肥胖症。在另一實施例中，獲得體重增加之風險歸因於心理病況，或歸因於個體增加體重之遺傳傾向。在另一實施例中，心理病況為抑鬱症、焦慮症或創傷後壓力症（PTSD）。

【0316】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之肥胖症之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑肽及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之肥胖症。在另一實施例中，個體在遺傳上傾向於肥胖。在另一實施例中，所述治療肥胖症之方法引起個體之體重減輕。在另一實施例中，體重減輕歸因於體脂肪減少。

【0317】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於治療個體之肥胖症。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0318】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於製備供治療個體之肥胖症用之藥物。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0319】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之肥胖症之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之肥胖症。在另一實施例中，個體在遺傳上傾向於肥胖。

【0320】 在一個實施例中，本文揭示一種治療個體之II型糖尿病之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑肽及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之II型糖尿病。

【0321】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於治療

個體之II型糖尿病。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0322】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於製備供治療個體之II型糖尿病用之藥物。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0323】 在一個實施例中，本文揭示一種治療個體之II型糖尿病之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之II型糖尿病。

【0324】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之代謝病症之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述GLP-1/升糖素受體促效劑肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之代謝病症。

【0325】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於治療個體之代謝病症。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0326】 在另一實施例中，本文揭示一種CTP修飾的多肽之用途，

所述CTP修飾的多肽包括GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，其用於製備供治療個體之代謝病症用之藥物。在一個實施例中，所述GLP-1/升糖素受體促效劑為OXM。

【0327】 在另一實施例中，本文揭示一種治療個體之代謝病症之方法，所述方法包括向個體投予有效劑量之包括CTP修飾的多肽的組合物，所述CTP修飾的多肽包括OXM肽及連接至所述OXM肽之胺基末端或羧基末端的至少一個絨膜促性腺激素羧基末端肽，從而治療個體之代謝病症。

【0328】 在另一實施例中，代謝病症為糖尿病酮酸中毒或糖尿病或本領域中已知的任何葡萄糖相關的代謝病症。在另一實施例中，代謝病症由個體之胰島素缺乏及葡萄糖過多引起。

【0329】 在另一實施例中，本文揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑變異體使用編碼本文揭示之多肽的聚核苷酸分子合成。在另一實施例中，編碼本文揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑的聚核苷酸分子接合至表現載體，包括轉錄控制順式調節序列（例如啟動子序列）。在另一實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑之組成性表現。在另一實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑肽之組織特異性表現。在另一實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑變異體之誘導型表現。

【0330】 在另一實施例中，本文揭示一種細胞，其包括如本文中所述之表現載體。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽包

括以下各者或由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基或羧基末端的至少一個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基或羧基末端的至少一個CTP。

【0331】 在另一實施例中，本文揭示一種組合物，其包括如本文中所述之表現載體。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之組合物，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽包括以下各者或由以下各者組成：GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至所述促效劑之胺基或羧基末端的至少一個CTP。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞，所述表現載體包括編碼CTP修飾的多肽之聚核苷酸，所述CTP修飾的多肽由促效劑及連接至所述促效劑之胺基或羧基末端的至少一個CTP組成。在另一實施例中，促效劑為多肽或肽。在另一實施例中，肽為OXM。

【0332】 在另一實施例中，本文揭示一種組合物，其包括如本文中所述之細胞。在另一實施例中，細胞為真核細胞。在另一實施例中，細胞為原核細胞。

【0333】 在一個實施例中，本文揭示一種雙重GLP-1/升糖素受體促效劑。在另一實施例中，本文揭示如上文所述之重組OXM。在一個實施例中，本文揭示如上文所述之工程化OXM。在一個實施例中，如上文所述之工程化OXM稱為CTP修飾的OXM。

【0334】 在一個實施例中，連接至OXM之羧基末端的CTP串聯連接至羧基末端。在一個實施例中，連接至OXM之胺基末端的CTP串聯連接

至胺基末端。

【0335】 在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括由GLP-1/升糖素受體促效劑及連接至OXM之羧基末端的三個CTP組成之CTP修飾的多肽。

【0336】 在另一實施例中，本文揭示一種醫藥組合物，其包括由OXM及連接至OXM之羧基末端的三個CTP組成之CTP修飾的多肽。

【0337】 在一個實施例中，如本文中所述之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑與非CTP修飾的GLP-1/升糖素受體促效劑相比具有等效或改進的生物活性。在另一實施例中，如本文中所揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑與非CTP修飾的GLP-1/升糖素受體促效劑相比具有等效或改進的藥理學量測值。在另一實施例中，如本文中所揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑與非CTP修飾的GLP-1/升糖素受體促效劑相比具有等效或改進的藥物動力學。在另一實施例中，如本文中所揭示之工程化GLP-1/升糖素受體促效劑與非CTP修飾的GLP-1/升糖素受體促效劑相比具有等效或改進的藥效學。

【0338】 熟練的業內人士將瞭解，雖然上文已揭示CTP修飾的多肽之具體實施例，但相關多肽或肽可涵蓋具有功能活性之任何相關多肽或肽。在另一實施例中，相關多肽序列為胰島素，為腦啡肽，為ACTH，為升糖素，為胰島素樣生長因子，為表皮生長因子，為酸性或鹼性纖維母細胞生長因子，為血小板衍生生長因子，為顆粒球-CSF，為巨噬細胞-CSF，為IL-2，為IL-3，為腫瘤壞死因子，為LHRH，為LHRH類似物，為生長抑素，為生長激素釋放因子，為內啡肽，為肺泡表面活性蛋白，為利鈉因子，為黏附素，為血管生長抑素，為內皮抑制素，為細胞激素，為

受體肽，為受體結合配位體，為抗體，為抗體片段，或為包含任何修飾形式之肽或蛋白質。

【0339】 在另一實施例中，本文揭示之肽包括另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽的相關肽。在另一實施例中，另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽的相關肽包括選自以下清單的蛋白質：胰島素、Albutein/白蛋白、Activase阿替普酶（altiplase）/tPA、腺苷脫胺酶、免疫球蛋白、葡糖腦苷脂酶、Leukine-沙格司亭（sargramostim）/GM-CSF、G-CSF、Venoglobulin-S/IgG、Proleukin阿地介白素（aldesleukin）、DNA酶、因子VIII、Helixate、L-天冬醯胺酶、WinRho SDF Rh I、Retavase瑞替普酶（retaplase）/tPA、因子IX、FSH、球蛋白、血纖維蛋白、介白素-11、貝卡普明（becaplermin）/PDGF、來匹盧定（lepirudin）/赫如定（herudin）、TNF、即複寧（Thymoglobulin）、因子VIIa、干擾素α-2a、干擾素α n-1、干擾素α-N3、干擾素β-1b、干擾素γ-1b、介白素-2或單株抗體。

【0340】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造胰島素，所述胰島素另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療糖尿病。

【0341】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造白蛋白，所述白蛋白另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療低血容性休克、血液透析或心肺繞通。

【0342】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Activase-阿替普酶/tPA，所述Activase-阿替普酶/tPA另外具有在N端上之至少一個CTP胺

基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療急性心肌梗塞、急性大面積肺栓塞、或（在整個過程中的變化）缺血性中風。

【0343】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造腺苷脫胺酶，所述腺苷脫胺酶另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療重度聯合免疫缺陷疾病。

【0344】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造免疫球蛋白，所述免疫球蛋白另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療移植接受者。

【0345】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造免疫球蛋白，所述免疫球蛋白為CMV免疫球蛋白。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造葡糖腦苷脂酶，所述葡糖腦苷脂酶另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療戈謝病（Gaucher disease）。

【0346】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Leukine-沙格司亭/GM-CSF，所述Leukine-沙格司亭/GM-CSF另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於刺激造血祖細胞。

【0347】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造G-CSF，所述G-CSF另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療嗜中性白血球減少症。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Venoglobulin-S/IgG，所述Venoglobulin-S/IgG另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療免疫缺陷疾病。

【0348】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Proleukin-阿地介白素，所述Proleukin-阿地介白素另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療腎癌瘤或轉移性黑素瘤。

【0349】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造DNA酶，所述DNA酶另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療囊腫性纖維化。

【0350】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造因子VIII，所述因子VIII另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療A型血友病。

【0351】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Helixate，所述Helixate另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療A型血友病。

【0352】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造L-天冬醯胺酶，所述L-天冬醯胺酶另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療急性淋巴母細胞白血病。

【0353】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造WinRho SDF Rh IgG，所述WinRho SDF Rh IgG另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療Rh同族免疫及免疫性血小板減少性紫癜。

【0354】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Retavase瑞替普酶/tPA，所述Retavase瑞替普酶/tPA另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之一個CTP胺基酸肽，其用於治療急性心肌梗塞。

【0355】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造FSH，所述FSH另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於在輔助生殖期間刺激排卵。

【0356】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造球蛋白，所述球蛋白另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於預防呼吸道合胞病毒疾病。

【0357】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造血纖維蛋白，所述血纖維蛋白另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於創傷管理及止血。在另一實施例中，本文所揭示之方法製造介白素-11，所述介白素-11另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於化學療法誘導之血小板減少。

【0358】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造貝卡普明/PDGF，所述貝卡普明/PDGF另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於治療糖尿病性足部潰瘍。

【0359】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造來匹盧定/赫如定，所述來匹盧定/赫如定另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於肝素誘導之血小板減少中的抗凝。

【0360】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造可溶性TNF，所述可溶性TNF另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於治療類風濕性關節炎。

【0361】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造即複寧，所述即

複寧另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於治療器官移植排斥疾病。

【0362】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造介白素-2，所述介白素-2另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於治療腎癌瘤及轉移性黑素瘤。

【0363】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造OKT3單株抗體，所述OKT3單株抗體另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於器官移植。

【0364】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造Reo單株抗體，所述Reo單株抗體另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於預防來自冠狀動脈干預及血管成形術之併發症。

【0365】 在另一實施例中，本文所揭示之方法製造單株抗體，所述單株抗體另外具有在N端上之至少一個CTP胺基酸肽及在C端上之至少一個CTP胺基酸肽，其用於治療結腸直腸癌、非霍奇金氏淋巴瘤（Non-Hodgkin's lymphoma）、腎臟移植排斥、轉移性乳癌，或預防呼吸道合胞病毒疾病。

【0366】 在一些實施例中，CTP序列修飾在允許使用較低劑量方面為有利的。在一些實施例中，修飾包含（但不限於）N端修飾、C端修飾、多肽鍵修飾（包含（但不限於）CH2-NH、CH2-S、CH2-S=O、O=C-NH、CH2-O、CH2-CH2、S=C-NH、CH=CH或CF=CH）、主鏈修飾以及殘基修飾。製備肽模擬化合物之方法在本領域中為熟知的並且例如說明於《定量藥物設計（Quantitative Drug Design）》, C.A. Ramsden

Gd., 第17.2章, F. Choplin Pergamon Press (1992)中，所述文獻以引用的方式併入，就如同本文中充分闡述一般。另外細節下文揭示在此方面之其他細節。

【0367】 在一些實施例中，多肽內的多肽鍵（-CO-NH-）經取代。在一些實施例中，多肽鍵經N-甲基化鍵（-N(CH3)-CO-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經酯鍵（-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經酮亞甲基鍵（-CO-CH2-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經α-氮雜鍵（-NH-N(R)-CO-，其中R為任何烷基，例如甲基）、卡巴鍵（carba bond）（-CH2-NH-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經羥基亞乙基鍵（-CH(OH)-CH2-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經硫代醯胺鍵（-CS-NH-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經烯烴雙鍵（-CH=CH-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經逆醯胺鍵（-NH-CO-）取代。在一些實施例中，多肽鍵經多肽衍生物（-N(R)-CH2-CO-）取代，其中R為自然地呈現於碳原子上之「正常」側鏈。在一些實施例中，此等修飾出現於沿多肽鏈之任一鍵處且甚至同時出現於若干（2-3個鍵）處。

【0368】 在一些實施例中，用合成非天然酸取代多肽之天然芳族胺基酸（諸如Trp、Tyr及Phe），所述合成非天然酸為諸如苯基甘胺酸、TIC、萘基丙胺酸（Nol）、Phe之環甲基化衍生物、Phe之鹵化衍生物或鄰甲基-Tyr。在一些實施例中，本文揭示之多肽包含一個或多個經修飾的胺基酸或一個或多個非胺基酸單體（例如脂肪酸、複合碳水化合物等）。

【0369】 在一個實施例中，「胺基酸（amino acid/amino acid）」理解為包含20種天然存在的胺基酸；通常經活體內轉譯後修飾之彼等胺基酸，包含（例如）羥基脯胺酸、磷酸絲胺酸及磷酸蘇胺酸；及其他非尋常

胺基酸，包含（但不限於）2-胺基己二酸、羥基離胺酸、異鎖鏈素、正纈胺酸、正白胺酸及鳥胺酸。在一個實施例中，「胺基酸」包含D-及L-胺基酸兩者。

【0370】 在一些實施例中，本文揭示之多肽用於需要多肽呈可溶形式之治療劑中。在一些實施例中，本文揭示之多肽包含一種或多種非天然或天然極性胺基酸，包含（但不限於）絲胺酸及蘇胺酸，其能夠因其含羥基側鏈而增加多肽溶解度。

【0371】 在一些實施例中，本文揭示之多肽以線性形式利用，但本領域中熟習此項技術者應瞭解，在環化不嚴重干擾多肽特徵之情況下，亦可利用環狀形式之多肽。

【0372】 在一些實施例中，本文揭示之多肽為生物化學合成的，諸如藉由使用標準固相技術進行。在一些實施例中，此等生物化學方法包含排他性固相合成、部分固相合成、片段縮合或經典溶液合成。在一些實施例中，當多肽相對較短（約5-15 kDa）時及/或當其無法藉由重組技術產生（亦即，並非由核酸序列編碼）並且因此涉及不同化學反應時使用此等方法。

【0373】 在一些實施例中，固相多肽合成程序為本領域中熟習此項技術者所熟知並且由John Morrow Stewart及Janis Dillaha Young,《固相多肽合成（Solid Phase Polypeptide Syntheses）》（第2版, Pierce Chemical Company, 1984)進一步描述。在一些實施例中，合成多肽藉由製備型高效液相層析[Creighton T. (1983)《蛋白質，結構及分子原理（Proteins, structures and molecular principles.）》 WH Freeman and Co. 紐約（N. Y.）]純化且其組成可經由利用本領域中熟習此項技術者已

知的方法之胺基酸定序來確認。

【0374】 在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生本文揭示之多肽。在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生相對較長多肽（例如長於18-25個胺基酸）。在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生大量本文揭示之多肽。在一些實施例中，重組技術由Bitter等人, (1987) 《酶學方法（Methods in Enzymol.）》 153:516-544，Studier等人 (1990) 《酶學方法》 185:60-89，Brisson等人 (1984) 《自然（Nature）》 310:511-514，Takamatsu等人 (1987) 《歐洲分子生物學研究期刊（EMBO J.）》 6:307-311，Coruzzi等人 (1984) 《歐洲分子生物學研究期刊》 3:1671-1680及Brogli等人, (1984) 《科學（Science）》 224:838-843，Gurley等人 (1986) 《分子細胞生物學（Mol. Cell. Biol.）》 6:559-565及Weissbach與Weissbach, 1988, 《植物分子生物學方法（Methods for Plant Molecular Biology）》 Academic Press, 紐約（NY）, 第VIII部分, 第421-463頁。

【0375】 在一個實施例中，本文揭示之多肽使用編碼本文揭示之多肽的聚核苷酸合成。在一些實施例中，編碼本文揭示之多肽的聚核苷酸接合至表現載體，包括轉錄控制順式調節序列（例如啟動子序列）。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之多肽之組成性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之多肽之組織特異性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之多肽之誘導型表現。

【0376】 在一些實施例中，本文揭示之相關多肽以線性形式利用，但本領域中熟習此項技術者應瞭解，在環化不嚴重干擾細胞激素特徵之情

況下，亦可利用環狀形式之細胞激素。

【0377】 在一些實施例中，本文揭示之相關多肽為生物化學合成的，諸如藉由使用標準固相技術進行。在一些實施例中，此等生物化學方法包含排他性固相合成、部分固相合成、片段縮合或經典溶液合成。在一些實施例中，當相關多肽相對較短（約5-15 kDa）時及/或當其無法藉由重組技術產生（亦即，並非由核酸序列編碼）並且因此涉及不同化學反應時使用此等方法。

【0378】 在一些實施例中，相關固相多肽合成程序為本領域中熟習此項技術者所熟知並且由John Morrow Stewart及Janis Dillaha Young,《固相多肽合成》(第2版, Pierce Chemical Company, 1984)進一步描述。在一些實施例中，合成多肽藉由製備型高效液相層析[Creighton T. (1983)《蛋白質，結構及分子原理》 WH Freeman and Co. 紐約]純化且其組成可經由利用本領域中熟習此項技術者已知的方法之胺基酸定序來確認。

【0379】 在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生本文揭示之相關多肽。在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生相對較長多肽（例如長於18-25個胺基酸）。在一些實施例中，重組蛋白技術用於產生大量本文揭示之相關多肽。在一些實施例中，重組技術由Bitter等人, (1987)《酶學方法》 153:516-544，Studier等人 (1990)《酶學方法》 185:60-89，Brisson等人 (1984)《自然》 310:511-514，Takamatsu等人 (1987)《歐洲分子生物學研究期刊》 6:307-311，Coruzzi等人 (1984)《歐洲分子生物學研究期刊》 3:1671-1680及Brogli等人, (1984)《科學》 224:838-843，Gurley等人 (1986)《分子細胞生物學》 6:559-565及Weissbach與

Weissbach, 1988, 《植物分子生物學方法》 Academic Press, 紐約（NY）, 第VIII部分, 第421-463頁。

【0380】 在另一實施例中，本文揭示之相關多肽使用編碼本文揭示之多肽的聚核苷酸合成。在一些實施例中，編碼本文揭示之相關多肽的聚核苷酸接合至表現載體，包括轉錄控制順式調節序列（例如啟動子序列）。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之相關多肽之組成性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之相關多肽之組織特異性表現。在一些實施例中，順式調節序列適用於引導本文揭示之相關多肽之誘導型表現。

【0381】 在一些實施例中，適合用於本文揭示之核苷酸序列的組織特異性啟動子包含在特異性細胞群體中起作用之序列，實例包含（但不限於）啟動子，諸如肝臟特異性白蛋白[Pinkert等人, (1987) 《基因與發育（Genes Dev.）》 1:268-277]、淋巴特異性啟動子[Calame等人, (1988) 《免疫學進展（Adv. Immunol.）》 43:235-275]；尤其為T細胞受體啟動子[Winoto等人, (1989) 《歐洲分子生物學研究期刊》 8:729-733]及免疫球蛋白；[Banerji等人 (1983) 《細胞（Cell）》 33729-740]、神經元特異性啟動子，諸如神經絲啟動子[Byrne等人 (1989) 《美國國家科學院院刊（Proc. Natl. Acad. Sci. USA）》 86:5473-5477]、胰臟特異性啟動子[Edlunch等人 (1985) 《科學》 230:912-916]或乳腺特異性啟動子，諸如乳清啟動子（美國專利第4,873,316號及歐洲申請公開案第264,166號）。適合用於本文揭示之核苷酸序列的誘導型啟動子包含例如四環素誘導型啟動子（Srour, M.A.等人, 2003. 《血栓與凝血（Thromb. Haemost.）》 90: 398-405）。

【0382】 熟練的業內人士將瞭解，短語「聚核苷酸」可涵蓋單股或雙股核酸序列，其以RNA序列、互補聚核苷酸序列（cDNA）、基因組聚核苷酸序列及/或複合聚核苷酸序列（例如上述之組合）形式分離及提供。

【0383】 熟練的業內人士將瞭解，術語「互補聚核苷酸序列」可涵蓋由信使RNA使用逆轉錄酶或任何其他RNA依賴性DNA聚合酶逆轉錄產生之序列。在一個實施例中，所述序列可以隨後使用DNA聚合酶活體內或活體外擴增。

【0384】 熟練的業內人士將瞭解，術語「基因組聚核苷酸序列」可涵蓋由染色體衍生（分離）之序列且由此其代表染色體之連續部分。

【0385】 熟練的業內人士將瞭解，術語「複合聚核苷酸序列」可涵蓋至少部分互補且為至少部分基因組之序列。在一個實施例中，複合序列可包含用於編碼本文揭示之多肽所需的一些外顯子序列以及插入在其間的一些內含子序列。在一個實施例中，內含子序列可以具有任何來源，包含具有其他基因，並且典型地將包含保守拼接信號序列。在一個實施例中，內含子序列包含順式作用表現調控元件。

【0386】 在一些實施例中，本文揭示之聚核苷酸使用PCR技術或本領域中熟習此項技術者已知的任何其他技術製備。在一些實施例中，所述程序涉及接合兩個不同DNA序列（參看例如「《最新分子生物學實驗方法彙編（Current Protocols in Molecular Biology）》」, Ausubel等人編, John Wiley & Sons, 1992）。

【0387】 在一個實施例中，本文揭示之多肽可自身提供給個體。在一個實施例中，本文揭示之多肽可作為醫藥組合物之一部分提供給個體，

所述多肽在其中與醫藥學上可接受之載劑混合。

【0388】 在一個實施例中，經口劑型包括預定釋放特徵曲線。在一個實施例中，本文揭示之經口劑型包括延長釋放錠劑、膠囊、口含錠或咀嚼錠劑。在一個實施例中，本文揭示之經口劑型包括緩慢釋放錠劑、膠囊、口含錠或咀嚼錠劑。在一個實施例中，本文揭示之經口劑型包括立即釋放錠劑、膠囊、口含錠或咀嚼錠劑。在一個實施例中，根據本領域中熟習此項技術者已知的醫藥活性成分之所期望的釋放特徵曲線調配經口劑型。

【0389】 在一些實施例中，經口組合物包括液體溶液、乳液、懸浮液及其類似物。在一些實施例中，適合於製備此類組合物的醫藥學上可接受之載劑為本領域中眾所周知的。在一些實施例中，液體經口組合物包括約0.012%至約0.933%，或在另一實施例中，約0.033%至約0.7%之所期望的化合物。

【0390】 在一些實施例中，適用於本文所揭示之方法的組合物包括溶液或乳液，其在一些實施例中為水溶液或乳液，包括安全並且有效量的本文揭示之化合物及視情況選用之意欲用於局部鼻內投予的其他化合物。在一些實施例中，組合物包括約0.01 w/v%至約10.0 w/v%，更佳地約0.1 w/v%至約2.0 w/v%的本發明化合物，其用於藉由鼻內途徑全身傳遞化合物。

【0391】 在另一實施例中，醫藥組合物藉由靜脈內、動脈內或肌內注射液體製劑而投予。在一些實施例中，液體調配物包含溶液、懸浮液、分散液、乳液、油及其類似物。在一個實施例中，醫藥組合物靜脈內投予，且因此以適用於靜脈內投予的形式調配。在另一實施例中，醫藥組合

物動脈內投予，且因此以適用於動脈內投予之形式調配。在另一實施例中，醫藥組合物肌內投予，且因此以適用於肌內投予之形式調配。

【0392】 另外，在另一實施例中，醫藥組合物局部投予至身體表面，並且因此以適用於局部投予的形式調配。合適的局部調配物包含凝膠、軟膏、乳膏、洗劑、滴劑及其類似物。對於局部投予，本文揭示之化合物與其他適當治療劑或藥劑組合，以在具有或不具有醫藥載劑之生理學上可接受之稀釋劑中的溶液、懸浮液或乳液形式製備並施用。

【0393】 在一個實施例中，本文揭示之醫藥組合物可以利用本領域中熟知的方法來製造，例如藉助於習知混合、溶解、粒化、糖衣藥丸製造、水磨、乳化、囊封、覆埋或凍乾方法。

【0394】 在一個實施例中，根據本文揭示之核苷酸序列使用之醫藥組合物以習知方式使用一種或多種生理學上可接受之載劑調配，所述生理學上可接受之載劑包括賦形劑及助劑，其有助於將活性成分處理至其製劑中，可在醫藥學上使用。在一個實施例中，調配物視所選投藥途徑而定。

【0395】 在一個實施例中，本文揭示之可注射劑以水溶液形式調配。在一個實施例中，本文揭示之可注射劑在生理學上相容的緩衝液中進行調配，所述緩衝液諸如漢克氏溶液（Hank's solution）、林格氏溶液（Ringer's solution）或生理鹽緩衝液。在一些實施例中，對於經黏膜投予，將對欲滲透之屏障適當的滲透劑用於調配物。此類滲透劑一般為本領域中已知的。

【0396】 在一個實施例中，本文中所描述的製劑經調配用於非經腸投予，例如藉由彈丸注射或連續輸注進行。在一些實施例中，用於注射之調配物呈現在單位劑型，例如安瓿或多劑量容器中，其中視情況添加有防

腐劑。在一些實施例中，組合物為於油性或水性媒劑中之懸浮液、溶液或乳液且可含有諸如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑之調配劑。

【0397】 在一些實施例中，組合物亦包括防腐劑，諸如苯紮氯銨及硫柳汞及其類似物；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸鈉及其他；緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及乙酸鹽；張力劑，諸如氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露糖醇及其他；抗氧化劑，諸如抗壞血酸、乙醯胱氨酸、焦亞硫酸鈉及其他；芳族試劑；黏度調節劑，諸如聚合物，包含纖維素及其衍生物；以及聚乙烯醇，以及酸及鹼，用以按需要調節此等水性組合物之pH。在一些實施例中，組合物亦包括局部麻醉劑或其他活性劑。組合物可以按噴霧劑、霧劑、滴劑及其類似形式使用。

【0398】 在一些實施例中，用於非經腸投予之醫藥組合物包含呈水溶性形式之活性製劑之水溶液。另外，在一些實施例中，活性成分之懸浮液以適當油性或水基注射懸浮液形式製備。在一些實施例中，合適的親脂性溶劑或媒劑包含脂肪油，諸如芝麻油；或合成脂肪酸酯，諸如油酸乙酯、甘油三酯或脂質體。在一些實施例中，水性注射懸浮液含有使懸浮液之黏度提高的物質，諸如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇或聚葡萄糖。在另一實施例中，懸浮液亦含有合適的穩定劑或增加活性成分溶解度之藥劑以允許製備高度濃縮之溶液。

【0399】 在另一實施例中，活性化合物可以按微脂粒、具體而言脂質體形式傳遞（參看Langer, 《科學》 249:1527-1533 (1990)；Treat等人, 《傳染性疾病及癌症之療法中的脂質體（Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer）》, Lopez-Berestein及Fidler(編), Liss, 紐約, 第353-365頁 (1989)；Lopez-Berestein, 同書, 第317-327頁；

一般參看同書）。

【0400】 在另一實施例中，控制釋放系統中傳遞之醫藥組合物經調配用於靜脈內輸注、可植入滲透泵、透皮貼片、脂質體或其他投予模式。在一個實施例中，可使用泵（參見Langer, 同上；Sefton, 《CRC生物醫學工程評論（CRC Crit. Ref. *Biomed. Eng.*）》 14:201 (1987)；Buchwald等人, 《手術（Surgery）》 88:507 (1980)；Saudek等人, 《新英格蘭醫學期刊（*N. Engl. J. Med.*）》 321:574 (1989)）。在另一實施例中，可使用聚合材料。在又一實施例中，可將控制釋放系統接近治療目標（亦即，大腦）置放，因此僅需要全身劑量之一部分（參見例如，Goodson, 《控制釋放之醫學應用（*Medical Applications of Controlled Release*）》, 同上, 第2卷, 第115-138頁, 1984）。其他控制釋放系統由Langer（《科學》249:1527-1533 (1990)）在綜述中論述。

【0401】 在一些實施例中，活性成分呈在使用之前用合適的媒劑（例如無菌、無熱原質水基溶液）復原之粉末形式。在一些實施例中，組合物經調配以用於霧化及吸入投予。在另一實施例中，組合物含於連有霧化構件之容器中。

【0402】 在一個實施例中，本文揭示之製劑調配於例如使用習知栓劑基質（諸如可可脂或其他甘油酯）之經直腸組合物（諸如栓劑或保留灌腸劑）中。

【0403】 在一些實施例中，適合用於本文揭示之情形的醫藥組合物包含其中含有有效達成預期目的之量的活性成分之組合物。在一些實施例中，治療有效量意謂有效預防、減輕或改善疾病症狀或延長所治療個體之存活期的活性成分之量。

【0404】 在一個實施例中，治療有效量之確定完全在本領域中熟習此項技術者能力範圍內。

【0405】 組合物亦包括防腐劑，諸如苯紮氯銨及硫柳汞及其類似物；螯合劑，諸如乙二胺四乙酸鈉及其他；緩衝劑，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及乙酸鹽；張力劑，諸如氯化鈉、氯化鉀、甘油、甘露糖醇及其他；抗氧化劑，諸如抗壞血酸、乙醯胱氨酸、焦亞硫酸鈉及其他；芳族試劑；黏度調節劑，諸如聚合物，包含纖維素及其衍生物；以及聚乙烯醇，以及酸及鹼，用以按需要調節此等水性組合物之pH。組合物亦包括局部麻醉劑或其他活性劑。組合物可以按噴霧劑、霧劑、滴劑及其類似形式使用。

【0406】 可充當醫藥學上可接受之載劑或其組分的物質之一些實例為：糖，諸如乳糖、葡萄糖及蔗糖；澱粉，諸如玉米澱粉及馬鈴薯澱粉；纖維素及其衍生物，諸如羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素及甲基纖維素；粉末狀黃蓍膠；麥芽；明膠；滑石；固體潤滑劑，諸如硬脂酸及硬脂酸鎂；硫酸鈣；植物油，諸如花生油、棉籽油、芝麻油、橄欖油、玉米油及可可油；多元醇，諸如丙二醇、甘油、山梨糖醇、甘露糖醇及聚乙二醇；海藻酸；乳化劑，諸如Tween™牌乳化劑；濕潤劑，諸如月桂基硫酸鈉；著色劑；調味劑；製錠劑、穩定劑；抗氧化劑；防腐劑；無熱原質水；等張鹽水；以及磷酸鹽緩衝溶液。待與化合物結合使用的醫藥學上可接受之載劑的選擇基本上藉由化合物待投予的方式來確定。若本發明化合物要進行注射，則在一個實施例中，醫藥學上可接受之載劑為具有血液相容的懸浮劑之無菌生理鹽水，其pH已經被調節至約7.4。

【0407】 另外，組合物進一步包括黏合劑（例如阿拉伯膠、玉米澱粉、明膠、卡波姆（carbomer）、乙基纖維素、瓜爾膠、羥丙基纖維素、

羥丙基甲基纖維素、聚維酮）、崩解劑（例如玉米澱粉、馬鈴薯澱粉、海藻酸、二氧化矽、交聯羧甲纖維素鈉、交聯聚維酮、瓜爾膠、羥乙酸澱粉鈉）、具有各種pH及離子強度之緩衝劑（例如Tris-HCl、乙酸鹽、磷酸鹽）、用以防止吸收至表面之添加劑（諸如白蛋白或明膠）、清潔劑（例如Tween 20、Tween 80、Pluronic F68、膽酸鹽）、蛋白酶抑制劑、界面活性劑（例如月桂基硫酸鈉）、滲透增強劑、增溶劑（例如甘油、聚乙烯甘油）、抗氧化劑（例如抗壞血酸、焦亞硫酸鈉、丁基化羥基苯甲醚）、穩定劑（例如羥丙基纖維素、羥丙基甲基纖維素）、黏度增加劑（例如卡波姆、膠態二氧化矽、乙基纖維素、瓜爾膠）、甜味劑（例如阿斯巴甜糖（aspartame）、檸檬酸）、防腐劑（例如硫柳汞、苯甲醇、對羥基苯甲酸酯）、潤滑劑（例如硬脂酸、硬脂酸鎂、聚乙二醇、月桂基硫酸鈉）、流動助劑（例如膠態二氧化矽）、塑化劑（例如鄰苯二甲酸二乙酯、檸檬酸三乙酯）、乳化劑（例如卡波姆、羥丙基纖維素、月桂基硫酸鈉）、聚合物塗層（例如泊洛沙姆（poloxamer）或泊洛沙胺（poloxamine））、塗層和膜形成劑（例如乙基纖維素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯）及/或佐劑。

【0408】 用於糖漿、酏劑、乳液及懸浮液之載劑之典型組分包含乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、液體蔗糖、山梨糖醇及水。對於懸浮液，典型懸浮劑包含甲基纖維素、羧甲基纖維素鈉、纖維素（例如Avicel™、RC-591）、黃蓍膠及海藻酸鈉；典型濕潤劑包含卵磷脂及聚氧化乙烯脫水山梨糖醇（例如聚山梨醇酯80）。典型防腐劑包含對羥基苯甲酸甲酯及苯甲酸鈉。在另一實施例中，經口液體組合物亦含有一種或多種上文揭示之組分，諸如甜味劑、調味劑及著色劑。

【0409】 組合物亦包含將活性物質併入至聚合化合物（諸如聚乳酸、聚乙醇酸、水凝膠等）之微粒狀製劑之中或之上或併入至脂質體、微乳液、膠束、單層或多層微脂粒、紅血球血影或原生質球狀體上。所述組合物將影響物理狀態、溶解度、穩定性、活體內釋放速率及活體內清除速率。

【0410】 本文中亦包括微粒狀組合物，其塗佈有聚合物（例如泊洛沙姆或泊洛沙胺），並且化合物與針對組織特異性受體、配位體或抗原之抗體偶合或與組織特異性受體之配位體偶合。

【0411】 在一些實施例中，化合物藉由共價連接水溶性聚合物而經修飾，所述水溶性聚合物為諸如聚乙二醇、聚乙二醇與聚丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯胺酸。在另一實施例中，經修飾之化合物在靜脈內注射之後展現出的血液中半衰期基本上長於相應未經修飾之化合物。在一個實施例中，修飾亦提高化合物於水溶液中之溶解度，消除聚集，增強化合物之物理及化學穩定性，並且極大地降低化合物之免疫原性和反應性。在另一實施例中，所期望的活體內生物活性藉由與未經修飾之化合物相比更低頻率或以更低劑量投予所述聚合物-化合物誘導物而獲得。

【0412】 在一些實施例中，有效量或劑量的製劑最初可根據活體外分析來估計。在一個實施例中，劑量可以在動物模型中進行調配並且所述資訊可以用以更準確地確定人類中的適用劑量。

【0413】 在一個實施例中，本文所述的活性成分之毒性及治療功效可藉由活體外、細胞培養物或實驗動物中的標準醫藥程序來確定。在一個實施例中，獲自此等活體外及細胞培養物分析及動物研究之資料可以用以

調配適用於人類的劑量範圍。在一個實施例中，劑量視所採用劑型及所用投予途徑而變化。在一個實施例中，確切調配物、投予途徑及劑量可由個別醫生鑒於患者之病況來進行選擇。[參看例如Fingl等人, (1975)「《治療劑之藥理學基礎（The Pharmacological Basis of Therapeutics）》」, 第1章第1頁]。

【0414】 在一個實施例中，視待治療之病況的嚴重程度及反應而定，給藥可為單次或多次投藥，療程持續數天至數週或直至實現治癒或達成疾病狀態減弱為止。

【0415】 在一個實施例中，待投予之組合物的量當然將視所治療之個體、病痛之嚴重程度、投予方式、處方醫生的判斷等而定。

【0416】 在一個實施例中，亦製備包含在可相容醫藥載劑中調配之本文揭示之製劑的組合物，置於適當容器中，且針對指定病況之治療做標記。

【0417】 在一個實施例中，本文揭示之組合物呈現於包裝或分配器裝置中，所述包裝或分配器裝置為諸如FDA批准的套組，其含有一個或多個含有活性成分之單位劑型。在一個實施例中，包裝例如包括金屬或塑膠箔，諸如泡殼包裝。在一個實施例中，包裝或分配器裝置附有投予說明書。在一個實施例中，包裝或分配器附有與容器關聯之通知，其呈管制醫藥品之製造、使用或銷售之政府機構指定的形式，所述通知反映所述機構批准所述組合物形式或人類或獸醫學投藥。在一個實施例中，此類通知為經美國食品藥物管理局（U.S. Food and Drug Administration）批准用於處方藥物或核準之產品插頁。

【0418】 在一個實施例中，應瞭解本文揭示之多肽可與其他活性劑

一起提供給個體以達成與用每種藥劑單獨治療相比改進的治療作用。在另一實施例中，對與組合療法相關的不良副作用採取措施（例如給予及選擇補充藥劑）。

【0419】 在一些實施例中，如本文所用之「多肽」涵蓋原生多肽（降解產物、以合成方式合成的多肽或重組多肽）及肽模擬物（通常為以合成方式合成的多肽）以及類肽及半類肽（其為多肽類似物），其在一些實施例中具有修飾，使得包括相關多肽之多肽在體內時甚至更穩定或更能夠滲透至細胞中。

製造

【0420】 在一個實施例中，本文揭示一種製造相關多肽之人類絨膜促性腺激素肽（CTP）修飾的多肽之方法，所述方法包括以下步驟：（a）用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分之表現載體穩定轉染預定數量的細胞，其中所述經轉染的細胞表現並視情況分泌所述相關CTP修飾的多肽；（b）獲得過度表現所述相關CTP修飾的多肽之細胞純系；（c）將所述純系在溶液中擴增至預定規模；（d）收集所述含有所述純系之溶液；（e）過濾所述含有所述純系之溶液，獲得澄清的收集物溶液；以及（f）純化所述澄清的收集物溶液，獲得具有所期望的相關CTP修飾的多肽濃度之經純化的蛋白質溶液，從而製造相關多肽之人類絨膜促性腺激素肽（CTP）修飾的多肽。在另一實施例中，分泌相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，不分泌相關CTP修飾的多肽。在相關CTP修飾的多肽之製造中，轉染為早期步驟。在選擇最終高度表現純系後，每次製造包含解凍工作細胞庫（WCB），擴增，收集及純化。（參見實例12，步驟1-7，描述經由收集擴增純系；步驟8-16，描述純化）

【0421】 在一個實施例中，本文揭示之聚核苷酸插入至表現載體（亦即核酸構築體）中以實現重組多肽之表現。在一個實施例中，本文揭示之表現載體包含使得此載體適合於原核生物中之複製及整合的其他序列。在一個實施例中，本文揭示之表現載體包含使得此載體適合於真核生物中之複製及整合的其他序列。在一個實施例中，本文揭示之表現載體包含使得此載體適合於原核生物及真核生物兩者中之複製及整合的穿梭載體。在一些實施例中，選殖載體包括轉錄與轉譯起始序列（例如啟動子、強化子）及轉錄與轉譯終止子（例如聚腺苷酸化信號）。

【0422】 在一個實施例中，製備CTP修飾的多肽（例如相關CTP修飾的多肽）之方法包括如下步驟：包括使用表現載體，其中所述表現載體包括啟動子、CTP修飾的多肽之編碼序列及聚腺苷酸化序列。在另一實施例中，多肽為相關多肽。在另一實施例中，聚腺苷酸化序列為猴病毒（SV）40聚腺苷酸化序列。

【0423】 在一個實施例中，多種原核或真核細胞可以用作宿主表現系統以表現本文揭示之多肽。在一些實施例中，此等宿主表現系統包含（但不限於）微生物，諸如經含有多肽編碼序列之重組噬菌體DNA、質體DNA或黏質體DNA表現載體轉型的細菌；經含有多肽編碼序列之重組酵母表現載體轉型的酵母；經重組病毒表現載體（例如花椰菜花葉病毒，CaMV；菸草花葉病毒，TMV）感染或經含有多肽編碼序列之重組質體表現載體（諸如Ti質體）轉型的植物細胞系統。

【0424】 在一個實施例中，使用非細菌表現系統（例如哺乳動物表現系統，諸如CHO細胞或衍生自CHO細胞之細胞）以表現本文揭示之多肽。在一個實施例中，用於在哺乳動物細胞中表現本文揭示之聚核苷酸的

表現載體為包括CMV啟動子及新黴素抗性基因之pCI-DHFR載體。

【0425】 在一個實施例中，本文揭示之表現載體可進一步包含允許例如自單一mRNA（諸如內部核糖體進入位點（IRES））轉譯數種蛋白質的其他聚核苷酸序列及用於基因組整合啟動子-嵌合多肽之序列。

【0426】 在一些實施例中，哺乳動物表現載體包含（但不限於）pcDNA3、pcDNA3.1(+/-)、pGL3、pZeoSV2(+/-)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81，其可購自Invitrogen；pCI，其可購自Promega；pMbac、pPbac、pBK-RSV及pBK-CMV，其可購自Strategene；pTRES，其可購自Clontech；及其衍生物。

【0427】 在一些實施例中，本文揭示之方法使用含有來自真核病毒（諸如逆轉錄病毒）之調控元件的表現載體。SV40載體包含pSVT7及pMT2。在一些實施例中，衍生自牛乳頭瘤病毒之載體包含pBV-1MTHA，並且衍生自EB病毒（Epstein Bar virus）之載體包含pHEBO及p2O5。其他例示性載體包含pMSG、pAV009/A$^+$、pMTO10/A$^+$、pMAMneo-5、桿狀病毒pDSVE以及允許蛋白質在SV-40早期啟動子、SV-40晚期啟動子、金屬硫蛋白啟動子、鼠乳房腫瘤病毒啟動子、勞斯肉瘤病毒（Rous sarcoma virus）啟動子、多角體蛋白啟動子或顯示為對於在真核細胞中之表現有效的其他啟動子的指導下表現的任何其他載體。

【0428】 在一個實施例中，各種方法可用於將編碼本文揭示之相關CTP修飾的多肽之表現載體引入至細胞中。用聚核苷酸或表現載體「轉染」真核宿主細胞會產生經基因修飾的細胞或轉殖基因細胞，其可藉由本領域中熟知的任何方法執行，且所述方法描述於例如Sambrook等人，《分

子選殖：實驗室手冊（Molecular Cloning: A Laboratory Manual）》，冷泉港實驗室（Cold Springs Harbor Laboratory），紐約(1989, 1992)，Ausubel等人，《現行分子生物學方案（Current Protocols in Molecular Biology）》，John Wiley and Sons, 馬里蘭州巴爾的摩（Baltimore, Md.） (1989)，Chang等人，《體細胞基因療法（Somatic Gene Therapy）》，CRC Press, 密西根州安娜堡（Ann Arbor, Mich.）(1995)，Vega等人，《基因靶向（Gene Targeting）》，CRC Press, 密西根州安娜堡 (1995)，《載體：分子選殖載體及其用途之調查（Vectors: A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses）》，Butterworths, 麻薩諸塞州波士頓（Boston Mass.） (1988)及Gilboa等人 [《生物技術（Biotechniques）》 4 (6): 504-512, 1986]且包含例如穩定或暫時轉染及電穿孔。另外，關於陽性-陰性選擇方法，參見美國專利第5,464,764號及第5,487,992號。轉染方法進一步包含（但不限於）脂質體介導的轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子（諸如DEAE-聚葡萄糖）介導的轉染、原生質體融合、病毒感染（包含重組病毒感染）及顯微注射。較佳地，轉染為穩定轉染。提供編碼本文揭示之相關肽之異質基因在特定宿主細胞株及類型中的最佳轉染頻率及表現之轉染方法為有利的。合適的方法可以藉由例行程序確定。為了穩定的轉染物，將構築體整合至宿主細胞之基因組或人造染色體/微染色體中或游離地安置以便穩定維持在宿主細胞中。

【0429】 除非另外指明，否則本文揭示之實踐將利用在熟習此項技術者之技術範圍內之細胞生物學、分子生物學、細胞培養、免疫學及其類似學科之習知技術。此等技術充分揭示於當前文獻中。參見例如

Sambrook等人，《分子選殖：實驗室手冊》，第2版，冷泉港實驗室出版社（Cold Springs Harbor Laboratory Press），紐約冷泉港（Cold Spring Harbor, N. Y.）(1989)；Ausubel等人，《現行分子生物學方案》(1987, 最新)；Brown編，《基礎分子生物學（Essential Molecular Biology）》，IRL Press (1991)；Goeddel編，《基因表現技術（Gene Expression Technology）》，Academic Press (1991)；Bothwell等人編，《真核基因之選殖及分析的方法（Methods for Cloning and Analysis of Eukaryotic Genes）》，Bartlett Publ. (1990)；Wu等人編，《重組DNA方法（Recombinant DNA Methodology）》，Academic Press (1989)；Kriegler，《基因轉移及表現（Gene Transfer and Expression）》，Stockton Press (1990)；McPherson等人，《PCR：實用方法（PCR: A Practical Approach）》，IRL Press於牛津大學出版社（Oxford University Press）(1991)；Gait編，《寡核苷酸合成（Oligonucleotide Synthesis）》(1984)；Miller及Calos編，《哺乳動物細胞之基因轉移載體（Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells）》(1987)；Butler編，《哺乳動物細胞生物技術（Mammalian Cell Biotechnology）》(1991)；Pollard等人編，《動物細胞培養（Animal Cell Culture）》，Humana Press (1990)；Freshney等人編，《動物細胞之培養（Culture of Animal Cells）》，Alan R. Liss (1987)；Studzinski編，《細胞生長及細胞凋亡，實用方法（Cell Growth and Apoptosis, A Practical Approach）》，IRL Press於牛津大學出版社 (1995)；Melamed等人編，《流式細胞儀及分選（Flow Cytometry and Sorting）》，Wiley-Liss (1990)；《當前細胞計數方案（Current Protocols in Cytometry）》，John Wiley & Sons, Inc. (最

新)；Wirth及Hauser, 《動物細胞之基因工程化（Genetic Engineering of Animals Cells）》, 於: 《生物技術（Biotechnology）》 第2卷, Pühler編, VCH, Weinheim 663-744；《酶學之系列方法（the series Methods of Enzymology）》 (Academic Press, Inc.)；及Harlow等人編, 《抗體：實驗室手冊（Antibodies: A Laboratory Manual）》 (1987)。

【0430】 編碼相關CTP修飾的多肽之相關異質基因可藉由各種方法，例如藉由病毒轉化、轉染或顯微注射引入至本文揭示之細胞中。相關異質基因可以線性DNA形式或以表現載體之一部分形式引入至細胞中。已知允許用於插入一個或多個異質基因及其表現之多個選殖位點的許多真核表現載體。商業供應商尤其包含諸如以下之公司：Stratagene, 美國加州拉荷亞（La Jolla, Calif., USA）; Invitrogen, 美國加州喀斯巴德（Carlsbad, Calif., USA）; Promega, 美國威斯康星州麥迪遜（Madison, Wis., USA）或BD Biosciences Clontech, 美國加州帕羅奧多（Palo Alto, Calif., USA）。用編碼一種或多種相關基因之DNA或表現載體轉染細胞係利用如例如Sambrook等人, 1989或Ausubel等人, 1994中所述之習知方法進行的。合適的轉染方法包含例如脂質體介導的轉染、磷酸鈣共沈澱、電穿孔、聚陽離子（例如DEAE聚葡萄糖）介導的轉染、原生質體融合、顯微注射及病毒感染。較佳地，進行穩定轉染，其中DNA分子整合至宿主細胞之基因組或人造染色體/微染色體中或以穩定方式游離地含於宿主細胞中。在所討論之宿主細胞中得到一種或多種相關異質基因之最佳轉染頻率及表現的轉染方法為較佳的。

【0431】 在一些實施例中，藉由病毒感染引入核酸提供相較於其他方法，諸如脂質體轉染及電穿孔之若干優點，因為可由於病毒之感染性質

而獲得較高轉染效率。

【0432】 在一個實施例中，應瞭解，本文揭示之多肽亦可自採用上文描述的任何合適的投予模式（亦即活體內基因療法）投予個體之核酸構築體表現。在一個實施例中，核酸構築體按需要經由適當基因運載工具/方法（轉染、轉導、同源重組等）及表達系統引入至合適的細胞且接著經修飾細胞在培養物中擴增且返回至個體（即，離體基因療法）。

【0433】 相關異質基因通常在功能上連接至允許轉錄相關基因之啟動子及允許轉錄及轉譯（表現）相關基因或增加其效率的其他調控元件。

【0434】 熟練的業內人士將瞭解，術語「啟動子」可涵蓋會實現及控制功能上與其連接之基因或序列之轉錄的聚核苷酸序列。啟動子含有用於結合RNA聚合酶之識別序列及用於轉錄之起始位點（轉錄起始位點）。為了在某些細胞類型或宿主細胞中表現所期望的序列，必須選擇合適的功能啟動子。熟練技術人員將熟悉來自各種來源之多種啟動子，包含組成型、誘導型及可抑制型啟動子。其例如寄存在諸如Genbank之資料庫中，且可以來自商業或個體來源之獨立元件或在聚核苷酸序列中選殖之元件形式獲得。在誘導型啟動子中，啟動子之活性可回應於信號而減小或增大。誘導型啟動子之一個實例為四環素（tet）啟動子。此含有四環素操縱子序列（tetO），其可由四環素調節的反式激活蛋白（tTA）誘導。在四環素存在下，tTA與tetO之結合得以抑制。其他誘導型啟動子之實例為jun、fos、金屬硫蛋白及熱休克啟動子（亦參見Sambrook, J., Fritsch, E. F.及Maniatis, T.,《分子選殖：實驗室手冊》 冷泉港實驗室, 紐約冷泉港, 1989；Gossen, M.等人,《生物技術新觀點（*Curr Opi Biotech*）》 1994, 5, 516-520）。在尤其適用於在真核生物中高度表現之啟動子中，存在例

如倉鼠之泛素/S27a啟動子（WO 97/15664）、SV 40早期啟動子、腺病毒主要晚期啟動子、小鼠金屬硫蛋白-1啟動子、勞斯肉瘤病毒之長末端重複序列區及人類巨細胞病毒之早期啟動子。其他異質哺乳動物啟動子之實例為肌動蛋白、免疫球蛋白或熱休克啟動子。

【0435】 舉例而言，啟動子可在功能上連接至強化子序列以便增加轉錄活性。為此，可使用一種或多種強化子及/或強化子序列之數個複本，例如CMV或SV40強化子。舉例而言，啟動子可在功能上連接至強化子序列以便增加轉錄活性。為此，可使用一種或多種強化子及/或強化子序列之數個複本，例如CMV或SV40強化子。

【0436】 熟練的業內人士將瞭解，術語強化子可涵蓋在順式位置中作用於啟動子之活性且由此刺激在功能上與此啟動子連接之基因之轉錄的聚核苷酸序列。不同於啟動子，強化子之作用與位置及定向無關，且其可因此位於轉錄單元之前面或後面中，位於內含子內或甚至位於編碼區內。強化子可緊鄰轉錄單元及與啟動子距相當大的距離定位。亦可與啟動子具有實體及功能重疊。熟練的業內人士將瞭解來自各種來源之許多強化子（且寄存在諸如Genbank之資料庫中，例如SV40強化子、CMV強化子、多瘤病毒強化子、腺病毒強化子），其以獨立元件形式或在聚核苷酸序列中選殖之元件得到（例如寄存在ATCC或來自商業及個體來源）。許多啟動子序列亦含有強化子序列，諸如經常使用的CMV啟動子。人類CMV強化子為迄今鑑別之最強的強化子之一。誘導型強化子之一個實例為金屬硫蛋白強化子，其可由糖皮質激素或重金屬刺激。

【0437】 基本上，調控元件包含啟動子、強化子、終止及聚腺苷酸化信號及其他表現控制元件。已知誘導型及組成性調節序列均用於各種細

胞類型。「轉錄調控元件」通常包括欲表現之基因序列之啟動子上游、轉錄起始及終止位點及聚腺苷酸化信號。

【0438】 熟練的業內人士將瞭解，術語「轉錄起始位點」可涵蓋構築體中之核酸，其對應於併入初始轉錄物（亦即，mRNA前驅物）中之第一核酸。轉錄起始位點可與啟動子序列重疊。

【0439】 熟練的業內人士將瞭解，術語「轉錄終止位點」可涵蓋核苷酸序列，其通常在相關基因或待轉錄之基因區段之3'端處，且其引起利用RNA聚合酶之轉錄終止。

【0440】 熟練的業內人士將瞭解，術語「聚腺苷酸化信號」可涵蓋信號序列，其引起在真核mRNA之3'端處的特定位點處之裂解及在所裂解的3'端處轉錄後併入約100-200個腺嘌呤核苷酸（polyA尾）之序列。聚腺苷酸化信號包括在裂解位點上游約10-30個核苷酸處之序列AATAAA及位於下游的序列。各種聚腺苷酸化元件為已知的，諸如tk polyA、SV40晚期及早期polyA或BGH polyA（例如描述在美國專利第5,122,458號中）。

【0441】 對於各欲表現之多肽，「轉譯調控元件」包括轉譯起始位點（AUG）、終止密碼子及polyA信號。為了最佳表現，合理的可為移除、添加或改變將表現之核酸序列之5'非轉譯區及/或3'非轉譯區，以便消除任何可能不合適的其他轉譯起始密碼子或其他可能在轉錄或表現水準下影響表現之序列。為了促進表現，緊接著起始密碼子之上游可替代地插入核糖體共同結合位點。為了製造分泌的多肽，相關基因通常含有編碼信號前驅肽之信號序列，所述信號前驅肽將合成的多肽運送至ER膜且穿過ER膜。信號序列通常但未必總是位於所分泌蛋白質之胺基末端，且其在蛋白

質已滲透穿過ER膜之後由信號肽酶裂解。基因序列將通常但未必含有其自身信號序列。若原生信號序列不存在，則可以已知方式引入異質信號序列。許多此類信號序列為熟練的業內人士已知且寄存在諸如GenBank及EMBL之序列資料庫中。

【0442】 熟練的業內人士將瞭解，術語「多肽（polypeptides）」、「多肽（polypeptide）」或其語法上的等同表述可互換使用以涵蓋胺基酸序列或蛋白質，且可涵蓋任何長度之胺基酸之聚合物。此術語亦包含已藉由諸如糖基化、磷酸化、乙醯化或蛋白處理之反應經轉譯後修飾的蛋白質。多肽之結構可例如在保持其生物活性的同時藉由胺基酸之取代、缺失或插入及與其他蛋白質融合來修飾。

【0443】 為了在細胞中製造一種或多種相關基因產物，細胞可在允許表現相關基因之條件下生長在無血清培養基中及懸浮培養物中。若例如相關基因在組成型啟動子之控制下，則無需添加特殊誘導劑。舉例而言，若相關基因之表現在誘導型啟動子之控制下，則必須將相應誘導劑以足夠但無毒性的濃度添加至細胞培養基中。細胞可視需要藉由多次繼代接種並轉移至合適的細胞培養器皿中來擴增。基因產物為或產生為細胞、膜結合或分泌產物。

【0444】 在一個實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之步驟包括用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分的表現載體穩定轉染預定數量的細胞。在另一實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之步驟包括用包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分的表現載體穩定轉染細胞。在一個實施例中，細胞為CHO細胞。在另一實施例中，細胞為DG44細胞。在另一實施例中，細胞為本領域中已知適用於表現並分泌相關CTP修飾的多

肽之任何細胞。

【0445】 在另一實施例中，經轉染的細胞表現相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，所製造並表現之相關CTP修飾的多肽由連接至所述相關多肽之羧基末端的兩個CTP及連接至所述相關多肽之胺基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在另一實施例中，所製造並表現之相關CTP修飾的多肽由連接至所述相關多肽之羧基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在其他實施例中，相關CTP修飾的多肽以較高表現量表現。在另一實施例中，所述相關CTP修飾的多肽經高度糖基化。在另一實施例中，所述相關CTP修飾的多肽經高度唾液酸化。如上文詳細所述，相關CTP修飾的多肽可具有不同的糖基化水準及模式。利用本文所揭示之方法製造的相關CTP修飾的多肽可包含如上文所揭示之糖基化模式及含量中之任一者。通常，此處呈現之製造方法提供相關CTP修飾的多肽，其具有較高糖基化水準及較高的經糖基化之糖基化位點百分比。

【0446】 在一個實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之步驟包括獲得過度表現相關CTP修飾的多肽之細胞純系。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽之表現最佳。在另一實施例中，表現量在30-1500 mg/L之間。在另一實施例中，表現量為至少30 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少40 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少50 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少60 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少70 mg/L。在另一實施例中，表現量在50-70 mg/L之間。在另一實施例中，表現量為至少200 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少300 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少400 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少500 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少600 mg/L。在另一實施例

中，表現量為至少700 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少800 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少900 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1000 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1100 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1200 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1300 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1400 mg/L。在另一實施例中，表現量為至少1500 mg/L。在另一實施例中，步驟（b）中之純系在培養基中繁殖，以形成主細胞庫（MCB）及工作細胞庫（WCB）。在一個實施例中，步驟（c）中之純系獲自MCB。在另一實施例中，步驟（c）中之純系獲自WCB。

【0447】 相關產物以分泌的基因產物形式獲自細胞培養基。然而，若蛋白質或多肽在無分泌信號之情況下表現，則基因產物亦可自細胞溶解物分離。為了獲得基本上不含其他重組蛋白及宿主細胞蛋白之純均質產物，進行習知純化程序。首先，時常自培養基或溶解物移除細胞及細胞殘渣。所期望的基因產物可接著自污染性可溶蛋白、多肽及核酸釋放，例如藉由在免疫親和力及離子交換管柱上分級分離、乙醇沈澱、逆相HPLC或在葡聚糖凝膠、羥基磷灰石、二氧化矽上之層析或陽離子交換樹脂（諸如DEAE）（參見本文中實例）進行。本領域中已知且引起由重組宿主細胞表現之異質蛋白純化的方法為熟練技術人員已知且描述於例如Harris等人（Harris等人，《蛋白質純化：一種實踐方法（Protein Purification: A Practical Approach）》，Pickwood及Hames編，IRL Press，牛津（Oxford），1995）及Scopes（Scopes，R.，《蛋白質純化（Protein Purification）》，Springer Verlag，1988）之文獻中。此等方法可全部或部分用於本文所揭示之方法。

【0448】 在另一實施例中，本文揭示一種在無血清條件下在哺乳動物細胞中製備一種或多種產物之方法，其特徵在於（i）哺乳動物細胞含有編碼本文揭示之相關肽之相關基因；（ii）哺乳動物細胞在允許哺乳動物細胞複製之無血清條件下生長；（iii）在各種情況下，此等哺乳動物細胞中之至少一（1）種在無血清條件下沈積在細胞培養器皿中；（iv）適合沈積之哺乳動物細胞在無血清條件下複製；（v）所複製細胞在其中表現相關基因之無血清條件下培育；以及（vi）基因產物接著自細胞或培養物上清液分離且經純化。在此方法之另一實施例中，哺乳動物細胞為其中已引入相關基因之經轉染哺乳動物細胞。因此，本文揭示之方法亦關於一種製備重組基因產物之方法，其特徵在於在上文所述方法之步驟（i）之前，哺乳動物細胞經至少編碼相關基因之核酸轉染。相應哺乳動物細胞之穩定轉染為較佳的。

【0449】 無血清、無蛋白質或化學成分確定之培養基之實例包含例如商業可獲得的培養基哈姆氏F12（Ham's F12）（西格瑪（Sigma），德國戴森霍芬（Deisenhofen, DE））、RPMI 1640（西格瑪）、杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基（Dulbecco's Modified Eagle's medium，DMEM; 西格瑪）、基本必需培養基（MEM; 西格瑪）、伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基（Iscove's Modified Dulbecco's medium，IMDM; 西格瑪）、CDCHO（Invitrogen，美國加州喀斯巴德）、CHO-S-SFMII（Invitrogen）、無血清CHO培養基（西格瑪）、CD-PowerCHO2培養基（Lonza）及無蛋白質CHO培養基（西格瑪）。此等培養基中之每一種必要時可補充有各種化合物，諸如激素及/或其他生長因子（例如胰島素、運鐵蛋白、表皮生長因子、胰島素樣生長因子）、鹽（例如氯化鈉、磷酸

鈣、磷酸鎂）、緩衝劑（例如HEPES）、核苷（例如腺苷、胸苷）、麩醯胺酸、葡萄糖或其他等效營養物、抗生素及/或微量元素或市售進料，諸如Power Feed A（Lonza）。若可複製的細胞為表現一種或多種可選擇標記物之重組細胞，則亦可將一種或多種合適的選擇劑（諸如抗生素）添加至培養基中。

【0450】 應瞭解，除含有對於所插入編碼序列（編碼多肽）之轉錄及轉譯所必需的元件以外，本文揭示之表現構築體亦可包含經工程化以使所表現多肽之穩定性、產生、純化、產率或活性最佳化的序列。

【0451】 在一些實施例中，經轉型細胞在允許表現較高量重組多肽之有效條件下培養。在一些實施例中，有效培養條件包含（但不限於）允許蛋白質產生之有效培養基、生物反應器、溫度、pH及氧氣條件。熟練的業內人士將瞭解，術語「有效培養基」可涵蓋其中培養細胞以製造本文揭示之重組多肽的任何培養基。在一些實施例中，培養基通常包含具有可同化的碳、氮及磷酸根來源以及適當鹽、礦物質、金屬及其他營養素（諸如維生素）之水溶液。在一些實施例中，本文揭示之細胞可在習知醱酵生物反應器、搖瓶、試管、微量滴定培養皿及皮氏培養盤（petri plate）中進行培養。在一些實施例中，培養在適於重組細胞之溫度、pH及氧含量下進行。在一些實施例中，培養條件在本領域中普通技術人員之專門知識中。

【0452】 在一個實施例中，培養條件包括約20-80%之溶解氧（DO）含量。在另一實施例中，DO含量為約20-30%。在另一實施例中，DO含量為約30-40%。在另一實施例中，DO含量為約40-50%。在另一實施例中，DO含量為約50-60%。在另一實施例中，DO含量為約60-

70%。在另一實施例中，DO含量為約70-80%。

【0453】 在一個實施例中，培養條件包括在一個溫度下開始且在製造期間偏移至另一者之pH。在另一實施例中，pH在約7.3下開始且在生物反應器培育期間偏移至約6.7。在另一實施例中，pH在約7.3、約7.2或約7.1下開始且在生物反應器培育期間偏移至約6.7、約6.8、約6.9或約7.0。各可能性表示本文揭示之一實施例。

【0454】 在一些實施例中，取決於用於製造之載體及宿主系統，本文揭示之所得多肽留存在重組細胞中，或分泌至培養基中。

【0455】 在一個實施例中，在培養物中預定時間之後，進行重組多肽之回收。

【0456】 熟練的業內人士將瞭解，本文中所用之短語「回收重組多肽」可涵蓋收集含有多肽之整個培養基，且可隱含其他分離或純化步驟。

【0457】 在一個實施例中，本文揭示之多肽使用多種標準蛋白質純化技術純化，諸如（但不限於）親和層析、離子交換層析、過濾、電泳、疏水性相互作用層析、凝膠過濾層析、逆相層析法、刀豆球蛋白A層析、羥基磷灰石層析、層析聚焦及差異溶解。

【0458】 在一個實施例中，每一管柱可在受控制或不受控制的溫度下運作。

【0459】 在一個實施例中，為了有助於回收，所表現之編碼序列可以經工程化以編碼本文揭示之蛋白質且融合至可裂解部分。在一個實施例中，融合蛋白可以被設計成使得多肽可容易地藉由親和層析分離；例如藉由固定於對可裂解部分具有特異性之管柱上來分離。在一個實施例中，裂解位點在多肽與可裂解部分之間經工程化，且多肽可藉由用特異性裂解此

位點處之融合蛋白的適當酶或試劑處理而從層析管柱釋放[例如參見Booth等人，《免疫學通訊（Immunol. Lett.）》 19:65-70 (1988)；及Gardella等人，《生物化學期刊（J. Biol. Chem.）》 265:15854-15859 (1990)]。

【0460】 在一個實施例中，本文揭示之多肽以「基本上純」形式取回。熟練的業內人士將瞭解，短語「基本上純」可涵蓋允許在本文所述之應用中有效使用蛋白質之純度。此類形式亦可包含亦如本文揭示之高度糖基化及高度唾液酸化形式。

【0461】 在一個實施例中，本文揭示之個體為人類個體。在另一實施例中，個體為家養動物。在另一實施例中，個體為寵物。在另一實施例中，個體為哺乳動物。在另一實施例中，個體為農場動物。在另一實施例中，個體為猴。在另一實施例中，個體為馬。在另一實施例中，個體為母牛。在另一實施例中，個體為小鼠。在另一實施例中，個體為大鼠。在另一實施例中，個體為犬。在另一實施例中，個體為貓。在另一實施例中，個體為牛類動物、綿羊類動物、豬類動物、馬類動物、鼠類動物或鹿類動物。在一個實施例中，個體為雄性。在另一實施例中，個體為雌性。在一個實施例中，個體為幼年，在另一實施例中，青年，在另一實施例中，成年，或在另一實施例中，老年個體。在另一實施例中，個體為小兒個體，在另一實施例中，老齡個體。

【0462】 在一個實施例中，本文揭示之多肽使用活體外表現系統合成。在一個實施例中，活體外合成方法在本領域中為熟知的並且系統之組分為市售的。

【0463】 在一個實施例中，使用重組DNA技術製造由CTP修飾之相關多肽。

【0464】 在一些實施例中，重組多肽經合成並純化；可在活體內或活體外分析其治療功效。在一個實施例中，由本文揭示之CTP修飾的重組相關多肽之結合活性可使用各種分析確定。

【0465】 在一個實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之方法包括以下步驟：自所述WCB獲得最佳表現所述相關CTP修飾的多肽之純系，且擴增所述純系。在另一實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之方法包括以下步驟：自所述MCB獲得最佳表現所述相關CTP修飾的多肽之純系，且擴增所述純系。在另一實施例中，細胞純系在溶液中經由一系列轉種步驟擴增至生產用生物反應器水準。在另一實施例中，將含有所述經轉種純系之溶液接種於生物反應器中。在另一實施例中，生物反應器為拋棄式生物反應器。在另一實施例中，生物反應器包括不鏽鋼生物反應器、搖擺運動生物反應器（諸如來自GE之Wave系統）、灌注生物反應器或本領域中已知的任何其他生物反應器系統。在一個實施例中，自生物反應器移除細胞藉由使用拋棄式過濾器系統來實現。若進行大規模製造，則可在使用過濾系統之前使用連續離心。

【0466】 在一個實施例中，細胞純系藉由在大小逐漸增加之生物反應器中連續培養所述細胞來進一步擴增或規模放大，直至達到所期望的規模。在另一實施例中，生物反應器以分批進料模式運作。在另一實施例中，生物反應器以分批模式運作。在另一實施例中，生物反應器以重複分批模式運作。在另一實施例中，生物反應器以灌注模式運作。上文所述之各可能性為另一實施例。

【0467】 視所使用之生物反應器類型而定，峰值活細胞密度不同。在一個實施例中，本文揭示之製造方法中使用的生物反應器之峰值活細胞

密度為約0.2×10^6-1.4×10^6個細胞/毫升。在另一實施例中，本文揭示之製造方法中使用之生物反應器的峰值活細胞密度為約0.05×10^6-100×10^6。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約0.05×10^6-0.5×10^6。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約0.5×10^6-5×10^6。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約5.0×10^6-50×10^6。在另一實施例中，生物反應器之峰值活細胞密度為約50×10^6-100×10^6。

【0468】 生物反應器使用之進料流程可不同，例如自某一天起重複每天進料，或在數天內不變，此外所添加之進料%可不同，自很小%至甚至50%或更大。各可能性為本文揭示之一實施例。

【0469】 DMSO可以如本領域中已知的不同濃度添加至生物反應器中。在一個實施例中，將0.1-3% DMSO在生物反應器使用期間添加至生物反應器中。在另一實施例中，添加0.1-0.5% DMSO。在另一實施例中，添加0.5-1.0% DMSO。在另一實施例中，添加1.0-1.5% DMSO。在另一實施例中，添加1.5-2.0% DMSO。在另一實施例中，添加2.0-2.5% DMSO。在另一實施例中，添加2.5-3.0% DMSO。

【0470】 在一個實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之方法包括純化澄清的收集物溶液以便獲得經純化的蛋白質溶液之步驟。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少5-95%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少5%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少10%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少20%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，使用所呈現

之方法製造的經純化的蛋白質溶液。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少30%相關CTP修飾的多肽，包括至少40%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少50%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少60%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少70%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少80%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液包括至少90%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，使用本文中呈現之方法製造的經純化的蛋白質溶液包括至少95%相關CTP修飾的多肽。

【0471】 在一個實施例中，澄清的收集物在2-25℃下保持至24小時。在另一實施例中，澄清的收集物在至少5℃下儲存至一個月。

【0472】 在一個實施例中，測試在步驟（e）中所獲得之澄清的收集物之生物負荷、細菌內毒素、特定蛋白質含量、殘餘DNA、病毒、病毒樣粒子及/或支原體或其任何組合。

【0473】 在一個實施例中，步驟（f）中之澄清的收集物之純化藉由依序進行包括以下各項之步驟來實現：（g）濃縮、透濾並純化所述澄清的收集物溶液，其中所述濃縮、透濾及純化藉由中空纖維卡匣或切向流卡匣使所述澄清的收集物溶液依序通過陰離子交換管柱及疏水性相互作用管柱來實現；（h）獲得在步驟之後獲得之所述澄清的收集物；（i）以及藉由在對病毒有毒性之溶液中培育來使所述澄清的收集物中存在之所述病毒不活化；（j）獲得來自（h）之所述澄清的收集物溶液，且濃縮、透濾並純化所述澄清的收集物溶液，其中所述濃縮、透濾以及純化之後為使所述

澄清的收集物溶液依序通過羥基磷灰石混合模式管柱及陽離子交換管柱；（j）在步驟（i）之後獲得所述澄清的收集物溶液，並藉由奈米過濾以物理方式自病毒移除所述澄清的收集物溶液；（k）在步驟（j）之後獲得所述澄清的收集物溶液，且濃縮、透濾並純化所述澄清的收集物溶液，獲得含有所述CTP修飾的多肽之高度糖基化形式之經最大限度純化之澄清的收集物。

【0474】 在一個實施例中，超濾及透濾至濃縮及過濾澄清的收集物可使用中空纖維濾筒或等效的基於TFF之UFDF步驟進行。濾筒標稱分子量截斷大小為10,000 kDa。在另一實施例中，膜濾筒可遵照截斷為3 kDa至30 kDa之PES/PS/RC膜。

【0475】 在另一實施例中，步驟（g）之陰離子交換管柱為DEAE-瓊脂糖快速流動管柱。在另一實施例中，DEAE管柱純化所述相關CTP修飾的多肽之高度糖基化形式。在一個實施例中，糖基化愈高，相關CTP修飾的多肽之藥效學愈好。在另一實施例中，陰離子交換管柱可包括本領域中已知的其他陰離子交換管柱，例如Capto DEAE陰離子交換管柱或其他樹脂，諸如Eshmuno Q。

【0476】 在一個實施例中，步驟（g）之疏水性管柱為苯基疏水性相互作用層析（HIC）管柱。苯基HIC之使用循環次數可在介於約1-10次之間的範圍內。在一個實施例中，進行1-3個循環。在另一實施例中，進行1-5個循環。在另一實施例中，進行1-6個循環。在另一實施例中，進行1-7個循環。在另一實施例中，進行1-8個循環。在另一實施例中，進行1-9個循環。在另一實施例中，進行1-10個循環。在另一實施例中，本領域中已知的緩衝液用於洗滌及溶離。在一個實施例中，溶離緩衝液包括硫酸銨

與丙二醇。在一個實施例中，溶離緩衝液包括硫酸銨與乙二醇。

【0477】 在一個實施例中，羥基磷灰石混合模式管柱包括陶瓷羥基磷灰石混合模式管柱（CHT）。CHT之使用循環次數可在介於約1-10之間的範圍內。在一個實施例中，進行1-3個循環。在另一實施例中，進行1-5個循環。在另一實施例中，進行1-6個循環。在另一實施例中，進行1-7個循環。在另一實施例中，進行1-8個循環。在另一實施例中，進行1-9個循環。在另一實施例中，進行1-10個循環。自CHT管柱溶離可用在約3-10之間的管柱體積（CV）進行。在一個實施例中，溶離用約3個CV進行。在另一實施例中，溶離用約4個CV進行。在另一實施例中，溶離用約5個CV進行。在另一實施例中，溶離用約6個CV進行。在另一實施例中，溶離用約7個CV進行。在另一實施例中，溶離用約8個CV進行。在另一實施例中，溶離用約9個CV進行。在另一實施例中，溶離用約10個CV進行。

【0478】 在一個實施例中，使由於污染而可能存在於澄清的收集物中之病毒在澄清的收集物中不活化。在另一實施例中，病毒使用1% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用0.2至2% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用0.5% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用1-4% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用0.2-0.5% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用0.5-1.0% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用2% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用3% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用4% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，病毒使用5-10% Triton-X 100溶液不活化。在另一實施例中，在Triton-X 100溶液中之病毒不活化持續約0.5至

24小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約0.5至1小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約1至2小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約2至3小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約3至4小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約4至6小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約6至8小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約8至10小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約10至12小時。在另一實施例中，在Triton-X溶液中之病毒不活化持續約12至24小時。

【0479】 熟練的業內人士應瞭解，本領域中可供使用且對此等病毒有毒性之其他濃度或其他溶液（包含（但不限於）膽酸鈉及Tween 80）可用於本文揭示之方法。在另一實施例中，磷酸三正丁酯（TNBP）與聚山梨醇酯80（Tween 80）之混合物用於在步驟（h）中使病毒不活化。

【0480】 在一個實施例中，病毒藉由使用奈米過濾以物理方式移除。熟練的業內人士應瞭解，本領域中已知用於移除病毒之任何過濾器可在本文揭示之方法中施用。在另一實施例中，奈米過濾使用Planova或Planova型過濾器濾筒（1-60 mm^2）進行。所述方法之後為使用本領域中已知的方法證實病毒自澄清的收集物清除。

【0481】 在一個實施例中，本文中步驟（i）之陽離子交換管柱為SP-瓊脂糖快速流動管柱。在另一實施例中，陽離子交換管柱包括CM瓊脂糖Capto S。在另一實施例中，陽離子交換管柱包括本領域中已知用於本文中目的之任一者。

【0482】 在一個實施例中，本文所揭示之方法實現經高度糖基化的

相關CTP修飾的多肽之至少20%回收率在另一實施例中，所述方法實現經高度糖基化的相關CTP修飾的多肽之至少5%回收率、至少10%、至少15%、20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.9%回收率。

【0483】 在一個實施例中，在純化經高度糖基化的相關CTP修飾的多肽之後，本文所揭示之方法進一步包括表徵所述CTP修飾的多肽。在另一實施例中，測定相關CTP修飾的多肽之純度。在另一實施例中，測定糖基化水準。在另一實施例中，測定糖基化位點佔有率。在一個實施例中，測定所製造之相關CTP修飾的多肽中之純度、糖基化水準以及糖基化位點佔有率。

【0484】 在另一實施例中，將用於本文揭示之方法中的細胞純系儲存在冷凍細胞庫中。在另一實施例中，將細胞純系儲存在凍乾細胞庫中。

【0485】 在另一實施例中，本文揭示之方法及組合物之細胞庫為主細胞庫。在另一實施例中，細胞庫為工作細胞庫。在另一實施例中，細胞庫為良好作業規範（GMP）細胞庫。在另一實施例中，細胞庫旨在用於製造臨床級材料。在另一實施例中，細胞庫符合監管規範以便人類使用。在另一實施例中，細胞庫為本領域中已知的任何其他類型之細胞庫。

【0486】 在另一實施例中，「良好作業規範」由美國聯邦法規法典（the United States Code of Federal Regulations）之（21 CFR 210-211）定義。在另一實施例中，「良好作業規範」由用於製造臨床級材料或用於人類消費之其他標準定義；例如除美國以外的國家之標準。各可能性代表本文所揭示之一各別實施例。

【0487】 在另一實施例中，用於繁殖細胞之培養基含有甲胺喋呤（MXT）。在另一實施例中，培養基為無甲胺喋呤之培養基。在另一實施例中，存在於培養基中之MXT的濃度在約0.1-2 μM之間。在另一實施例中，存在於培養基中之MXT的濃度為約0.1-0.5 μM。在另一實施例中，存在於培養基中之MXT的濃度為約0.5-1.0 μM。在另一實施例中，存在於培養基中之MXT的濃度為約1.0-1.5 μM。在另一實施例中，存在於培養基中之MXT的濃度為約1.5-2.0 μM。將充分瞭解到，術語「培養基」可涵蓋適用於包括本文揭示之相關CTP修飾的多肽的細胞之生長或培養的液體或凝膠或粉末。此類培養基可替代地稱為「生長培養基」或「培養基」，且可包含（但不限於）營養培養基、滋補培養基、基本培養基、鑑別培養基、運送培養基或選擇培養基。在另一態樣中，選擇培養基可適用於在製造製程期間選擇特定細胞組。

【0488】 在一個實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少5-95%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少5%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少10%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少15%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少20%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少30%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少40%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少50%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少60%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋白質溶液含有至少70%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的蛋

白質溶液含有至少80%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的溶液含有至少90-95%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的溶液含有95.1-99.9%相關CTP修飾的多肽。在另一實施例中，經純化的溶液含有100%相關CTP修飾的多肽。

【0489】 在一個實施例中，相關CTP修飾的多肽經高度糖基化。熟練的業內人士將充分瞭解到，術語「經高度糖基化」當關於相關CTP修飾的多肽時可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約70-80%之糖基化水準。在另一實施例中，經高度糖基化的相關CTP修飾的多肽具有至少70%之糖基化水準。在另一實施例中，經高度糖基化的相關CTP修飾的多肽具有至少80%之糖基化水準。在另一實施例中，術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約81-90%之糖基化水準。在另一實施例中，經高度糖基化的相關CTP修飾的多肽具有至少90%之糖基化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約91-95%之糖基化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約95.1-99%之糖基化水準。在另一實施例中，術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之100%之糖基化水準。經高度糖基化的相關多肽之CTP修飾的多肽可在針對長效相關多肽使用之方法中具有有益特性，支持投予頻率降低。與相關重組多肽相比，較高糖基化水準有助於相關CTP修飾的多肽（例如相關CTP修飾的多肽）顯著增加的水動力體積。此可引起相關CTP修飾的多肽之循環時間延長。

【0490】 在一個實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少4-6個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目在4-6之間。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少4-8個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖

數目在4-8個之間。在一個實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少6-8。在一個實施例中，每個CTP之O-聚糖數目在6-8個之間。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少4個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少5個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少6個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為至少7個。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖數目為8個。

【0491】 在一個實施例中，每個連接有一個CTP之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少4-6個。在另一實施例中，每個連接有一個CTP之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少6-8個。在另一實施例中，每個連接有一個CTP之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少4-8個。在另一實施例中，每個連接有兩個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少8-12個。在另一實施例中，每個連接有兩個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少12-16個。在另一實施例中，每個連接有兩個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少8-16個。在另一實施例中，每個連接有三個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少12-18個。在另一實施例中，每個連接有三個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少18-24個。在另一實施例中，每個連接有三個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少12-24個。在另一實施例中，每個連接有四個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少16-24個。在另一實施例中，每個連接有四個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少24-32個。在另一實施例中，每個連接有四個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少

16-32個。在另一實施例中，每個連接有五個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少20-30個。在另一實施例中，每個連接有五個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少30-40個。在另一實施例中，每個連接有五個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少20-40個。在另一實施例中，每個連接有六個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少24-36個。在另一實施例中，每個連接有六個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少36-48個。在另一實施例中，每個連接有六個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少24-48個。在另一實施例中，每個連接有七個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少28-35個。在另一實施例中，每個連接有七個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少42-56個。在另一實施例中，每個連接有七個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少28-56個。在另一實施例中，每個連接有八個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少32-48個。在另一實施例中，每個連接有八個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少48-64個。在另一實施例中，每個連接有八個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少32-64個。在另一實施例中，每個連接有九個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少36-54個。在另一實施例中，每個連接有九個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少54-72個。在另一實施例中，每個連接有九個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少36-72個。在另一實施例中，每個連接有十個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數

目為至少40-60個。在另一實施例中，每個連接有十個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少60-80個。在另一實施例中，每個連接有五個CTP單元之相關多肽之CTP修飾的多肽之O-聚糖數目為至少40-80個。

【0492】 在一個實施例中，每個CTP之O-聚糖佔有率為至少70%。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖佔有率為至少80%。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖佔有率為至少90%。在另一實施例中，每個CTP之O-聚糖佔有率為100%。

【0493】 在一個實施例中，相關CTP修飾的多肽經高度唾液酸化。熟練的業內人士應瞭解，術語「高度唾液酸化」當關於相關CTP修飾的多肽時可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約70-80%之唾液酸化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約80-90%之唾液酸化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約90-95%之唾液酸化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之約95.1-99%之唾液酸化水準。在另一實施例中，所述術語可涵蓋全部相關多肽之CTP修飾的多肽之100%之唾液酸化水準。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽中之O-聚糖結構包括單唾液酸化之核心1。

【0494】 在一個實施例中，相關多肽之CTP修飾的多肽由連接至所述相關多肽之羧基末端的兩個CTP及連接至所述相關多肽之胺基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。在另一實施例中，相關多肽之CTP修飾的多肽由連接至所述相關多肽之羧基末端的一個絨膜促性腺激素羧基末端肽組成。

【0495】 在一個實施例中，包括編碼所述相關CTP修飾的多肽之編碼部分的表現載體亦包括啟動子、所述CTP修飾的多肽之編碼序列及聚腺苷酸化序列。在一個實施例中，聚腺苷酸化序列為猴病毒（SV）40聚腺苷酸化序列。

【0496】 在一個實施例中，相關CTP修飾的多肽以介於30-1500 mg/L之間的量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少30 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少40 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少50 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少60 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少70 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少50-70 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少80 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少90 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少70-100 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少100 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少200 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少100-200 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少300 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少200-300 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少400 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少300-400 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少500 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少500-600 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少600 mg/L之量表

現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少600-700 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少700 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少701-800 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少800 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少801-900 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少900 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少901-1000 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1000 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1001-1100 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1100 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1101-1200 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1200 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1201-1300 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1300 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1301-1400 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1400 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1401-1500 mg/L之量表現。在另一實施例中，相關CTP修飾的多肽以至少1500 mg/L之量表現。

【0497】 熟練的業內人士應瞭解，術語「表現」可涵蓋異源核酸序列在宿主細胞中之轉錄及/或轉譯。所期望的相關產物/蛋白質在宿主細胞中之表現量可基於以下測定：細胞中存在之相應mRNA或cDNA之量，或由如本發明實例中之所選序列編碼的所期望的相關多肽/蛋白質之量。舉例而言，自所選序列轉錄之mRNA可藉由北方墨點雜交、核糖核酸酶

RNA保護、原位雜交至細胞RNA中或藉由PCR來定量（參見Sambrook等人, 1989；Ausubel等人, 1987更新）。由所選序列編碼之蛋白質可利用各種方法定量，例如ELISA、西方墨點法、放射免疫分析、免疫沈澱、對蛋白質生物活性之分析、對蛋白質進行免疫染色之後進行FACS分析（參見Sambrook等人, 1989；Ausubel等人, 1987更新）或均質時差式螢光（HTRF）分析。在一個實施例中，相關CTP修飾的多肽之定量包括使用逆相高效液相層析（RP-HPLC）。在另一實施例中，RP-HPLC包括C-18管柱。在另一實施例中，RP-HPLC包括C-8管柱。在另一實施例中，本文揭示之方法使用RP-HPLC以定量收集物中之相關CTP修飾的多肽（參見實例步驟3至8）。在另一實施例中，本文揭示之方法使用RP-HPLC以定量第一純化步驟中之相關CTP修飾的多肽（參見實例步驟9-12）。

【0498】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫或冷凍儲備液在解凍後展現大於90%之存活率。在另一實施例中，儲存持續不定量的時間。

【0499】 在另一實施例中，儲存持續2週。在另一實施例中，儲存持續3週。在另一實施例中，儲存持續1個月。在另一實施例中，儲存持續2個月。在另一實施例中，儲存持續3個月。在另一實施例中，儲存持續5個月。在另一實施例中，儲存持續6個月。在另一實施例中，儲存持續9個月。在另一實施例中，儲存持續1年。

【0500】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫或冷凍儲備液利用包括以下之方法冷凍保存：使細胞之培養物在本文揭示之成分確定的培養基中生長，將培養物冷凍在包括甘油之溶液中，且將細胞純系儲存在-20℃以下。在另一實施例中，溫度為約-70℃。在另一實施例中，溫度為約-70至-80℃。在另一實施例中，本文揭示之任何成分確定的培養基可用於此

方法。各成分確定的培養基表示本文揭示之一各別實施例。

【0501】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物接種自細胞庫。在另一實施例中，培養物接種自冷凍儲備液。在另一實施例中，培養物接種自起子培養物。在另一實施例中，培養物接種自群落。在另一實施例中，培養物在*生長對數中期下接種*。在另一實施例中，培養物在大致生長對數中期下接種。在另一實施例中，培養物在另一生長期下接種。

【0502】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，用於冷凍之溶液包括呈2-20%量之DMSO。在另一實施例中，量為2%。在另一實施例中，量為20%。在另一實施例中，量為1%。在另一實施例中，量為1.5%。在另一實施例中，量為3%。在另一實施例中，量為4%。在另一實施例中，量為5%。在另一實施例中，量為2%。在另一實施例中，量為2%。在另一實施例中，量為7%。在另一實施例中，量為7.5%。在另一實施例中，量為9%。在另一實施例中，量為10%。在另一實施例中，量為12%。在另一實施例中，量為14%。在另一實施例中，量為16%。在另一實施例中，量為18%。在另一實施例中，量為22%。在另一實施例中，量為25%。在另一實施例中，量為30%。在另一實施例中，量為35%。在另一實施例中，量為40%。

【0503】 在另一實施例中，添加劑為蔗糖。在另一實施例中，添加劑為本領域中已知的任何其他濃度相關的添加劑或具有抗冷凍特性之添加劑。各可能性代表本文所揭示之一各別實施例。

【0504】 在一個實施例中，本文揭示之方法及組合物中所使用之冷凍溶液包括改良性培養基及DMSO。在一個實施例中，本文揭示之方法及

組合物中所使用之冷凍溶液包括約46.255%改良性培養基及7.5% DMSO。

【0505】 在一個實施例中，細胞培養利用本領域中常規之技術生長。在另一實施例中，在細胞培養物生長期間維持恆定pH。在另一實施例中，pH維持在約7.0下。在另一實施例中，pH為約6。在另一實施例中，pH為約6.5。在另一實施例中，pH為約7.5。在另一實施例中，pH為約8。在另一實施例中，pH為6.5-7.5。在另一實施例中，pH為6-8。在另一實施例中，pH為6-7。在另一實施例中，pH為7-8。

【0506】 在另一實施例中，在培養物生長期間維持恆定溫度。在另一實施例中，溫度維持在約37℃下。在另一實施例中，溫度為37℃。在另一實施例中，溫度為25℃。在另一實施例中，溫度為27℃。在另一實施例中，溫度為28℃。在另一實施例中，溫度為30℃。在另一實施例中，溫度為32℃。在另一實施例中，溫度為34℃。在另一實施例中，溫度為35℃。在另一實施例中，溫度為36℃。在另一實施例中，溫度為38℃。在另一實施例中，溫度為39℃。

【0507】 在另一實施例中，在培養物生長期間維持恆定溶解氧濃度。在另一實施例中，溶解氧濃度維持在20%飽和下。在另一實施例中，濃度為15%飽和。在另一實施例中，濃度為16%飽和。在另一實施例中，濃度為18%飽和。在另一實施例中，濃度為22%飽和。在另一實施例中，濃度為25%飽和。在另一實施例中，濃度為30%飽和。在另一實施例中，濃度為35%飽和。在另一實施例中，濃度為40%飽和。在另一實施例中，濃度為45%飽和。在另一實施例中，濃度為50%飽和。在另一實施例中，濃度為55%飽和。在另一實施例中，濃度為60%飽和。在另一實施例中，

濃度為65%飽和。在另一實施例中，濃度為70%飽和。在另一實施例中，濃度為75%飽和。在另一實施例中，濃度為80%飽和。在另一實施例中，濃度為85%飽和。在另一實施例中，濃度為90%飽和。在另一實施例中，濃度為95%飽和。在另一實施例中，濃度為100%飽和。在另一實施例中，濃度為接近100%飽和。

【0508】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物在每器皿最大體積2公升之培養基中生長。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿200 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿300 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿500 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿750 ml。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿1 L。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿1.5 L。在另一實施例中，培養基之最大體積為每器皿2.5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿3 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿至少5 L。在另一實施例中，培養基之體積為每器皿至少10 L。

【0509】 在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿2 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿500 ml。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿750 ml。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿1 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿1.5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿2.5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿3 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿4 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿5 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿6 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每

器皿8 L。在另一實施例中，培養基之最小體積為每器皿10 L。

【0510】 在另一實施例中，當培養物之密度為1×10^{6}個活細胞（VC）/ml時，進行冷凍步驟。在另一實施例中，生物質為1.5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為1.5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為2×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為3×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為4×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為5×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為7×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為9×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為10×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為12×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為15×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為20×10^7 VC/ml。在另一實施例中，生物質為25×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為30×10^7 VC/ml。在另一實施例中，生物質為33×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為40×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質為50×10^6 VC/ml。在另一實施例中，生物質大於50×10^6 VC/ml。

【0511】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，將細胞培養物急驟冷凍在液氮中，之後儲存在最終冷凍溫度下。在另一實施例中，培養物以更漸進方式冷凍；例如藉由置放在最終儲存溫度之培養物小瓶中。在另一實施例中，培養物藉由本領域中已知的用於冷凍細胞培養物之任何其他方法冷凍。

【0512】 熟練的業內人士應瞭解，術語「細胞培養」及「組織培養」可互換使用，且表示將細胞在活體外維持在液體培養基中之懸浮培養物中或具備液體培養基之諸如玻璃、塑膠或瓊脂的表面上。通常，「細胞培養」使經緩衝以維持恆定合適的pH之培養基成為必要。細胞培養中使

用之培養基通常被調配成包含充足供應之必需營養物，且可針對所維持之特定細胞在滲透上進行調整，且溫度及氣相亦控制在合適的界限值中。細胞培養技術為本領域中眾所周知的。參見例如Morgan等人 1993《動物細胞培養》, BIOS Scientific Publishers, 英國牛津（Oxford, UK）；及 Adams, R. L. P. 1990《生物化學家的細胞培養（Cell Culture for Biochemists）》, 第二版, Elsevier。

【0513】 熟練的業內人士應瞭解，術語「繼代」可涵蓋繼代培養細胞群體之操作。熟練的業內人士將瞭解，術語「繼代培養物」可涵蓋藉由接種無菌培養基建立之細胞培養物，其在一個實施例中為新鮮無菌培養基，具有來自先前培養物之樣品。

【0514】 熟練的業內人士亦應瞭解，術語「細胞株系」可涵蓋使用轉種技術衍生自原代培養物之細胞群體。由此，原代培養物可繼代培養至兩個或更多個新的培養物中，且繼代培養以週期性時間間隔重複持續數個月以維持所述細胞株系。繼代培養可使用已確立的細胞培養技術進行。

【0515】 在一個實施例中，繼代的細胞株系及永生化的細胞株之特徵可為其表現特定功能標記物，諸如角蛋白、激素以生長因子受體等。

【0516】 在一些態樣中，培養可在添加生長因子之無血清的成分確定的培養基中進行。在其他態樣中，培養基含有添加或不添加生長因子之血清。此類修改可由熟練的業內人士憑經驗確定以便使細胞增殖最佳化。

【0517】 熟練的業內人士應瞭解，術語「細胞株」可涵蓋來源於單個外植體之細胞群體，所述外植體特徵為具有在活體外無限增殖的可能性。細胞株可基於其在培養物中存活且繼續生長之能力自原代培養物分離。最初來源於腫瘤組織之細胞株可能已在活體內經轉型，不過並非所有

贅生性細胞群體均具有在活體外無限生長之能力。另外，細胞株通常經過多輪分裂保持其分化特徵。

【0518】 合適的細胞培養基板通常為可經滅菌、不瀝出毒性因子且不扭曲顯微鏡影像之容器。由此，由玻璃及塑膠形成之培養盤在本文中為合適的基板。塑膠容器可使用本領域中已知的技術進一步處理以促進細胞附著（Ramsey等人 1984 《活體外（In vitro）》 20:802）。合適的組織培養基通常由等滲、緩衝、基礎的營養培養基組成，其與無機鹽、胺基酸、維生素及各種補充劑一起提供能量來源。補充劑可包含血清（例如胎牛血清等）各種抗生素以防止污染或提供選擇條件、附著及生長因子等。許多培養基調配物為本領域中已知的，諸如（但不限於）基本必需培養基（MEM）、羅斯威爾帕克紀念研究所（Rosewell Park Memorial Institute，RPMI）1640或杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基（DMEM）。合適的組織培養條件亦為本領域中已知的。參見例如Morgan等人 1993 《動物細胞培養》, BIOS Scientific Publishers Ltd., 英國牛津（Oxford, UK）；及Adams, R. L. P. 1990 《生物化學家的細胞培養》, 第二版, Elsevier。在本文揭示之另一實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之方法為無血清方法。在本文揭示之另一實施例中，製造相關CTP修飾的多肽之方法為無動物衍生物方法。

【0519】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，培養物之儲存溫度在-20與-80攝氏度（℃）之間。在另一實施例中，溫度顯著低於-20℃。在另一實施例中，溫度不暖於-70℃。在另一實施例中，溫度為-70℃。在另一實施例中，溫度為約-70℃。在另一實施例中，溫度為-20℃。在另一實施例中，溫度為約-20℃。在另一實施例中，溫度為-30℃。在另

一實施例中，溫度為-40℃。在另一實施例中，溫度為-50℃。在另一實施例中，溫度為-60℃。在另一實施例中，溫度為-80℃。在另一實施例中，溫度為-30℃至-70℃。在另一實施例中，溫度為-40℃至-70℃。在另一實施例中，溫度為-50℃至-70℃。在另一實施例中，溫度為-60℃至-70℃。在另一實施例中，溫度為-30℃至-80℃。在另一實施例中，溫度為-40℃至-80℃。在另一實施例中，溫度為-50℃至-80℃。在另一實施例中，溫度為-60℃至-80℃。在另一實施例中，溫度為-70℃至-80℃。在另一實施例中，溫度冷於-70℃。在另一實施例中，溫度冷於-80℃。

【0520】 在另一實施例中，為了低溫保存，將細胞緩慢冷凍直至其在包含低溫保護劑之培養基中達至低於-70℃之溫度，且接著將小瓶轉移至液氮冷凍機以使其維持在低於-130℃之溫度下。

【0521】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最長24小時。在另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最長2天，持續最長3天，持續最長4天，持續最長1週，持續最長2週，持續最長3週，持續最長1個月，持續最長2個月，持續最長3個月，持續最長5個月，持續最長6個月，持續最長9個月或持續最長1年。上列每個可能性為本文揭示之一實施例。

【0522】 在另一實施例中，低溫保存或冷凍儲存持續最短1週，持續最短2週，持續最短3週，持續最短1個月，持續最短2個月，持續最短3個月，持續最短5個月，持續最短6個月，持續最短9個月，持續最短1年，持續最短1.5年，持續最短2年，持續最短3年，持續最短5年，持續最短7年，持續最短10年，或持續長於10年。上列每個可能性為本文揭示之一實施例。

【0523】 在本文揭示之方法及組合物之另一實施例中，細胞在延長時段之低溫保存或冷凍儲存後解凍之後展現出生長。在另一實施例中，細胞在用來自細胞庫或起子培養物之細胞接種新鮮培養基之後的約15-22小時內展現出生長。在另一實施例中，細胞在用來自細胞庫或起子培養物之細胞接種新鮮培養基之後的約12-20小時內展現出生長。在一個實施例中，為了確保存活率、基因穩定性以及表型穩定性，細胞株需要維持在指數生長期（經由定期繼代培養）。

【0524】 在另一實施例中，「延長時段」之低溫保存或冷凍儲存為1個月。在另一實施例中，所述時段為2個月。在另一實施例中，所述時段為3個月。在另一實施例中，所述時段為5個月。在另一實施例中，所述時段為6個月。在另一實施例中，所述時段為9個月。在另一實施例中，所述時段為1年。在另一實施例中，所述時段為1.5年。在另一實施例中，所述時段為2年。在另一實施例中，所述時段為2-7年。在另一實施例中，所述時段持續至少7年。在另一實施例中，所述時段持續至少10年。

【0525】 在另一實施例中，本文揭示之方法及組合物之細胞在低溫保存後解凍之後保持超過90%之存活率。在另一實施例中，在低溫保存時段之後，在解凍後的存活率接近100%。在另一實施例中，在解凍後的存活率接近90%。在另一實施例中，在解凍後的存活率為至少90%。在另一實施例中，在解凍後的存活率超過80%。

【0526】 在另一實施例中，本文揭示之細胞庫、冷凍儲備液或疫苗劑量批料生長在成分確定之細胞培養基中。所述培養基為本領域中已知的且可包含（但不限於）杜爾貝科氏改良伊格爾氏培養基（DMEM）（ATCC®第30-2002號）、伊斯科夫氏改良杜爾貝科氏培養基（IMDM）

（ATCC®第30-2005號）、Hybri-Care培養基（ATCC®第46-X號）、麥考伊氏（McCoy's）5A及RPMI-1640（ATCC®第30-2007號）、哈姆氏營養混合物（ATCC® CCL-61™）、化學成分確定之PowerCHO™、無血清CHO培養基（Lonza目錄號12-771Q）；或本領域中已知的任何其他培養基。在另一實施例中，此等培養基可補充抗生素或動物血清，如將由熟練的業內人士憑經驗確定。

【0527】 在一個實施例中，本文揭示生物反應器及方法，其允許以大規模體積培育哺乳動物細胞。此外以及在另一實施例中，即使以大規模體積生長，所述生物反應器及方法亦允許在最佳條件下培育哺乳動物細胞，且因此允許與生物反應器之大小無關的製程效能及產物品質。在生物反應器中之培育持續時間可僅藉由改變規模及生物反應器系統來改變，例如持續時間可在8-9天之間，或其可在15-16天之間。在另一實施例中，在生物反應器中之培育持續時間為約7天、約8天、約9天、約10天、約11天、約12天、約13天、約14天、約15天、約16天、約17天、約18天、約19天、約20天或更長。在另一實施例中，當使用灌注生物反應器時，培育持續時間可高達7-120天。

【0528】 在另一實施例中，本文揭示大規模生物反應器，其允許在均質環境中相對於諸如pH、溶解氧張力（DOT）及溫度之製程參數培育哺乳動物細胞，在生物反應器中維持充分混合的細胞懸浮液且摻合營養物進料。在另一實施例中，生物反應器為拋棄式生物反應器。

【0529】 本文揭示之方法藉由根據申請專利範圍提供生物反應器、生物反應器系統及用於培育真核細胞（尤其哺乳動物細胞）之方法來解決構成本文揭示之方法的基礎的技術問題。

【0530】 在一個實施例中，生物反應器之體積為至少250公升（L）。在另一實施例中，生物反應器之體積為至少500 L。在另一實施例中，體積為至少1000 L、至少2000 L、至少5,000 L、至少10,000 L、至少12,000 L或至少15,000 L。

【0531】 在另一實施例中，細胞在遞增體積之生物反應器中轉種（參見實例12）。

組合物

【0532】 在一些實施例中，使用本文所揭示之方法製造的相關多肽之多肽可用於治療個體的與生長及體重相關的病況，諸如生長缺乏症、AIDS消耗、衰老、HIV感染個體之受損的免疫功能、分解代謝疾病、手術恢復、充血型心肌病、肝移植、肝切除之後的肝再生、慢性腎衰竭、腎性骨營養不良、骨質疏鬆、軟骨發育不全（achondroplasia）/軟骨生成減退（hypochondroplasia）、骨骼發育不良、慢性發炎或營養障礙（諸如克羅恩氏病（Crohn's disease））、短腸症候群、青少年慢性關節炎、囊腫性纖維化、男性不孕症、X-連鎖低磷酸鹽血性佝僂病、唐氏症候群（Down's syndrome）、脊柱裂、努南症候群（Noonan Syndrome）、肥胖、肌肉強度減弱及纖維肌痛。在一個實施例中，本文揭示之多肽可自身提供給個體。在一個實施例中，本文揭示之多肽可作為醫藥組合物之一部分提供給個體，所述多肽在其中與醫藥學上可接受之載劑混合。

【0533】 熟練的業內人士將瞭解，術語「醫藥組合物」可涵蓋本文所述的一種或多種活性成分與其他化學組分（諸如生理學上合適的載劑及賦形劑）之製劑。醫藥組合物之目的為促進向生物體投予化合物。

【0534】 本文揭示之經修飾的肽可與自身已知的載劑、稀釋劑等混

合調配成合適的藥物製劑（諸如膠囊及注射劑），其可為經口或非經腸投予哺乳動物（例如牛、馬、豬、綿羊、人類）。

【0535】 熟練的業內人士將瞭解，術語「活性成分」可涵蓋相關多肽序列，其可負責生物學作用。

【0536】 在一些實施例中，本文揭示之組合物中之任一種將包括以任何形式結合於相關蛋白質之至少兩個CTP序列。在一個實施例中，本文揭示組合的製劑。在一個實施例中，「組合的製劑」尤其定義「多部分套組」，意義在於如上文所定義的組合搭配物可獨立地給藥或藉由以有區別的量之組合搭配物使用不同的固定組合，亦即，同步、同時、分開或依序。在一些實施例中，多部分套組之各部分可接著例如同步投予或按時間順序錯開，亦即對於多部分套組之任一部分在不同時間點並且時間間隔相等或不同。在一些實施例中，組合搭配物之總量的比率可以在組合製劑中投予。在一個實施例中，組合的製劑可改變，例如以便應對待治療之患者亞群的需求或單個患者之需求，所述不同需求可歸因於具體疾病、疾病之嚴重度、年齡、性別或體重，如可由熟習此項技術者易於作出。

【0537】 熟練的業內人士將瞭解，可互換地使用之短語「生理學上可接受之載劑」及「醫藥學上可接受之載劑」係指不會對生物體造成顯著刺激並且不會消除所投予的化合物之生物活性及性質的載劑或稀釋劑。佐劑包含在此等短語下。在一個實施例中，包含於醫藥學上可接受之載劑中之成分之一可為例如聚乙二醇（PEG），一種在有機及水性介質中均具有廣泛範圍的溶解度之生物相容性聚合物（Mutter等人 (1979)）。

【0538】 熟練的業內人士將瞭解，術語「賦形劑」可涵蓋添加至醫藥組合物中以進一步促進活性成分投予之惰性物質。在一個實施例中，賦

形劑包含碳酸鈣、磷酸鈣、各種糖及各類澱粉、纖維素衍生物、明膠、植物油及聚乙二醇。

【0539】 用於調配及投予藥物之技術見於「《芮明通製藥科學（Remington's Pharmaceutical Sciences）》」, Mack Publishing Co., 賓州伊斯頓（Easton, PA）, 最新版中，所述出版物以引用的方式併入本文中。

【0540】 在一個實施例中，合適的投予途徑例如包含經口、經直腸、經黏膜、經鼻、經腸或非經腸傳遞，包含肌內、皮下及髓內注射以及鞘內、直接腦室內、靜脈內、腹膜內、鼻內或眼內注射。

【0541】 在一個實施例中，製劑以局部而非全身性方式，例如經由將製劑直接注射至患者身體之特定區域來投予。

【0542】 在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之相關多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-50微克於0.1-5 ml溶液中之劑量投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-25微克於0.1-5 ml溶液中之劑量投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以50-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以10-50微克於0.1-5 ml溶液中之劑量投予。

【0543】 在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之相關多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由一週一次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由一週兩次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。在另一實施例

中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由一週三次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由每兩週一次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由每17天一次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。在另一實施例中，本文揭示之包括相關多肽之多肽以1-90微克於0.1-5 ml溶液中之劑量藉由每19天週一次肌內（IM）注射、皮下（SC）注射或靜脈內（IV）注射投予。

【0544】 在另一實施例中，分子量低於50,000道爾頓（dalton）之蛋白質藥物（諸如干擾素）通常為在活體內短時間存在的物質，具有數小時之短循環半衰期。在另一實施例中，皮下投予途徑一般提供較慢的至循環中之釋放。在另一實施例中，本文揭示之CTP修飾的多肽延長分子量低於50,000道爾頓之蛋白質藥物（諸如干擾素）之半衰期。在另一實施例中，本文揭示之CTP修飾的多肽使得干擾素能夠持續較長時間段發揮其有益作用。

【0545】 在另一實施例中，包括相關多肽之CTP修飾的多肽之免疫原性與相關經分離多肽相等。在另一實施例中，包括相關多肽之CTP修飾的多肽之免疫原性與相關經分離多肽相當。在另一實施例中，用CTP肽修飾如本文中所述之相關多肽會降低相關多肽之免疫原性。在另一實施例中，包括相關多肽之CTP修飾的多肽與相關蛋白質之經分離多肽一樣具活性。在另一實施例中，包括相關多肽之CTP修飾的多肽與相關經分離多肽相比更具活性。在另一實施例中，包括相關多肽之CTP修飾的多肽使相關

多肽針對降解之保護能力達至最大同時使生物活性之減少達至最少。

【0546】 在另一實施例中，本文揭示之相關多肽可提供給個體自身。在一個實施例中，本文揭示之相關多肽可作為醫藥組合物之一部分提供給個體，所述多肽在其中與醫藥學上可接受之載劑混合。

【0547】 本文涵蓋劑量範圍之各種實施例。在一個實施例中，本文揭示之多肽之劑量在0.05-80毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.05-50毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-20毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-10毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-5毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.5-5毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.5-50毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在5-80毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在35-65毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在35-65毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在20-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在40-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在45-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在40-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在60-120毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在120-240毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在40-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在240-400毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在45-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在15-25毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在5-10毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在55-65毫克/天範圍內。

【0548】 在一個實施例中，劑量為20毫克/天。在另一實施例中，劑量為30毫克/天。在另一實施例中，劑量為40毫克/天。在另一實施例中，劑量為50毫克/天。在另一實施例中，劑量為60毫克/天。在另一實施例

中，劑量為70毫克/天。在另一實施例中，劑量為80毫克/天。在另一實施例中，劑量為90毫克/天。在另一實施例中，劑量為100毫克/天。

【0549】 本文涵蓋劑量範圍之各種實施例。在一個實施例中，本文揭示之細胞激素之劑量在0.005-100毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.005-5毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.01-50毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-20毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-10毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.01-5毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.001-0.01毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.001-0.1毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.1-5毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.5-50毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.2-15毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在0.8-65毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在1-50毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在5-10毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在8-15毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在10-20毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在20-40毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在60-120毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在12-40毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在40-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在50-100毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在1-60毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在15-25毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在5-10毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在55-65毫克/天範圍內。

【0550】 在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以鼻內劑型形式調配。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以可注射劑型形式調配。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在

0.0001 mg至0.6 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在0.001 mg至0.005 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在0.005 mg至0.01 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在0.01 mg至0.3 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在0.2 mg至0.6 mg範圍內之劑量投予個體。

【0551】 在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在1-100微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在10-80微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在20-60微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在10-50微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在40-80微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在10-30微克範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在30-60微克範圍內之劑量投予個體。

【0552】 在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在0.2 mg至2 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在2 mg至6 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在4 mg至10 mg範圍內之劑量投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽以在5 mg與15 mg範圍內之劑量投予個體。

【0553】 在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽注射至肌肉中（肌內注射）。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽在皮膚下方注射（皮下注射）。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽注射至肌肉中。在另一實施例中，包括IFN蛋白及CTP單元之多肽在皮膚下方注射。

【0554】 在另一實施例中，本文所揭示之方法包括在使用相關多肽療法時增加順應性，包括向有需要之個體提供一種多肽，所述多肽包括相關多肽、連接至所述相關多肽之胺基末端的一個CTP及連接至相關多肽之羧基末端的兩個CTP，從而在使用相關多肽療法時增加順應性。

【0555】 在另一實施例中，本文所揭示之方法包括增加需要相關多肽療法之罹患慢性疾病之患者的順應性。在另一實施例中，本文所揭示之方法藉由用如上文所描述之CTP修飾相關多肽來實現相關多肽之給藥頻率降低。在另一實施例中，術語順應性包括順適性。在另一實施例中，本文所揭示之方法包括藉由降低投予相關多肽之頻率來增加需要相關多肽療法之患者的順應性。在另一實施例中，投予相關多肽之頻率的降低因使相關CTP修飾的多肽更穩定的CTP修飾而達成。在另一實施例中，投予相關多肽之頻率的降低因延長相關多肽之T1/2而達成。在另一實施例中，投予相關多肽之頻率的降低因延長相關多肽之清除時間而達成。在另一實施例中，投予相關多肽之頻率的降低因提高相關多肽之AUC量測值而達成。

【0556】 在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽一天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每兩天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每三天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每四天一

次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每五天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每六天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每週一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每7-14天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每10-20天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每5-15天一次投予個體。在另一實施例中，包括相關多肽及CTP單元之多肽每15-30天一次投予個體。

【0557】 在另一實施例中，劑量在50-500毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在50-150毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在100-200毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在150-250毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在200-300毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在250-400毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在300-500毫克/天範圍內。在另一實施例中，劑量在350-500毫克/天範圍內。

【0558】 在一個實施例中，劑量為20毫克/天。在一個實施例中，劑量為30毫克/天。在一個實施例中，劑量為40毫克/天。在一個實施例中，劑量為50毫克/天。在一個實施例中，劑量為0.01毫克/天。在另一實施例中，劑量為0.1毫克/天。在另一實施例中，劑量為1毫克/天。在另一實施例中，劑量為0.530毫克/天。在另一實施例中，劑量為0.05毫克/天。在另一實施例中，劑量為50毫克/天。在另一實施例中，劑量為10毫克/天。在另一實施例中，劑量為20-70毫克/天。在另一實施例中，劑量為5毫克/天。

【0559】 在另一實施例中，劑量為1-90毫克/天。在另一實施例中，

劑量為1-90毫克/2天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/3天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/4天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/5天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/6天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/週。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/9天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/11天。在另一實施例中，劑量為1-90毫克/14天。

【0560】 在另一實施例中，相關多肽劑量為10-50毫克/天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/2天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/3天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/4天。在另一實施例中，劑量為10-50微克毫克/5天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/6天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/週。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/9天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/11天。在另一實施例中，劑量為10-50毫克/14天。

【0561】 在一個實施例中，經口投予包括單位劑型，所述單位劑型包括錠劑、膠囊、口含錠、咀嚼錠劑、懸浮液、乳液及其類似物。所述單位劑型包括安全及有效量之本文揭示之所期望的相關多肽，其中之每一者在一個實施例中為約0.7或3.5 mg至約280 mg/70 kg，或在另一實施例中，為約0.5或10 mg至約210 mg/70 kg。適用於製備用於經口投予之單位劑型的醫藥學上可接受之載劑在本領域中為熟知的。在一些實施例中，錠劑通常包括習知醫藥學上相容的佐劑作為惰性稀釋劑，諸如碳酸鈣、碳酸鈉、甘露糖醇、乳糖及纖維素；黏合劑，諸如澱粉、明膠及蔗糖；崩解劑，諸如澱粉、海藻酸及交聯羧甲纖維素；潤滑劑，諸如硬脂酸鎂、硬脂酸及滑石。在一個實施例中，助流劑，諸如二氧化矽可以用以改進粉末混合物之流動特徵。在一個實施例中，著色劑，諸如FD&C染料可以為了外

觀而添加。甜味劑及調味劑，諸如阿斯巴甜糖、糖精、薄荷醇、胡椒薄荷及水果調味劑適用於咀嚼錠劑之佐劑。膠囊通常包括一種或多種上文揭示之固體稀釋劑。在一些實施例中，載劑組分之選擇視如口味、成本及存放穩定性之次要考慮因素而定，其對於本文揭示之目的並非至關重要的且可易於由熟習此項技術者作出。

【0562】 在另一實施例中，本文揭示一種降低相關多肽之給藥頻率之方法，其包括將至少一個CTP連接至如上文詳細揭示之相關多肽的步驟。

【0563】 在另一實施例中，本文揭示一種在使用投予相關多肽之療法中增加順應性之方法，其包括向有需要之個體提供本文揭示之相關CTP修飾的多肽，其中所述CTP修飾的多肽如本文中所揭示製造。

【0564】 在一個實施例中，治療有效量之確定完全在本領域中熟習此項技術者能力範圍內。

【0565】 在一個實施例中，亦製備包含在可相容醫藥載劑中調配之本文揭示之製劑的組合物，置於適當容器中，且針對指定病況之治療做標記。

【0566】 在另一實施例中，如本文中所述之相關多肽，例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、雙重GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM為與複合有機賦形劑及穩定劑（諸如非離子型界面活性劑（亦即界面活性劑）、各種糖、有機多元醇及/或人類血清白蛋白）組合的凍乾（亦即冷凍乾燥）製劑。在另一實施例中，醫藥組合物包括凍乾的相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如所述本文中

所述）於注射用無菌水中。在另一實施例中，醫藥組合物包括如所述的凍乾的凝血因子於注射用無菌PBS中。在另一實施例中，醫藥組合物包括凍乾的相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如所述本文中所述）於注射用無菌0.9% NaCl中。

【0567】 在另一實施例中，醫藥組合物包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）及複合載劑（諸如人類血清白蛋白、多元醇、糖及陰離子界面活性穩定劑）。在另一實施例中，醫藥組合物包括如本文中所述之凝血因子、相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）及乳糖酸及乙酸鹽/甘胺酸緩衝劑。在另一實施例中，醫藥組合物包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）及會增加干擾素組合物於水中之溶解度的胺基酸（諸如精胺酸或麩胺酸鹽）。在另一實施例中，醫藥組合物包括凍乾的相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）及甘胺酸或人類血清白蛋白（HSA）、緩衝劑（例如乙酸鹽）及等張劑（例如NaCl）。在另一實施例中，醫藥組合物包括凍乾的相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）及磷酸鹽緩衝劑、甘胺酸及HSA。

【0568】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物當放入pH在約4與7.2之間的緩衝溶液時為穩定的。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）之醫藥組合物係在pH在約4與8.5之間的緩衝溶液中。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）之醫藥組合物係在pH在約6與7之間的緩衝溶液中。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）之醫藥組合物係在pH為約6.5的緩衝溶液中。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物在胺基酸且在一些情況下鹽（若胺基酸不含有帶電荷的側鏈）作為穩定劑的情況下為穩定的。

【0569】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物為包括在約0.3重量%與5重量%之間的穩定劑（其為胺基酸）之液體組合物。

【0570】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1

或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物提供給藥準確性及產物安全性。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物提供生物學活性、穩定液體調配物以便用於可注射應用。在另一實施例中，醫藥組合物包括非凍乾的相關多肽，例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述。

【0571】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物提供液體調配物，所述液體調配物允許以液態形式儲存較長時間段，有助於在投予之前的儲存及裝運。

【0572】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括固體脂質作為基質材料。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之可注射醫藥組合物包括固體脂質作為基質材料。在另一實施例中，脂質微米粒子藉由噴霧凝結之產生由Speiser（Speiser等人, Pharm. Res. 8 (1991) 47-54）描述，接著為用於經口投予之脂質奈米丸粒（Speiser EP 0167825 (1990)）。在另一實施例中，所用的脂質為身體所充分耐受（例如甘油酯由存在於乳液中之脂肪

酸構成用於非經腸營養）。

【0573】 在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括聚合微米粒子。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括奈米粒子。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括脂質體。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括脂質乳液。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括微球。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括脂質奈米粒子。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括脂質奈米粒子，所述脂質奈米粒子包括兩親性脂質。在另一實施例中，包括相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素

受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述，如本文中所述）之醫藥組合物包括脂質奈米粒子，所述脂質奈米粒子包括藥物、脂質基質及界面活性劑。在另一個實施例中，脂質基質之單甘油脂含量為至少50 w/w%。

【0574】 在一個實施例中，本文揭示之組合物呈現於包裝或分配器裝置中，所述包裝或分配器裝置為諸如FDA批准的套組，其含有一個或多個含有活性成分之單位劑型。在一個實施例中，包裝例如包括金屬或塑膠箔，諸如泡殼包裝。在一個實施例中，包裝或分配器裝置附有投予說明書。在一個實施例中，包裝或分配器附有與容器關聯之通知，其呈管制醫藥品之製造、使用或銷售之政府機構指定的形式，所述通知反映所述機構批准所述組合物形式或人類或獸醫學投藥。在一個實施例中，此類通知為經美國食品藥物管理局批准用於處方藥物或核準之產品插頁。

【0575】 在一個實施例中，應瞭解，本文揭示之相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）可與其他活性劑一起提供給個體以達成與用每種藥劑單獨治療相比改進的治療作用。在另一實施例中，採取措施（例如給予及選擇補充藥劑）以避免與組合療法相關的不良副作用。

【0576】 在一個實施例中，本文揭示一種包括表現載體之細胞。在另一實施例中，本文揭示一種包括表現載體之組合物。

【0577】 如本領域中通常已知的，本文揭示之經修飾的肽及蛋白質可偶合至標記、藥物、靶向劑、載劑、固體支撐物及其類似物，視所期望的應用而定。經修飾生物製品之標記形式可以用於追蹤其代謝去向；用於此目的之合適的標記尤其包含放射性同位素標記，諸如碘131、鎝99、銦

111及其類似物。標記亦可用於介導經修飾的蛋白質或肽在分析系統中之偵測；在此情況下，亦可使用放射性同位素以及酶標記、螢光標記、顯色標記及其類似物。若肽或蛋白質自身為靶向劑，諸如抗體或受體配位體，則使用所述標記尤其有幫助。

【0578】 類似鍵聯技術與其他技術一起可用於將本文揭示之經修飾的肽及蛋白質偶合至固體支撐物。當偶合時，此等經修飾的肽及蛋白質可接著用作親和力試劑以便分離會與其展現特異性反應之所期望的組分。

【0579】 最終，本文揭示之經修飾的肽及蛋白質可以用於與此等新化合物產生抗體特異性免疫反應性。此等抗體適用於多種診斷及治療應用，視未經修飾之肽或蛋白質之生物活性之性質而定。應瞭解，本文揭示與如本文中所述之CTP修飾的多肽具免疫反應性的抗體。在一個實施例中，所述抗體可以用於分別區分或鑑別所投予之相關CTP修飾的多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）與內源性相關多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）。在另一實施例中，抗體可以用於定位所投予之相關CTP修飾的多肽（例如EPO、IFN、細胞激素、凝血因子、FVII、FVIIa、FIX、GLP-1/升糖素受體促效劑、GLP-1或OXM，如本文中所述）。

【0580】 應瞭解，包括如本文中所述之要素或步驟的本文揭示之組合物及方法可在另一實施例中由彼等要素或步驟組成，或在另一實施例中，基本上由彼等要素或步驟組成。熟練的業內人士將瞭解，術語「包括」可涵蓋包括所指示的活性劑，諸如相關CTP修飾的多肽，以及包括其

他活性劑及醫藥學上可接受之載劑、賦形劑、潤滑劑、穩定劑等，如醫藥行業中所已知的。熟練的業內人士將瞭解，術語「基本上由……組成」可涵蓋組合物，所述組合物之唯一的活性成分為所指示之活性成分，然而，可包含其他化合物，所述其他化合物用於穩定、保存等所述調配物，但並未直接參與所指示之活性成分的治療作用。熟練的業內人士將瞭解，術語「基本上由……組成」可涵蓋促進活性成分釋放之組分。熟練的業內人士將瞭解，術語「組成」可涵蓋組合物，其含有活性成分及醫藥學上可接受之載劑或賦形劑。

【0581】 本領域的普通技術人員在參閱以下實例後將變得顯而易知本文揭示之其他目標、優點及新穎特徵，所述實例並不意欲為限制性的。另外，如上文所描繪並且如所附申請專利範圍部分中所主張的本文揭示之各種實施例及態樣中之每一者在以下實例中找到實驗支持。

實例

實例1-生成EPO構築體

【0582】 **材料與方法：**

【0583】 ***構築表現載體pCI-dhfr：***pCI-neo哺乳動物表現載體購自Promega（目錄號E1841）。所述載體含有CMV IE強化子/啟動子及新黴素磷酸轉移酶基因。pSV2-dhfr純系購自ATCC（目錄號37146）。所述質體含有鼠類dhfr基因。pCI-dhfr載體之構築如下進行：

【0584】 pSV2-dhfr質體用限制酶BglII消化（dhfr基因之3'端）。DNA聚合酶I，大（Klenow）片段用於填充5'突出物以形成鈍端。DNA接著用限制酶AvrII（dhfr基因之5'端）消化。分離dhfr基因（AvrII鈍端）片段。

【0585】 pCI-neo載體用限制酶BstXI（neo基因之3'端）消化。DNA聚合酶I，大（克列諾）片段用於移除3'突出物以形成鈍端。DNA接著用限制酶AvrII消化（neo基因之5'端）。分離表現載體（AvrII鈍端）。

【0586】 dhfr基因接合至pCI載體以形成含有dhfr基因之表現載體（pCI-dhfr）。

【0587】 ***構築hEPO-CTP變異體：***含有hCG之β次單元之C端肽（CTP）的卡匣基因在不同位置融合至人類EPO之編碼序列（NP_000790.2）。四種EPO-CTP變異體如**圖1A-D**中所示構築。proEPO信號肽用於構築所分泌之EPO-CTP變異體。含有Epo序列之XbaI-NotI片段接合至本文揭示之pCI-dhfr表現載體。

【0588】 下文中**表2**概述用於構築本文揭示之含CTP多肽之引子序列。

【0589】 ***表2***

引子編號	SEQ ID NO	序列	限制位點（序列中帶下劃線的）
1	72	5' AATCTAGAGGTCATCATGGGGGTGC 3'	XbaI
2	73	5'ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG 3'	NotI
17^R	74	5' TAAATATTGGGGTGTCCGAGGGCCC 3'	SspI
10	75	5' CCAATATTACCACAAGCCCCACCACGCCTCAT 3'	SspI
11^R	76	5'TGCGGCCGCGGATCCTTATCTGTCCCCTGTCCTGC 3'	NotI
15	77	5' GCCCTGCTGTCGGAAGC 3'	
2^R	78	5' ATTGCGGCCGCGGATCCAGAAGACCTTTATTG	NotI
23^R	79	5'CTTTGAGGAAGAGGAGCCCAGGACTGGGAGGC3'	
24	80	5' CCTGGGCTCCTCTTCCTCAAAGGC 3'	
38^R	81	5' GCTTCCGACAGCAGGGC 3'	

【0590】 ***EPO-1 701-1-p17-6（Epo-1-SEQ ID NO: 1）：***XbaI-NotI 702 bp片段藉由PCR使用以上引子（SEQ ID NO: 72-81）構築。接著，含有Epo-ctp序列之XbaI-NotI PCR片段接合至pCI-dhfr表現載體。

【0591】 ***EPO-2 701-2-p24-2（Epo-2-SEQ ID NO: 2）：***pCI-dhfr-401-2-p21-2（hGH-ctpx2）之XbaI/ApaI片段（hGH-ctp）經701-1-p17-6之XbaI/ApaI

片段（EPO-ctp）置換，形成 Epo-ctpx2。

【0592】 ***EPO-4-701-4-p42-1（Epo-4-SEQ ID NO: 4）：***首先，來自 pCI-dhfr-EPO-ctp（701-1-p17-6）之片段藉由 PCR 使用引子 1 及 17 構築，之後進行 XbaI/SspI 消化。此產生含有 EPO 及部分 5' CTP 之片段。

【0593】 其次，新片段藉由重疊 PCR 在作為模板之 pGT123-hEpo 上使用引子 10 及引子 11 構築。SspI/NotI 消化產生含有 3'部分 CTP 及 Epo 之片段。

【0594】 所述兩個片段接合至 pCI-dhfr 以構築 p701-4-p42-1 純系。

【0595】 ***EPO-3-p56-6（Epo-3 SEQ ID NO: 3）：***引子購自 Sigma-Genosys。PCR 反應使用引子 15（SEQ ID NO: 77）及引子 2^R（SEQ ID NO: 78）以及作為模板之 pCI-dhfr-EPO-ctp×2（701-2-p24-2）之質體 DNA 進行。由於 PCR 擴增，形成 486 bp 產物，且其接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。分離含有*Epo-ctp×2 序列之 Stu I-NotI 片段（209 bp）。

【0596】 進行三個連續 PCR 反應。第一反應用引子 1（SEQ ID NO: 72）及引子 23^R（SEQ ID NO: 79）以及作為模板之 pGT123-epo-ctp 之質體 DNA 進行；由於 PCR 擴增，形成 80 bp 產物（信號肽）。

【0597】 第二反應用引子 24（SEQ ID NO: 80）及引子 11^R（SEQ ID NO: 76）以及作為模板之 701-4-p42-1 之質體 DNA 進行；由於 PCR 擴增，形成 610 bp 產物。

【0598】 最後一個反應用引子 1（SEQ ID NO: 72）及 11^R（SEQ ID NO: 76）以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於 PCR 擴增，形成 700 bp 產物，且分離 XbaI-StuI 片段。

【0599】 將兩個片段（XbaI-StuI 及 StuI-NotI）插入至真核表現載體 pCI-dhfr 中（三重接合），得到 701-3-p56-6 純系。

【0600】 ***EPO-5-p91-4（Epo-5 SEQ ID NO: 5-（ctp- Epo）：***引子定購自 Sigma-Genosys。PCR 反應使用引子 1（SEQ ID NO: 72）及引子 11^R（SEQ ID NO: 76）以及作為模板之 pCI-dhfr-ctp-EPO-ctp×2（701-3-p56-6）進行；由於 PCR 擴增，形成 670 bp 產物，且接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。含有 ctp-Epo 序列之 XbaI-NotI 片段接合至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr，得到 701-5-p91-4 純系。

【0601】 ***EPO-6-p90-1（Epo-6 SEQ ID NO: 6-（ctp- Epo-ctp）：***進行三個 PCR 反應。第一反應用引子 1（SEQ ID NO: 72）及引子 38^R（SEQ ID NO: 81）以及作為模板之 701-3-p56-6 之質體 DNA 進行；由於 PCR 擴增，形成 400 bp 產物。

【0602】 第二反應用引子 15（SEQ ID NO: 77）及引子 2^R（SEQ ID NO: 78）以及作為模板之 701-1-p17-6 之質體 DNA 進行；由於 PCR 擴增，形成 390 bp 產物。

【0603】 最後一個反應用引子 1（SEQ ID NO: 72）及 2^R（SEQ ID NO: 78）以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於 PCR 擴增，形成 787 bp 產物，且接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。含有 ctp-Epo-ctp 序列之 XbaI-NotI 片段接合至真核表現載體 pCI-dhfr，得到 701-6-p90-1 純系。

實例 2-EPO-CTP 多肽之表現及分離

材料與方法

【0604】 ***DNA 轉染及純系選擇：***DG44 細胞使用 FuGENE6 試劑（FuGENE 轉染試劑-羅氏（Roche）目錄 11 815 091 001）用含有 EPO-CTP 變異體之 pCI-DHFR 表現載體轉染。在轉染之後 48 小時，將細胞稀釋且每孔至少

50-200 個細胞接種於選擇培養基（不含 HT 之 CD DG44 培養基（Gibco：蘇格蘭（Scotland）部件：#07990111A）Sku 號：ME060027），所述選擇培養基補充有 8 mM L-麩醯胺酸（Biological Industries：目錄：03-020-1A）及 18 mL/L 10% Pluronic F-68 溶液（Gibco：目錄：240040-032）。所選擇純系使用商業 ELISA 針對最高蛋白質製造篩選。每個變異體冷凍 3-5 個製造純系以便備份細胞庫。為每個變異體選擇之純系經調適以在至多 1 L 燒瓶之較大規模培養物中在軌道式振盪器平台上生長。收集上清液，且藉由 ELISA、SDS-PAGE 以及西方墨點法分析。在抽出等分試樣之後，將含蛋白質的上清液保持冷凍直至進一步使用。

【0605】 ***細胞培養：***將 DG44 細胞在 37℃下在加濕 8% CO_2 培育箱中維持在具有 HT 之 DG44 培養基（目錄號 12610-010，Gibco）中，所述培養基補充有 8 mM L-麩醯胺酸（Biological Industries：目錄：03-020-1A）及 18 mL/L 10% Pluronic F-68 溶液（Gibco：目錄：240040-032）。將經轉染純系維持在不具有 HT 補充劑、次黃嘌呤及胸苷、具有普洛尼克酸及 L-麩醯胺酸之 DG44 基礎培養基中。

【0606】 ***樣品製備：***收集上清液，過濾，且藉由 ELISA 分析，以測定蛋白質濃度。SDS-PAGE 及西方墨點法用於測定純度及身分。在 ELISA 之後，定義樣品濃度，且溶液用 PBS 透析。在抽出等分試樣之後，將含蛋白質的上清液在-20℃下保持冷凍直至進一步使用。

【0607】 ***西方墨點法：***樣品在非變性 15% SDS-聚丙烯醯胺凝膠上電泳。使凝膠在含 25 mM Tris 及 192 mM 甘胺酸之 20%（體積/體積）甲醇中平衡 10 分鐘。使用微型 Trans-Blot 電泳單元（伯樂實驗室（Biorad Laboratories），加州里奇蒙（Richmond, CA）），歷時 3 小時將蛋白質在 250 mA 下轉移至 0.2

μm 孔徑硝化纖維素膜（西格瑪，密蘇里州聖路易斯（Saint Louis, MO））。硝化纖維素膜在 5%脫脂奶粉中在室溫下培育 2 小時。膜與 EPO 抗血清（1:1000 效價）一起在至少 4℃下培育隔夜，之後在含有 0.1% Tween 之 PBS 中連續洗滌三次（10 分鐘/洗滌）。膜與結合至辣根過氧化酶（HRP）之二級抗體（Zymed，加州舊金山（San Francisco, CA））一起在室溫下培育 2 小時，之後洗滌三次。最後，使硝化纖維素紙與增強型化學發光受質（ECL）（皮爾斯，伊利諾州羅克福德（Rockford, IL））反應 5 分鐘，用 Whatman 紙片乾燥，且暴露於 X 射線膜。

結果

【0608】 下文中**表 3** 展示出獲自 5 個所選擇純系之各種 CTP 修飾的 EPO 形式及其用於進一步測試之製備物的濃度。

表 3

型式編號	*純系編號*	*儲備液效價 IU/ml*[1]	*根據 Epo3 效價在 Mock 上清液中稀釋後 IU/ml*[2]	*超濾後 IU/ml*[3]
Epo0 SEQ ID NO: 8	17	3093	102	335
Epo1 SEQ ID NO: 1	47	1049	104	291
Epo2 SEQ ID NO: 2	67	2160	110	303
Epo3 SEQ ID NO: 3	85	105	119	392
Epo4 SEQ ID NO: 4	112	6100	ND	342

1. EPO 變異體儲備液濃度藉由 ELISA（Quantikine IVD Epo ELISA，DEP00，R&D Systems）測定。

2. 樣品EPO-0、1、2及4在mock上清液中稀釋至105 IU/ml（根據Epo3效價調節）。Epo0=在與CTP修飾的EPO之相同的系統中表現之野生型EPO

3. 將所有樣品濃縮且藉由超濾用PBS透析至180 IU/ml之最終濃度。

【0609】 所有蛋白質均如**圖2**中所示藉由西方墨點法偵測。

實例3-凝血因子IX之生成及使用

【0610】 **重組FIX分子之選殖及表現：**

【0611】 因子IX純系在吾人之真核表現載體pCI-neo（Promega，目錄號E1841）中構築。智人（Homo sapiens）凝血因子IX之ORF純系定購自「OriGene」（RC219065）。引子定購自Sigma-Genosys。

【0612】 **構築301-1-pCI-neo-p200-11（因子IX-ctp×2）：**

【0613】 引子101：5' GTTTAGTGAACCGTCAGAAT 3'（SEQ ID NO: 82）

【0614】 引子103^R：5' TTGAGGAAGATGTTCGTGTA 3'（含有因子IX之SspI位點）（SEQ ID NO: 83）

【0615】 PCR反應用引子101及引子103^R及作為模板之質體DNA因子IX之cDNA純系（「OriGene」RC219065）進行；由於PCR擴增，形成約1085 bp（pcr 10）產物，且自凝膠純化（含有因子IX序列之胺基末端的片段）。

【0616】 引子98：5' ATTACAGTTGTCGCAGGTGA 3'（SEQ ID NO: 84）

【0617】 引子99^R：5' GCTGGAGCTAGTGAGCTTTGTTTTTTCCTT 3'（SEQ ID NO:85）

【0618】 引子100：5' GCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3'（SEQ ID NO: 107）

【0619】 引子27^R：5' TTTTCACTGCATTCTAGTTGTGG 3'（SEQ ID NO: 86）

【0620】 進行三個PCR反應。第一反應用引子98及引子99^{R}以及作為模板之質體DNA因子IX之cDNA純系（OriGene，RC219065）進行；由於PCR擴增，形成約540 bp產物。

【0621】 第二反應用引子100及引子27^{R}以及作為模板之402-2-p72-3之質體DNA（hGH-CTP-CTP）進行；由於PCR擴增，形成約258 bp產物。

【0622】 最後一個反應（pcr 3）用引子98及27^{R}以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於PCR擴增，形成約790 bp產物，且其接合至TA選殖載體（Invitrogen，目錄K2000-01）。分離SspI-EcoRI片段（TA 3-3）。

【0623】 另一PCR反應用引子101及引子27^{R}以及作為模板之pcr 10之產物與來自pcr 3之SspI-EcoRI片段的混合物進行（pcr 12）；由於PCR擴增，形成約1700 bp產物（因子IX-ctp-ctp），且其接合至TA選殖載體（Invitrogen，目錄K2000-01）（lig 180）。

【0624】 在因子IX序列中發現錯誤，因此置換片段以便形成具有正確DNA序列之因子IX-ctp-ctp之插入序列。

【0625】 TA-pcr 3-3用SspI及XbaI消化，且分離大片段（載體）。TA 180-4用SspI及XbaI消化，且分離小片段（插入序列），且其接合至用SspI及XbaI消化之TA-pcr-3-3之經分離大片段。新質體TA-183-2用Sal I及NotI消化，且分離因子IX-CTP-CTP插入序列（約1575 bp）。將此片段插入至真核表現載體pCI-neo中（用Sal I及Not I消化），得到301-2-p200-11純系。

【0626】 **pCI-dhfr-因子9-ctpx2（p223-4）構築**：載體pCI-dhfr

（p6-1）用SmaI及NotI消化。因子IX-CTP-CTP（p200-11）用ASisI F.I.及NotI消化。接合兩個片段。

【0627】 **pCI-dhfr因子9-ctp×3（p225-7）構築：**載體pCI-dhfr OXM-CTP×3（p216-4）用XbaI及ApaI消化。因子IX-CTP-CTP（223-4）用XbaI及ApaI消化。接合兩個片段。

【0628】 **pCI-dhfr因子9-ctp×3 T148A（p243-2）構築：**質體p225-7在位置148含有蘇胺酸，由於更常見型式之FIX在此位置含有丙胺酸，故使用定點突變誘發方法將Thr置換成Ala。

【0629】 引子75：ctcccagttcaattacagct（SEQ ID NO: 87）

【0630】 引子122r：ggaaaaactgcctcagcacgggtgagc（SEQ ID NO: 88）

【0631】 引子123：gtgctgaggcagtttttcctgatgtggactat（SEQ ID NO: 89）

【0632】 引子124r：caacacagtgggcagcag（SEQ ID NO: 90）

【0633】 進行三個PCR反應。第一反應用引子75及引子122r以及作為模板之質體DNA p225-7進行；由於PCR擴增，形成約692 bp產物，且其自凝膠純化。第二PCR反應用引子123及引子124r以及作為模板之質體DNA p225-7進行；由於PCR擴增，形成約237 bp產物，且其自凝膠純化。第三重疊PCR反應反應用引子75及124r以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於PCR擴增，形成約910 bp產物。此重疊PCR產物用XbaI及NsiI消化，且再接合至p225-7質體（用XbaI及NsiI消化），得到命名為p243-2之因子IX-ctpx3 T148A。

【0634】 **FIX-4CTP（p259-4）構築：**3.5CTP片段藉由限制酶Apa1

及Xba1自oxym-4CTP（p254-3）分離。FIX+0.5CTP片段用限制酶Apa1及Xba1自FIX-3CTP（p243-2）分離。接合兩個片段。

【0635】 **FIX-5CTP（p260-18）**：4.5CTP片段藉由限制酶Apa1及Xba1自oxym-5CTP（255-1）分離。FIX+0.5CTP片段使用酶Apa1及Xba1自FIX-3CTP（p243-2）分離。接合兩個片段。

【0636】 將DG44細胞接種在100 mm組織培養皿中且生長至50-60%匯合。將總共2 μg（微克）FIX cDNA用於一個100 mm培養盤使用FuGene試劑（羅氏）在無蛋白質培養基（Invitrogene CD Dg44）中之轉染。培養基在轉染之後48小時移除，且用無核苷且存在800 μg/ml G418（新黴素）之無蛋白質培養基（Invitrogene CD Dg44）替換。在14天之後，將經轉染的細胞群體轉移至T25組織培養燒瓶中，且選擇再持續10-14天，直至細胞開始生長為穩定純系。選擇高表現純系。大約2×10^7個細胞用於接種1700 cm^2滾瓶（康寧（Corning），紐約州康寧（Corning NY））中之補充有5 ng/ml維生素K3（甲萘醌硫酸氫鈉；西格瑪）之300 ml生長培養基。在細胞存活率快速降低至約70%之後收集生產培養基（收集物）。首先使生產培養基澄清，且接著濃縮大約20倍，且使用流動過濾卡匣（10 KDa MWCO；密理博公司（Millipore Corp.））用PBS透析。

【0637】 **測定FIX抗原含量**：FIX-CTP收集物抗原含量使用AssayMax人類FIX ELISA套組（AssayPro-EF1009-1）測定。所計算之蛋白質濃度為在兩個獨立運作中之三種不同稀釋液之平均值（**表4**）。

【0638】 **表4：所計算之蛋白質濃度**

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP
FIX抗原含量（μg/ml）	41.9	19.2
SD	8.76	3.67
CV%	20.92	19.15

【0639】 **FIX SDS-PAGE-免疫墨點**：將FIX-CTP收集物或經純化rhFIX（American Diagnostics）（100 ng蛋白質）加載在使用Precision Plus雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE分析藉由西方免疫墨點使用抗人類FIX多株抗體及抗人類γ羧化單株抗體（American Diagnostics）進行。如前報導，rhFIX遷移至少55 KDa，而融合至兩個CTP之FIX遷移在75 KDa下。FIX-CTP蛋白之兩種變異體均展示為經γ羧化，對於FIX活性及功能必需的轉譯後修飾。

【0640】 **測定FIX顯色活性**：FIX-CTP收集物對比rhFIX蛋白（American Diagnostics）之活體外效力之比較性評估使用市售顯色活性測試套組BIOPHEN（Hyphen BioMed 221802）進行。在凝血酶、磷脂、鈣存在下，過量FXIa將所取樣FIX活化成FIXa。FIXa與凝血酶（活化的FVIII:C）（過量供應）形成酶複合物，且磷脂及鈣將分析系統中存在之因子X活化成FXa。活性與FIX之量（其為限制因素）直接相關。所產生之FXa接著藉由其對FXa顯色受質（pNA）之比活性量測。所產生的pNA之量與FIXa活性成正比。將rhFIX及FIX-CTP收集物連續稀釋，且效力藉由比較FIX收集物與由rhFIX或人類血漿組成之參考製備物之劑量-反應曲線來評估。FIX之平均EC50為21 ng/ml，而FIX-(CTP_2)收集物計算的EC50為382 ng/ml，且FIX-CTP收集物計算的EC50為1644 ng/ml。觀察到FIX-(CTP_2)收集物之酶活性降低大約15倍。

【0641】 **FIX凝血活性（aPTT）**：活化部分凝血活酶時間（aPTT）為凝血級聯之內源性及常見路徑之完整性的量度。aPTT為在添加內源性路徑活化劑（磷脂及鈣）之後血漿凝結之時間（秒）。aPTT試劑稱為部分凝血活酶，因為組織因子不與磷脂一起包含在內，因為其與凝血活酶時

間（protime，PT）試劑一起。活化劑使系統啟動，且接著內源性路徑之其餘步驟在磷脂存在下進行。參考aPTT範圍在實驗室與實驗室之間變化，但通常在27-34秒範圍內。

【0642】 分析之原理為藉由添加rhFIX來定量FIX-CTP收集物恢復FIX耗盡之人類血漿之凝血活性之能力。將300 μl FIX缺失型人類血漿與100 μl rhFIX或FIX-CTP收集物混合，且連續稀釋。在37℃下培育60秒之後，將凝血活酶、$CaCl_2$及磷脂添加至混合物中，且測定凝血時間（秒）（由American Medical Laboratories執行）。效力藉由比較FIX收集物與由rhFIX或人類血漿組成之參考製備物之劑量-反應曲線來評估。一個單位之FIX活性對應於等同1 ml正常人類血漿之活性的FIX濃度。所呈現之aPTT結果指示FIX-$(CTP)_2$展現出與rhFIX相比其特異凝血活性降低5.7倍（**表5**）。此外，aPTT結果連同顯色活性活體外分析表明FIX-$(CTP)_2$收集物相對於FIX-CTP收集物具有改進的酶活性（**表5**）。FIX-CTP蛋白之改進的活性可在表現系統之最佳化（亦即與弗林蛋白酶共轉染以及維生素K3培養基濃度之最佳化）之後獲得，其在用弗林蛋白酶超轉染之後加強（資料未示出）。

【0643】 **表5**：FIX凝血活性

rhFIX（AD）（μg/ml）	PTT（秒）	FIX-CTP（μg/ml）	PTT（秒）	FIX-CTP-CTP（μg/ml）	PTT（秒）
5	31.3	9	45.2	4	47.5
1.25	35.7	2.25	53.3	1	55.9
0.3125	43	0.5625	64.1	0.25	67
0.078125	52.1	0.140625	76.3	0.0625	77.4

【0644】 **藥物動力學研究**：rhFIX（American Diagnostic）及 FIX-CTP 收集物以 75 微克/公斤體重之劑量以單次靜脈內注射投予史泊格多利大鼠（Sprague-Dawley rat，每種物質六隻大鼠）（**表 6**）。

【0645】 **表 6**：PK 研究操作計劃

處理組	測試物品	動物數/組	給藥途徑	性別	劑量水準（μg/kg）	劑量水準（μg/動物）	注射體積（μl）	濃度（μg/ml）	*時間點（給藥後小時）
1	rFIX	*6*	IV	M	75	15	500	30	0（給藥前）、0.083、0.5、1.5、4、8、24、48、72。
2	rFIX-CTP	*6*	IV	M	75	15	500	30	0（給藥前）、0.083、0.5、1.5、4、8、24、48、72。
3	rFIX-CTP-CTP	*6*	IV	M	75	15	1000	15	0（給藥前）、0.083、0.5、1.5、4、8、24、48、72。

【0646】 交替地在給藥後 0.083、0.5、1.5、4、8、24、48 及 72 小時自 3 隻大鼠後眼眶抽取血液樣品。在取樣之後立即製備血漿，且將其儲存在 -20℃ 下直至分析。FIX 濃度藉由 FIX ELISA-特異性分析（AssayPro）定量。計算每種蛋白質之藥物動力學特徵曲線，且其代表在每個時間點下 3 隻動物之平均值（資料未示出）。終末半衰期使用 PK Solutions 2.0 軟體計算。**表 7** 概述在不同取樣時間點下觀察到之 FIX 濃度。

【0647】 **表 7**：觀察到的 FIX 濃度

時間（小時）	FIX-AD（ng/ml）	FIX-CTP（ng/ml）	FIX-CTP-CTP（ng/ml）
0.083	1506.7	1477.5	1914.8
0.5	1949.8	1150.1	1830.1
1.5	2189.4	1009.0	1264.3
4	733.90	709.33	1000.00
8	319.80	167.20	1234.67
24	BLQ	54.625	230
48	BLQ	BLQ	120.9

【0648】 表 8 中概述 PK 特徵曲線及終末半衰期之概述。FIX-CTP 收集物與 rhFIX 相比展現 $T_{1/2\beta}$ 值改進（分別增加 2 倍及 5 倍）。由於在

FIX 給藥集合中，FIX 在 24 小時下之動物血清濃度低於定量限（BLQ），故不計算其他 PK 參數。

【0649】 **表 8**：PK 參數之概述

產品	終末半衰期（小時）	比率（FIX-(CTP)x/rhFIX）
rhFIX（American Diagnostics）	2.62	_
FIX-CTP	5.55	2.11
FIX-CTP（FIX-CTP-CTP）	12.9	4.92

【0650】 在此研究中，描述用於延長 FIX 半衰期同時保持治療效力之新穎方法。將 CTP 肽添加至活性蛋白具有干擾蛋白活性之潛在危害。因此，藉由在 FIX 之 C 端處添加 CTP 序列來生成活性重組 FIX-CTP 為出人意料的。

經免疫親和純化的 FIX-CTP-CTP 之表徵

【0651】 **FIX-CTP-CTP 純化**

【0652】 為了評估含量高級、活性增加、PK 特徵曲線模擬且可外推至臨床環境之蛋白質，FIX-CTP-CTP 為經在其羧基末端中串聯的 2 個 CTP 單元修飾之 FIX。FIX-CTP-CTP 使用針對 FIX 之 N 端區中存在之 γ 羧基麩胺醯基（Gla）殘基之基質結合的單株抗體純化（American Diagnostics 目錄號 3570MX）。單株抗體結合於瓊脂糖 CL-4B。濃度為 88 μg/ml 之 FIX-CTP-CTP 收集物用 20 mM Tris、150 Mm NaCl 及 10 mM EDTA（PH=7.4）透析。加載速率為 0.5 ml/min，溶離使用 20 Mm Tris-HCl、350 mM NaCl 及 50 mM CaCl 進行，且使未結合部分再循環五次。最後，溶離份用 PBS 透析，引出且濃縮。

【0653】 **測定 FIX 抗原含量**：FIX-CTP 收集物、FIX-$(CTP)_2$ 收集物及 FIX-$(CTP)_2$ 純化的蛋白質含量使用人類 FIX ELISA 套組（Affinity Biologicals；目錄號 FIX-AG RUO）測定。所計算之蛋白質濃度

（μg/ml）為兩次獨立運作之平均值（資料未示出，表 9）。

【0654】 **表 9**：所計算之蛋白質濃度

	FIX-CTP	FIX-CTP-CTP	FIX-CTP-CTP（經純化）
FIX 抗原含量（μg/ml）	125.78	88.53	172.9
SD	17.28	21.31	2.63
CV%	13.74	24.08	1.52

【0655】 另外，FIX-CTP-CTP 藉由布萊德福分析（Bradford assay）來定量。所計算之濃度為 202 μg/ml，其與利用人類 FIX ELISA 獲得之濃度相似。

【0656】 **SDS-PAGE 墨點**：將 FIX-CTP-CTP 收集物、未結合部分及經純化蛋白質加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE 庫馬斯（Coomassie）分析藉由用庫馬斯藍試劑染色凝膠來執行（800 ng 蛋白質）。西方免疫墨點用 100 ng 蛋白質、抗人類 FIX 多株抗體（Ab）及抗人類 γ 羧化單株抗體（American Diagnostics 目錄編號 499 及編號 3570）進行。免疫親和純化程序顯著增濃 FIX-CTP-CTP 部分，同時減少雜質（資料未示出）。

【0657】 **N 端定序**：FIX-CTP-CTP 純化的蛋白質藉由 12% Tris-甘胺酸 SDS-PAGE 分離且隨後電吸墨至 PVDF 膜。切割出相關條帶，且將其放置在經純化的 Biobrene 處理之玻璃纖維過濾器上。N 端序列分析藉由艾德曼降解（Edmann degradation）使用裝備有 140 C HPLC 微梯度系統之脈衝式液體蛋白定序器進行。N 端定序揭露，FIX-CTP-CTP 為不完全及完全前肽裂解之蛋白質的混合物。不充分前肽裂解展示出會降低 FIX 凝血活性。藉由與弗林蛋白酶共轉染，可改進前肽裂解過程。

【0658】 **測定 FIX 顯色活性**：FIX-CTP-CTP 純化的蛋白質對比 rhFIX（American Diagnostics）及人類正常血漿庫之活體外效力之比較

性評估使用市售顯色活性測試套組 BIOPHEN（Hyphen BioMed 221802）進行。在凝血酶、磷脂及鈣存在下，過量 FXIa 將 FIX 活化成 FIXa。FIXa 與凝血酶（過量供應）形成酶複合物，磷脂及鈣將分析系統中存在之因子 X 活化成 FXa。活性與 FIX 之量（其為限制因素）直接相關。所產生之 FXa 藉由其對 FXa 顯色受質（pNA）之比活性量測。所產生的 pNA 之量與 FIXa 活性成正比。將 rhFIX、人類血漿及 FIX-CTP-CTP 連續稀釋，且效力藉由比較劑量-反應曲線來評估（資料未示出）。rhFIX 之平均 EC_{50} 為 68.74 ng/ml，而 FIX-CTP-CTP 計算的 EC_{50} 為 505 ng/ml。觀察到 FIX-CTP-CTP 之酶活性對比重組 FIX 降低大約 7 倍，而對比正常人類引出的血漿降低 16.5 倍。此降低之活性可由利用 N 端分析鑑別之 N 端前肽之不充分裂解解釋。

【0659】 **FIX 凝血活性（aPTT）**：活化部分凝血活酶時間（aPTT）為凝血級聯之內源性及常見路徑之完整性的量度。aPTT 為在添加內源性路徑活化劑（磷脂及鈣）之後血漿凝結所需時間（以秒為單位量測）。

【0660】 所述分析藉由添加 rhFIX 來定量 FIX-CTP-CTP 蛋白恢復 FIX 耗盡之人類血漿之凝血活性的能力。將 300 µl FIX 缺失型人類血漿與 100 µl rhFIX、FIX-CTP-CTP（FIX-CTP-CTP（CTP 串聯位於 C 端））或正常人類血漿庫混合，其經進一步稀釋。在 37℃下培育 60 秒之後，將組織因子（TF）、$CaCl_2$ 及磷脂添加至混合物中。測定凝血時間（秒）。效力藉由比較 FIX-CTP-CTP 與 rhFIX 或人類血漿之參考製備物之劑量-反應曲線來評估。將一個單位之 FIX 定義為等同 1 ml 正常人類血漿之活性的 FIX 之量。

【0661】 aPTT 結果指示 FIX-CTP-CTP 凝血活性僅比正常人類血漿庫小 1.4 且與 rhFIX 相似。aPTT 結果連同顯色活性活體外分析表明，FIX-CTP-CTP 純化不損害其活性。

【0662】 **FIX-CTP-CTP 之藥物動力學活性：**經純化的 FIX-CTP-CTP、rhFIX（American Diagnostic）以及含有 FIX-CTP-CTP 及 FIX-CTP 之收集物以 100 微克/公斤體重之劑量以單次靜脈內注射投予史泊格多利大鼠（每種物質八隻大鼠）（表 10）。

【0663】 **表 10**：PK 研究概述

處理組	測試物品	動物數/組/時間點	劑量水準（μg/kg）	劑量水準（μg/動物）	注射體積（μl）	濃度（μg/ml）	時間點（給藥後小時）
A	rFIX	8	100	20	500	40	0（給藥前）、0.083、0.5、1、2、4、7、10、24、48、72。
B	rFIX-CTP（收集物）	8	100	20	500	40	0（給藥前）、0.083、0.5、1、2、4、7、10、24、48、72。
C	rFIX-CTP-CTP（收集物）	6	100	20	500	40	0（給藥前）、0.083、0.5、1、2、4、7、10、24、48、72。
D	rFIX-CTP-CTP（經純化）	4	100	20	500	40	0.083、0.5、1、2、4、7、10、24、4、8、72。

【0664】 交替地在給藥後 0.083、0.5、2、4、7、10、24、48 及 72 小時自 4 隻大鼠後眼眶抽取血液樣品。在取樣之後立即製備檸檬酸化血漿（0.32%），且將其儲存在-20℃下直至分析。FIX 濃度使用人類 FIX ELISA 套組（Affinity Biologicals）定量。每種蛋白質之藥物動力學特徵曲線計算為在每個時間點下 4 隻動物之平均值（**圖 4**）。終末半衰期使用 PK Solutions 2.0 軟體計算。**表 11** 概述在不同取樣時間點下觀察到之 FIX

濃度。

【0665】 表 11：觀察到之 FIX 濃度

時間（小時）	FIX-CTP 收集物 ng/ml	FIX-$(CTP)_2$ 收集物 ng/ml	rhFIX ng/ml	經純化的 FIX-CTP-CTP ng/ml
0.085	1038.97	1123.62	325.05	886.48
0.5	939.12	956.80	274.58	670.92
1	791.97	843.85	222.90	674.17
2	304.98	673.31	186.00	503.91
4	315.37	525.50	109.69	357.36
7	171.45	384.36	67.62	257.02
10	50.34	250.73	40.20	158.66
24	10.07	78.50	BLQ	52.13
48	BLQ	23.40	BLQ	18.07

【0666】 表 12 中呈現 PK 參數之概述。

【0667】 表 12：PK 參數之概述

	T½（小時）	AUC ng-hr/ml	MRT（小時）	Vd ml/Kg	CL Ml/hr/Kg
FIX-CTP 收集物	4.17	3622	4.5	155.1	27.6
FIX-$(CTP)_2$ 收集物	10.44	9105.7	12	165.4	10.9
rhFIX	3.72	1416.8	5.1	373.8	70.183
經純化的 FIX-CTP-CTP	11.14	6314.2	12.3	254.5	15.83

【0668】 FIX-CTP-CTP 收集物證實與 FIX-CTP 收集物相比 PK 特徵曲線改進。此外，與 rhFIX 相比經純化的 FIX-CTP-CTP 展現出 $T½_{\beta}$ 值增加 3 倍且 AUC 增加 4.5 倍。

【0669】 對比單個 CTP 之融合體，融合至串聯 CTP 分子之分泌的 FIX 的量減少似乎歸因於添加一個額外 CTP，且不歸因於減少之藉由 ELISA 的偵測，因為布萊德福純化的 FIX-CTP-CTP 計算的濃度與 ELISA 計算的濃度相似。

【0670】 FIX-CTP-CTP 凝血活性與彙集之人類血漿相似；然而，其活體外顯色活性當與 rhFIX 或彙集之人類血漿相比時顯著降低。與凝血分析相比，顯色活性分析被報導為極靈敏的分析。FIX-CTP-CTP 活性降低之原因可不同。添加 CTP 可降低 FIX 對 FXIa 之親和力或減少轉錄後修

飾（例如 12-10 個 GLA 殘基及前肽裂解）。N 端分析揭露，FIX-CTP-CTP 前肽之蛋白水解裂解在分泌之前尚未完全完成。由於此轉錄後修飾對於蛋白質之正常酶活性至關重要，故與 Furine-PACE 質體共轉染為有利的且可改進 FIX-CTP-CTP 活性。

【0671】 最後，在大鼠中之 FIX-CTP-CTP 比較性 PK 研究證實，兩個串聯 CTP 與 FIX 之 C 端的融合產生具有延長半衰期之 FIX。

【0672】 **FIX 耗盡之小鼠模型：**為了評估活體內活性，獲得 FIX 基因剔除小鼠，且建立繁殖群。將 10 μg 商業重組 hFIX（BeneFIX®）或 rFIX-$(CTP)_2$（FIX-CTP-CTP）注射至經麻醉 FIX 基因剔除小鼠（22-28 g）之尾靜脈中。所注射蛋白質之量等於正常血漿中 FIX 之所需濃度（5 μg/ml）。血液樣品在特定時間點下自剪斷之尾部獲取至肝素化毛細管中。藉由 ELISA 評估血漿樣品之 FIX 含量，且藉由 aPTT 凝血分析來量測功效。

【0673】 **增加 FIX 前肽裂解功效：**CTP 肽 cDNA 融合至人類 FIX cDNA 之 3'端。將相應的 rFIX 及弗林蛋白酶表現構築體共轉染至 DG44 細胞中；人類 rFIX cDNA 亦與作為對照之弗林蛋白酶質體一起共轉染。歸因於細胞中弗林蛋白酶之有限量，高含量 FIX 之分泌引起前因子及成熟因子 FIX 之混合物的分泌。弗林蛋白酶表現載體與前因子表現載體之共轉染增加回收率，且引起經完全處理之 FIX 分泌至培養基中。

【0674】 在 FIX-$(CTP)_2$ 及弗林蛋白酶共轉染之後，產生穩定純系，且將收集物收集起來用於前肽裂解評估。將 100 ng 蛋白質加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE 分析藉由西方免疫墨點使用抗人類 FIX 多株抗體

（American Diagnostics）及抗前肽多株抗體執行。如前報導，rhFIX 遷移至少 55 KDa，而融合至兩個 CTP 之 FIX 遷移在 75 kDa 下。FIX 蛋白質之兩種變異體展示出均經歷適當的完全前肽裂解。

【0675】 為了測定適當前肽裂解是否改進 FIX-$(CTP)_2$ 酶活性，進行與弗林蛋白酶共轉染之 FIX-$(CTP)_2$ 收集物之顯色及凝血活性的比較性評估。觀察到 FIX-$(CTP)_2$ 比活性之顯著改進，其與 rhFIX 相似。

【0676】 總之，本文所述的結果表明 FIX-CTP-CTP 可有效用於治療 B 型血友病患者。融合至 CTP 構築體之 FIX 得益於改進的活體內藥理學效能，其克服某些活體外措施之缺點。所建議之此種處理優於先前處理，因為輸注速率及所需劑量之量減小。

【0677】 重要的是注意到當白蛋白融合的分子策略用於改進 FIX 半衰期時，重組 FIX 變得不活化。本發明新穎方法產生呈現改進的持久活性之新穎重組 FIX 融合的蛋白質之設計及純化。由於僅僅大小修飾不會改進所注射之 FIX 之藥物動力學，故 CTP 融合至 FIX 有助於藥物動力學參數之發現為出人意料的。經高度糖基化的肽-唾液酸殘基之存在使蛋白質穩定且保護其免於與血管受體之相互作用，且不消除 FIX 功能之關鍵決定因素。

【0678】 FIX-CTP 在 B 型血友病患者中具有與 rFIX 類似的治療功效，且所需給藥更不頻繁。單次注射 FIX-CTP 足以控制出血事件，且減少在 B 型血友病患者之手術干預期間所需的注射次數。

【0679】 CTP 技術用於發展長效 FIX。具體來說，延長重組 rFIX 分子之半衰期藉由將至少一個人類 CTP 融合至 FIX 來執行。重組 FIX-CTP 在哺乳動物細胞中表現且在活體外及活體內表徵。已證實，rFIX-CTP 之

活體外活性與 rFIX 相當。在大鼠中之藥物動力學及功效研究證實 rFIX-CTP 之改進的特性。此研究結果展現出，開發止血特性與野生型酶類似之半衰期延長的 rFIX 分子為可行的。

實例 4-經純化的 FIX-CTP$_3$ 對比 FIX-CTP$_4$ 及 FIX-CTP$_5$ 之比較性評估

【0680】 **2.1 研究目標**

【0681】 在部分純化製程之後 FIX-CTP$_4$ 及 FIX-CTP$_5$ 對比 FIX-CTP$_3$ 之藥物動力學參數之比較性評估。

【0682】 **2.2 製造 FIX-CTP$_4$ 及 FIX-CTP$_5$ 收集物**

【0683】 在 C 端處融合至四或五個串聯 CTP 序列之 FIX cDNA（OriGene RC219065）使用 Excellgene 表現系統在 10 ng/L 維生素 K3（西格瑪，Mennadion）存在下表現在 DG44 細胞中。對收集物（300 ml）進行收集，過濾且冷凍。

【0684】 **2.3 製造 FIX-CTP$_3$ 收集物**

【0685】 FIX-CTP$_3$ 使用 pCI-DHFR 載體、純系 196、BR-9 在 25 ng/L 維生素 K3（西格瑪）存在下在 CHO 細胞中自產表現。收集且過濾收集物。

【0686】 所有 FIX-CTP 樣品（3、4 及 5 個 CTP）因缺乏材料而僅藉由木菠蘿凝集素（Jacalin）管柱純化。

【0687】 **2.4 測定 FIX 抗原含量**

【0688】 FIX 抗原含量使用人類 FIX ELISA 套組（Affinity Biologicals；目錄號 FIX-AG RUO）測定。所計算之蛋白質濃度為四個獨立運作之平均值。FIX-CTP$_3$ 濃度與其他兩個型式相比略微較高（表 13）。

【0689】 **表 13**：FIX 抗原含量

	3 個 CTP 最終木菠蘿凝集素 40	4 個 CTP 最終木菠蘿凝集素 40	5 個 CTP 最終木菠蘿凝集素 40
平均值（ng/ml）	1016.69	4644.11	1686.82
SD	225.41	925.63	160.07
CV%	22.17	19.93	9.49

【0690】 **2.5 FIX-CTP 庫馬斯染色及免疫墨點**

【0691】 將 FIX-CTP_3、FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 收集物加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE 分析使用抗 CTP 多株抗體（Adar Biotech Production）或抗 Gla 抗體（American Diagnostica）藉由西方免疫墨點執行。

【0692】 如前報導，與三個 CTP 融合之 FIX 在 80 kDa 下遷移，而與四或五個 CTP 融合之 FIX 分別在 85 KDa 或 90 KDa 下遷移。正如所料，來自 Excellgene 之 FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 收集物與在 Prolor 製造之 FIX-CTP_3 收集物相比展示極低 γ 羧化水準（**圖 5**）。

【0693】 在利用木菠蘿凝集素管柱之純化製程（經糖基化蛋白之免疫親和純化）之後，將 FIX-CTP_3、FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE 利用庫馬斯藍染料染色以用於樣品偵測。所有變異體均展示出更乾淨的條帶特徵曲線（**圖 6**），表明純度改進。

【0694】 **2.6 測定 FIX 顯色活性**

【0695】 經完全純化（HA 管柱）的 FIX-CTP_3、FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 對比人類正常血漿庫之活體外效力之比較性評估使用市售顯色活性測試套組 BIOPHEN（Hyphen BioMed 221802）進行。所有樣品均經連續稀釋，且效力藉由將劑量-反應曲線與正常人類血漿之參考製備物比較來評估。FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 與血漿相比顯色活性降低（**圖 7**）可為

FIX 蛋白之不當轉錄後修飾的結果，例如不當 γ 羧化及前肽裂解，或可替代地歸因於添加 CTP 卡匣。FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5 活性之波動（**表 14**）可能由歸因於 CTP 掩蔽抗原位點之 FIX ELISA 之不當定量能力引起。

【0696】 **表 14**：樣品/血漿 EC50 比率

樣品	樣品/血漿 EC50 比率
血漿	1
3 個 CTP 最終 HA	2
4 個 CTP 最終 HA	5.35
5 個 CTP 最終 HA	2.73

【0697】 **2.7 藥物動力學研究**

【0698】 木菠蘿凝集素純化的 FIX-CTP_3、FIX-CTP_4 及 FIX-CTP_5（分別為組 A、B 及 C）以 250 微克/公斤體重之劑量以單次靜脈內注射投予史泊格多利大鼠（每治療組六隻大鼠）。交替地在給藥後 0.083、0.5、2、5、8、24、48、72 及 96 小時自 3 隻大鼠後眼眶抽取血液樣品（**表 15**）。在取樣之後立即製備檸檬酸化血漿（0.38%），且將其儲存在-20℃下直至分析。

【0699】 **表 15**：PK 研究操作計劃

處理組	處理	動物數/組	給藥途徑	劑量水準（μg/動物）	注射體積（μl）	濃度（μg/ml）	時間點（給藥後小時）
A	FIX-CTP*3 木菠蘿凝集素 40	6	IV	50	200	250	0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96
B	FIX-CTP*4 木菠蘿凝集素 40	6	IV	50	200	250	0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96
C	FIX-CTP*5 木菠蘿凝集素 40	6	IV	50	200	250	0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96

【0700】 血漿樣品中之 FIX 濃度使用人類 FIX ELISA 套組（Affinity Biologicals）定量。計算藥物動力學特徵曲線，且其為在各時間點下 3 隻動物之平均值。終末半衰期使用 PK Solutions 2.0 軟體計算。下**表 16** 概述在不同取樣時間點下計算之 FIX 濃度。

【0701】 **表 16**：所計算之 FIX 濃度

時間（小時）	平均值 3 個 CTP ng/ml	SD 3 個 CTP	平均值 4 個 CTP ng/ml	SD 4 個 CTP	平均值 5 個 CTP ng/ml	SD 5 個 CTP
0.083	1087.82	72.39	904.54	21.06	1097.23	82.24
0.5	774.18	86.31	736.82	66.93	998.79	70.43
2	562.23	3.70	627.09	32.47	747.85	14.02
5	357.44	8.63	431.23	29.41	576.49	27.36
8	239.20	7.82	327.46	30.26	394.96	36.48
24	77.08	4.26	107.38	5.18	142.42	16.13
48	27.73	2.02	39.83	1.85	53.66	3.33
72	12.55	1.48	21.53	1.55	23.54	3.32
96	6.66	1.23	10.63	0.13	18.54	3.39

【0702】 PK 特徵曲線及 PK 參數之概述呈現在下**表 17** 及**圖 8** 中。在所有時間點下之完整 PK 分析特徵曲線提示，與 FIX-CTP3 相比，向 FIX 添加 4 或 5 個 CTP 卡匣不延長其半衰期。對比 FIX-CTP3，在投予 FIX-CTP5 之後的 AUC 增加 1.4 倍至 1.6 倍，此在統計學上不顯著。

【0703】 **表 17**：PK 特徵曲線及 PK 參數之概述

24-96 小時			
半衰期（小時）	20.43	22.02	23.96
AUC（ng-hr/ml）	8218.38	10504.49	13329.41
Vd（ml/kg）	700.76	586.02	494.89
CL（ml/hr/kg）	23.77	18.45	14.32

【0704】 由於給藥後 96 小時樣品展示出具有處於分析定量下限之極低 FIX 濃度，故重新計算終末半衰期，提供更確切且科學上恰當的計算（**表 18**）。根據此計算，甚至在 FIX-CTP$_3$、FIX-CTP$_4$ 及 FIX-CTP$_5$ 之半衰期之間獲得更小差異。

【0705】 **表 18**：重新計算的終末半衰期

8-72 小時			
半衰期（小時）	15.38	16.63	16.04

【0706】 **2.8 結論：**

【0707】 在此研究中，評估 FIX-CTP$_3$、FIX-CTP$_4$ 及 FIX-CTP$_5$ 之藥物動力學參數及潛在凝血活性。與 FIX-CTP$_3$ 相比，4 及 5 個 CTP 與

FIX 之融合不提供優異或改進的半衰期延長，且觀察到顯色活性降低。下**表 19** 概述不同 FIX-CTP 融合變異體（1 至 5 個 CTP）之半衰期之改進百分比。CTP 與 FIX 之融合改進其藥物動力學行為，但不可預見地，此改進為有限的。出人意料地，在 3、4 或 5 個 CTP 串聯融合至 FIX 之後，計算類似的半衰期值。

【0708】 **表 19**：半衰期之改進百分比之概述

FIX 型式	T½（8-72 小時）增加%
rhFIX 對比 1CTP	112
1CTP 對比 2CTP	141
2CTP 對比 3CTP	37
3CTP 對比 4CTP	6
4CTP 對比 5CTP	0

【0709】 此等資料表明，3 個 CTP 與 FIX 的融合在蛋白質半衰期方面產生最大改進，證實 FIX-CTP_3 就用於進一步臨床發展之半衰期、結構及潛在凝血活性而言為最佳變異體。

實例 5-凝血因子 FVII 之生成及使用

【0710】 長效型式之活化因子 VII（FVIIa）凝血因子將適用於治療患有 A 型及 B 型血友病之患者。FVII-CTP3 重組蛋白具有藉由降低輸注頻率及甚至藉由降低藥物負載來改進對血友病患者之治療的臨床潛力，實現預防性治療方法，其可顯著改進患者的生活品質，避免自發的出血事件以及對關節及其他器官之累積的損傷。

【0711】 本文中描述基於 FVII 與人類 CTP 之融合的具有延長半衰期之重組 FVIIa-CTP 分子之生成。重組 FVIIa-CTP 在哺乳動物細胞中表現且在活體外及活體內表徵。已證實，rFVII-CTP 活性與 rFVII 相當。在大鼠中之藥物動力學及功效研究證實 rFVII-CTP 之改進的特性。此研究結果展現出，開發止血特性與野生型酶極類似之半衰期延長的 rFVIIa 分

子為可行的。

【0712】 **重組 FVII 分子之選殖及表現：**數個因子 VII 純系在吾人之真核表現載體（pCI-dhfrr）中構築（**圖 9**）。人類 MGC 驗證的含有智人凝血因子 VII 之序列的 FL cDNA 純系（IRCM）定購自「Open Biosystems」（OB-MHS4426）。以下引子由 Sigma-Genosys 按以下序列合成：引子 67：5'CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCC3'（含有因子 VII DNA 之 5'端及 XhoI 之限制位點）（SEQ ID NO: 91）；引子 68^R：5' TCTAGAATAGGTATTTTTCCACATG3'（含有 XbaI 之限制位點）（SEQ ID NO: 92）；引子 69：5' TCTAGAAAAAAGAAATGCCAGC3'（含有 XbaI 之限制位點）（SEQ ID NO: 93）；以及引子 70^R：5'GCGGCCGCATCCTCAGGGAAATGGGGCTCGCA3'（含有因子 VII DNA 之 3'端及 NotI 之限制位點）（SEQ ID NO: 94）。

【0713】 選殖在兩組 PCR 反應中進行。第一反應用引子 67 及引子 68^R 使用作為模板之具有因子 VII 序列之 cDNA 質體（OB-MHS4426）進行；由於 PCR 擴增，形成約 534 bp 產物，分離，且接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄號：K2000-01）。將含有因子 VII 序列之胺基末端的 XhoI-XbaI 片段分離。第二反應用引子 69 及引子 70^R 進行，且再將具有因子 VII 序列之 cDNA 質體（OB-MHS4426）用作模板。由於 PCR 擴增，形成約 813 bp 產物，且接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄號：K2000-01）。將含有因子 VII 序列之羧基末端的 XbaI-NotI 片段分離。將兩個片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中（三重接合），得到 501-0-p136-1 純系。

【0714】 質體 501-p136-1（pCI-dhfr 載體中之因子 VII）用限制酶 XhoI 及 KpnI 消化。分離約 1186 bp 之片段。藉由 GeneArt（0721543）合成的後接 CTP 序列、終止序列及 NotI 序列之部分因子 VII 純系（1180 bp-1322 bp）用限制酶 KpnI 及 NotI 消化。分離約 253 bp 之片段。將兩個片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中（三重接合），得到 501-1-p137-2 純系。pCI-dhfr-701-2-p24-2 用限制酶 XhoI 及 ApaI 消化，且分離大片段（載體）。

【0715】 pCI-dhfr-501-2-p137-2（因子 VII-CTP×1）用限制酶 XhoI 及 ApaI 消化，且分離約 1200 bp 插入序列。將載體及插入序列接合，得到 501-2-p139-2。將 DG44 細胞接種在 100 mm 組織培養皿中且生長至 50-60%匯合。總共 2 μg DNA 用於一個 100 mm 培養盤使用 FuGene 試劑（羅氏）在無蛋白質培養基（Invitrogen CD Dg44）中之轉染。轉染後 48 小時移除培養基，且用無核苷之無蛋白質培養基（Invitrogen CD Dg44）替換。在 14 天之後，將經轉染的細胞群體轉移至 T25 組織培養燒瓶中，且選擇持續 10-14 天，直至細胞開始充分生長為穩定純系。選擇高表現純系，且大約 2×10^7 個細胞用於接種 1700 cm^2 滾瓶（康寧，紐約州康寧）中之補充有 5 ng/ml 維生素 K3（甲萘醌硫酸氫鈉；西格瑪）之 300 ml 生長培養基。在細胞存活率快速降低至約 70%之後收集生產培養基（收集物）。首先使生產培養基澄清，且接著濃縮大約 20 倍，且使用流動過濾卡匣（10 KDa MWCO；密理博公司，麻薩諸塞州畢瑞萊卡（Billerica, MA））用 PBS 透析。

【0716】 **測定 FVII 抗原含量**

【0717】 編碼 CTP 肽之 cDNA 融合至編碼人類 FVII 之 cDNA 的 3'

端。將相應的 rFVII 構築體轉染至 DG44 細胞中。使用人類 rFVII cDNA 作為對照。收集生產培養基（收集物），濃縮，且進一步評估所分泌的重組 FVII。rFVII、rFVII-CTP 及 rFVII-CTP-CTP 抗原含量藉由 AssayMax 人類 FVII ELISA 套組（AssayPro）測定（**圖 10A**）。與原生 rFVII 相比，rFVII-CTP 及 rFVII-$(CTP)_2$ 之分泌量無顯著差異。

【0718】 **SDS-PAGE 墨點**

【0719】 SDS-PAGE 分析藉由加載 50 ng 收集物（經純化或活化的 rFVII 蛋白）來進行。將樣品加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠上。SDS-PAGE 分析藉由使用抗人類 FVII 單株抗體（Ab）（R&D systems）或抗 CTP 多株抗體（其在家兔中生成）執行西方免疫墨點來進行。

【0720】 rFVII 抗原含量與在使用抗 FVII 抗體免疫吸墨之 SDS-PAGE 中偵測到之蛋白質含量相關。rFVII-CTP 以單個條帶形式遷移，而 FVII 對照之相應分子量為大約 52 KDa（資料未示出）。兩種蛋白質均與免疫墨點上對 FVII 具有特異性之抗體反應。rFVII-CTP 亦與對 CTP 具有特異性之抗體反應。rFVII 以其無痕量活化蛋白之酶元形式分泌。

【0721】 **FVII 顯色活性：**

【0722】 rFVII、rFVII-CTP 及 rFVII-$(CTP)_2$ 收集物活性使用市售顯色測試套組（AssaySense 人類 FVII 顯色活性分析套組（AssayPro）測定。對於 rFVII-CTP 之功能表徵及其經進一步活化（FVIIa）之能力，將濃縮的 rFVII-CTP（收集物）放入市售顯色測試套組中，所述測試套組量測 TF/FVIIa 將因子 X 活化成因子 Xa 之能力，所述因子 Xa 在 FXa 特異性受質存在下釋放定量信號（AssayPro）。在 rFVII 蛋白之 C 端處添加

CTP 肽不削弱 FVII 絲胺酸蛋白酶活性（圖 **10B**、**10C**）。

【0723】 **FVII 凝血活性：**

【0724】 凝血酶原時間（PT）量測凝血之外源性路徑。PT 為在添加外源性路徑活化劑（磷脂及鈣）之後血漿凝結所需時間（以秒為單位量測）。其用於測定血液之凝血傾向，尤其在華法林（warfarin）劑量、肝臟損傷及維生素 K 狀態之量測中。凝血酶原時間之參考範圍通常為約 12-15 秒。特定言之，所述分析藉由添加 rhFVII 來定量 FVII-CTP 及 FVII-$(CTP)_2$ 收集物恢復 FVII 耗盡之人類血漿之凝血活性的能力。將 300 μl FVII 缺失型人類血漿與 100 μl 特定濃度之 FVII、FVII-CTP 及 FVII-$(CTP)_2$ 收集物或正常人類血漿庫混合，且進一步稀釋。在 37℃下培育 60 秒之後，將組織因子（TF）、$CaCl_2$ 及磷脂添加至混合物中。測定凝血時間（秒）。效力藉由比較 FVII-CTP 及 FVII-$(CTP)_2$ 收集物與由 rhFVII 或人類血漿庫組成之參考製備物之劑量-反應曲線來評估。一個單位之活性 FIX 定義為等同 1 ml 人類正常血漿之活性的 FIX 之量。rFVII 及 rFVII-CTP 之 PT 凝血活性在凝血計（Instrumentation Laboratory）上量測。

【0725】 如前所示，在 rFVII 蛋白之 C 端處添加 CTP 肽不損壞其絲胺酸蛋白酶活性，且引起人類血漿中之原生因子 X 及因子 IX 之起始及活化。在 C 端處插入另一 CTP 之後，絲胺酸蛋白酶活性降低三倍（資料未示出）。

【0726】 **藥物動力學研究：**

【0727】 rFVII、rFVII-CTP 及 rFVII-$(CTP)_2$ 收集物以 100 微克/公斤體重之劑量靜脈內投予史泊格多利大鼠（每種物質六隻大鼠）。對於所

有活體內實驗，對應蛋白質之量基於 FVII ELISA 套組測定。對於每種 FVII 測試物質，藉由考慮 rFVII 對比 rFVII-CTP 之分子量差異來計算注射量，此產生不同莫耳濃度。

【0728】 使用改變的取樣流程後眼眶抽取血液樣品，以使對欲定量之取樣程序層面之干擾減至最少：在 30 及 90 分鐘下及在 2、6 及 48 小時下自 3 隻大鼠抽取，以及在 15 及 60 分鐘下及在 1.5、4 及 24 小時下交替地自其餘三隻大鼠抽取。在取樣之後立即製備血漿，且將其儲存在-20℃下直至分析。FVII 濃度藉由 FVII ELISA 特異性分析定量。半衰期及 AUC 使用線性梯形法則計算。此等清除率參數之比較揭露出，活體內半衰期及 rFVII-$(CTP)_2$ AUC 顯著高於 rFVII 之彼等（**表 20**）。

【0729】 **表 20**：PK 研究參數

組	途徑	劑量	T½	AUC_{0-t}	CL/F	MRT
		μg/kg	min	ng/min/mL	mL/min/kg	min
FVII	IV	60	4.07	3314.7	6.195	6.2
FVII-CTP	IV	60	β=51.06	31353.9	0.287	73.7
FVII-CTP-CTP	IV	60	β=13.66	7626.8	1.18	15.4

【0730】 **重組 FVIIa-CTP 之表徵：**

【0731】 在活化期間，FVII 在 R152 處裂解，得到利用單個二硫橋鍵結合在一起之重鏈及輕鏈域。rFVIIa-$(CTP)_2$ 利用離子交換管柱純化製程純化並活化。為了充分評估 rFVIIa-$(CTP)_2$，將蛋白質加載在處於對商業 FVIIa（NovoSeven®）還原條件下之 SDS-PAGE 上重鏈及輕鏈域分離，且以分子量 55 及 25 KDa 之分開的條帶形式遷移。兩種蛋白質均與對 FVII 具有特異性之抗體反應，但 rFVIIa-CTP 之重鏈與抗 CTP 特異性抗體特異性地反應，指示此條帶代表融合至 CTP 之 FVII 重鏈。輕鏈與抗 γ 羧化酶抗體特異性地反應。FVIIa 蛋白質濃度藉由 FVIIa 特異性 ELISA 套組測定。

【0732】 **FVIIa N 端定序：**

【0733】 活化的或酶元純化的蛋白質中之 rFVII-CTP-CTP 藉由 SDS-PAGE（在 12% Tris-甘胺酸）上分離，且隨後電轉染至 PVDF 膜上。切割出相關條帶，且將其放置在經純化的 Biobrene 處理之玻璃纖維過濾器上。N 端序列分析藉由艾德曼降解使用裝備有 140C HPLC 微梯度系統之脈衝式液體蛋白定序器進行。重組蛋白之身分及適當前肽裂解藉由 N 端定序來進一步驗證。

【0734】 **FVIIa 凝血活性：**

【0735】 為了評估 FVII-$(CTP)_2$ 凝血活性，進行活化部分凝血活酶時間分析（aPTT）。FVII 缺失型血漿樣品經 rFVIIa（NovoSeven®）或 rFVIIa-$(CTP)_2$ 取代。300 µl FVII 缺失型人類血漿與 100 µl 特定濃度之 FVIIa 或 rFVIIa-$(CTP)_2$ 或正常彙集之人類血漿混合，其經進一步稀釋。在 37℃下培育 60 秒後。將組織因子（TF）、$CaCl_2$ 及磷脂添加至混合物中。測定凝血時間（秒）。效力藉由比較 rFVIIa-$(CTP)_2$ 與由 rhFVIIa 或人類正常血漿庫組成之參考製備物之劑量-反應曲線來評估。將一個單位之 FVIIa 定義為等同 1 ml 人類正常血漿之活性的 FVIIa 之量。rFVII 及 rFVIIa-$(CTP)_2$ 之 aPTT 凝血活性在凝血計（Instrumentation Laboratory）上量測。rFVIIa 與 rFVIIa-$(CTP)_2$ 之 aPTT 凝血活性類似。

【0736】 **大鼠中之藥物動力學研究：**

【0737】 為了表徵將 CTP 添加至 rFVIIa 對其壽命潛力之影響，在大鼠中進行比較性藥物動力學研究。將含 NovoSeven®（rFVIIa）及 rFVIIa-$(CTP)_2$ 之 TBS IV 注射至 6 隻 SD 大鼠。FVIIa 隨時間推移之含量使用 FVIIa ELISA 套組偵測。計算每種蛋白質之半衰期及 AUC。此等清

除率參數之比較揭露出，rFVIIa-$(CTP)_2$之半衰期、回收率及 AUC 之活體內量測值優於 NovoSeven®之彼等。

【0738】 FVIIa-CTP 活體內功效模型（血友病之 FVIII 缺失型小鼠模型）：

【0739】 為了評估活體內活性模型，獲得 FVIII 基因剔除小鼠，且建立繁殖群。將 10 μg 商業重組 hFVIIa（NovoSeven®）或 rFVIIa-$(CTP)_2$ 注射至經麻醉 FVIII 基因剔除小鼠（22-28 g）之尾靜脈中。所注射蛋白質之量等於正常血漿中 FVIII 之所需濃度（5 μg/ml）。血液樣品在特定時間點下自剪斷之尾部獲取至肝素化毛細管中。藉由 ELISA 評估血漿樣品之 FVIIa 含量，且藉由 aPTT 凝血分析量測功效。

【0740】 在此研究中，生成 FVII 與 CTP 之融合構築體。此重組蛋白為提供延長半衰期並保留治療效力之治療的基礎。

【0741】 此等結果表明，rFVIIa-$(CTP)_2$ 在血友病患者中具有與 rFVIIa 類似的治療功效。此外，此種技術需要更不頻繁的給藥。似乎單次注射 rFVIIa-$(CTP)_2$ 足以控制出血事件，且減少在手術干預期間所需的注射次數。此重組蛋白可用作長期預防性治療。

實例 6-經純化的 FVII-CTP_3、FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 之比較性評估

【0742】 5.1 研究目標

【0743】 FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 對比 FVII-CTP_3 之藥物動力學參數及凝血活性之比較性評估。

【0744】 5.2 製造 FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 收集物

【0745】 在 C 端處融合至四或五個串聯 CTP 序列之 FVII cDNA 使用 Excellgene 表現系統在 20 μg/L 維生素 K3（西格瑪，Mennadion）存

在下表現在 DG44 細胞中。對收集物（300 ml）進行收集，過濾且冷凍。

【0746】 **5.3 製造 FVII-CTP$_3$ 收集物**

【0747】 FVII-CTP$_3$ 使用 pCI-DHFR 載體自產地表現在哺乳動物表現系統 CHO 細胞中。穩定轉染庫 71 號在 25 ng/L 維生素 K3（西格瑪）存在下生長在搖瓶中。收集且過濾收集物。

【0748】 將所有 FVII-CTP 收集物（3、4 及 5 個 CTP）濃縮，且使用 Pellicon XL MWCO 10 kDa 用 TBS（50 mM Tris、150 mM NaCl，pH 7.4）透析。FVII 之自活化藉由在 2-8℃下在 $CaCl_2$ 存在下培育經純化的 FVII-CTP$_3$ 隔夜來誘導。活化亦藉由使用 Q 樹脂管柱來進行。

【0749】 **5.4 測定 FVII 抗原含量**

【0750】 FVII 抗原含量使用人類 FVII ELISA 套組（Zymotest HyPhen）測定（**表 21**）。所計算之蛋白質濃度為兩個獨立運作之平均值。

【0751】 **表 21**：FVII 抗原含量

平均值（ng/ml）	224357.3	87884.1	589423
SD	44789.5	3248.7	5309
CV%	20.0	3.7	9

【0752】 **5.5 FVII-CTP 免疫墨點**

【0753】 將 FVII-CTP$_3$、FVII CTP$_4$ 及 FVII-CTP$_5$ 收集物加載在使用 Precision Plus 雙重顏色蛋白質標記物（伯瑞）之 12% Tris-甘胺酸凝膠（*expedeon*）上。SDS-PAGE 分析使用抗 CTP 多株抗體（Adar Biotech Production）或抗 Gla 抗體（American Diagnostica）藉由西方免疫墨點執行。

【0754】 融合至三個、四個及五個 CTP 之 FVII 分別在 80、90 及 100 kDa 下遷移。正如所料，與在 Prolor 製造之 FVII-CTP_3 收集物相比，由於製造方法未經最佳化，來自 Excellgene 之 FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 收集物含有低 γ 羧化含量（資料未示出）。

【0755】 **5.6 FVII 活體外效力之比較性評估**

【0756】 HA 純化（高度 γ 羧化部分）的 FVII-CTP_3、FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 對比正常人類血漿庫之活體外效力之比較性評估使用市售顯色活性測試套組 BIOPHEN（Hyphen BioMed 221304）進行。所有樣品均經連續稀釋，且效力藉由將劑量-反應曲線與由正常人類血漿組成之參考製備物比較來評估。FVII-CTP_3 及 FVII-CTP_5 證實顯色活性低於彙集的正常血漿（資料未示出）。FVII-CTP_4 展現出與 FVII-CTP_3 及 FVII-CTP_5 相比，如由 EC50 比率反映出的較高活性（**表 22**）。

【0757】 **表 22**：FVII 活體外凝血活性

血漿	0.05	
FVII 3CTP	0.12	2.72
FVII 4CTP	0.03	0.71
FVII 5CTP	0.06	1.35

【0758】 **5.7 FVII 活體外凝血活性：**

【0759】 在示巴醫學中心（Sheba Medical Center），以色列國家凝血中心（Israel National Coagulation Center）中進行之因子 VII（FVII）活性分析為使用因子 VII 缺失之免疫吸附血漿的基於凝血酶原（PT）之分析（西門子（Siemens））。PT 試劑為依諾伐（innovin），且分析在 Sysmex® CA 1500 儀器中進行。FVII 正常範圍在 55-145%內。

【0760】 **表 23**：FVII 活體外顯色活性

FVII 3CTP	36	0.5	224.2
	18	0.25	
	6	0.125	
FVII 4 CTP	334	0.5	87.9
	176	0.25	
	93	6.25	
FVII 5 CTP	38	0.5	58.9
	19	0.25	
	10	0.125	

【0761】 由於體內循環 FVII 之正常含量為約 0.5 μg/ml，故 FVII-CTP_3 及 FVII-CTP_5 收集物對比正常人類血漿庫展現出其凝血活性降低 3 倍；此結果與所獲得之顯色活性相關（**表 23**）。

【0762】 如在顯色活性分析中觀察到，FVII-CTP_4 收集物對比正常人類血漿庫展現出其潛在凝血活性提高 3 倍（**表 23**）。FVII-CTP_4 之活性百分比與 FVII-CTP_3 及 FVII-CTP_5 之活性百分比相比高得多。ELISA 方法之方法侷限性可限制 FVII-CTP_4 之抗原含量計算之準確性。

【0763】 **5.8 藥物動力學研究**

【0764】 進行兩個藥物動力學研究以便測定 FVII-CTP_3、FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 藥物動力學（PK）參數。在第一個研究期間，FVII-CTP_3、FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5（分別為組 A、B 及 C）以 250 微克/公斤體重之劑量以單次靜脈內注射投予史泊格多利大鼠（每治療組六隻大鼠）。交替地在給藥後 0.083、0.5、2、5、8、24、48、72 及 96 小時自 3 隻大鼠後眼眶抽取血液樣品（**表 24**）。在取樣之後立即製備檸檬酸化血漿（0.38%），且將其儲存在-20℃下直至分析。

【0765】 **表 24**：藥物動力學研究設計-濃縮的收集物

處理組	測試物品	動物數/組/時間點	給藥途徑	劑量水準（μg/動物）	注射體積（μl）	濃度（μg/ml）	時間點（給藥後小時）
A	FVII-CTP*3	6	IV	50	200	250	0（給藥前）、0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96
B	FVII-CTP*4	6	IV	50	200	250	0（給藥前）、0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96
C	FVII-CTP*5	6	IV	50	200	250	0（給藥前）、0.083、0.5、2、5、8、24、48、72、96

【0766】 血漿樣品中之 FVII 濃度使用人類 FVII Elisa 套組（Zymutest FVII-Biophen）定量。計算藥物動力學特徵曲線，且其為在各時間點下 3 隻動物之平均值。終末半衰期值使用 PK Solutions 2.0 軟體計算。下**表 25** 概述在不同取樣時間點下計算之 FVII 濃度。下文亦呈現 PK 特徵曲線（圖 23-24）及 PK 參數之概述（**表 26**）。FVII-CTP$_5$ 與 FVII-CTP$_3$ 及 FVII-CTP$_4$ 相比展現優異的特徵曲線（**表 26**）。

【0767】 **表 25**：第一個藥物動力學研究-FVII 濃度

時間（小時）	**AVE-FVII-3-CTP（ng/ml）**	**SD**	**AVE-FVII-4-CTP（ng/ml）**	**SD**	**AVE-FVII-5-CTP（ng/ml）**	**SD**
0.083	**4214**	583	**3600**	427	**4888**	504
0.5	**3386**	892	**5213**	1682	**5384**	2549
2	**1138**	219	**3603**	1338	**3082**	289
5	**1390**	374	**2726**	1127	**2480**	561
8	**333**	167	**1349**	44	**2316**	633
24	**133**	12	**476**	98	**788**	34
48	**38**	3	**165**	24	**384**	61
72	**12**	2	**91**	62	**167**	31
96	**26**	1	**42**	8	**93**	49

【0768】 **表 26**：藥物動力學分析

	FVII 3-CTP	**FVII-4-CTP**	**FVII-5CTP**
半衰期（**0.083-8 hr**）（小時）	2.5	4.9	6.6
半衰期（**8-72hr**）（小時）	13.3	16.6	17.7
AUC (ng-hr/ml)**(8-72hr)**	18374.6	51224.4	72954.2
Vd **(ml/kg)(8-72hr)**	203.7	91.9	67.7
CL**(ml/hr/kg) (8-72hr)**	10.6	3.8	2.7

【0769】 與 3 個 CTP 相比，添加四個或五個 CTP 分別顯著延長 FVII 半衰期 2 倍及 3 倍（**表 26**）。此優越性在所述研究之初始部分（0.083-8 小時）中更顯著，表明潛在改進的蛋白質回收率及降低的額外血管清除率。在 FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 投予之後的 AUC 對比 FVII-CTP_3 分別增加 3 倍及 4 倍。在向 FVII 添加 4 及 5 個 CTP 的同時，亦降低清除率（**表 26**）。

【0770】 如在所述研究中觀察到的，與 3 個 CTP 相比，添加四個及五個 CTP 顯著延長 FVII 半衰期，在初始及終末半衰期兩個方面。第一及第二研究中之半衰期值不同，歸因於由劑量及研究持續時間實現之不同分析方法，儘管如此，整體趨勢得以維持。在 FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 投予之後的 AUC 對比 FVII-CTP_3 分別增加 2.5 倍及 7 倍。

【0771】 **5.9 結論：**

【0772】 在此研究中，評估 FVII-CTP_3、FVII-CTP_4 及 FVII-CTP_5 之 PK 參數及潛在凝血活性。4 及 5 個 CTP 與 FVII 之融合與 FVII-CTP_3 相比提供優異且改進的半衰期、暴露以及降低之清除率，同時維持類似的顯色及活體外凝血活性。此等結果在不同蛋白質濃度下觀察到且對於收集物及經純化蛋白兩者為一致的。當評估 CTP 在 C 端融合至 FVII 之整體作用時，1-5 個 CTP 之融合以 CTP 成比例方式顯著增加 FVII 之半衰期及 AUC，表明隨著分子之 CTP 部分增加，FVII 壽命及穩定性顯著改進，同時維持其初始活體外凝血活性，如下文中表 27 中所概述。

【0773】 **表 27**：

FVII 對比 FVII-CTP_2	268	200
FVII-CTP_2 對比 FVII-CTP_3	67	57.8
FVII-CTP_3 對比 FVII-CTP_4	24	178
FVII-CTP_4 對比 FVII-CTP_5	6	42

【0774】 如前報導，FVII 半衰期在人類及動物兩者中與 FVII 之活化形式（FVIIa）之半衰期相關。因此，預期在 CTP 融合之後的活化型式將獲得半衰期之類似改進。

實例 7：IFN-CTP 多肽之表現及分離

材料與方法

【0775】 **DNA 轉染及純系選擇：**DG44 細胞使用 FuGENE6 試劑（FuGENE 轉染試劑-羅氏目錄 11 815 091 001）用含有 IFNβ-CTP 變異體之 pCI-DHFR 表現載體轉染。在轉染之後 48 小時，將細胞稀釋且每孔至少 50-200 個細胞接種於選擇培養基（不含 HT 之 CD DG44 培養基（Gibco：蘇格蘭部件：#07990111A）Sku 號：ME060027）中，所述選擇培養基補充有 8 mM L-麩醯胺酸 Biological Industries：目錄：03-020-1A）及 18 mL/L 10% Pluronic F-68 溶液（Gibco：目錄：240040-032）。所選擇純系使用商業 ELISA 針對最高蛋白製造篩選。每個變異體冷凍 3-5 個製造純系以便備份細胞庫。為每個變異體選擇之純系經調適以在至多 1 L 燒瓶之較大規模培養物中在軌道式振盪器平台上生長。收集上清液，且藉由 ELISA、SDS-PAGE 以及西方墨點法分析。在抽出等分試樣之後，將含蛋白質的上清液保持冷凍直至進一步使用。

【0776】 **細胞培養：**將 DG44 細胞在 37℃下在加濕 8% CO_2 培育箱中維持在具有 HT 之 DG44 培養基（目錄號 12610-010，Gibco）中，所述培養基補充有 8 mM L-麩醯胺酸（Biological Industries：目錄：03-020-1A）及 18 mL/L 10% Pluronic F-68 溶液（Gibco：目錄：240040-032）。將經轉染純系維持在不具有 HT 補充劑、次黃嘌呤及胸苷、具有普洛尼克酸及 L-麩醯胺酸之 DG44 基礎培養基中。

【0777】 **樣品製備：**收集上清液，過濾，且藉由 ELISA 分析，以測定蛋白質濃度。SDS-PAGE 及西方墨點法用於測定純度及身分。在 ELISA 之後，定義樣品濃度，且溶液用 PBS 透析。在抽出等分試樣之後，將含蛋白質的上清液在-20℃下保持冷凍直至進一步使用。

【0778】 **西方墨點法：**樣品在非變性 15% SDS-聚丙烯醯胺凝膠上電泳。使凝膠在含 25 mM Tris 及 192 mM 甘胺酸之 20%（體積/體積）甲醇中平衡 10 分鐘）。使用微型 Trans-Blot 電泳單元（伯樂實驗室，加州里奇蒙），歷時 3 小時將蛋白質在 250 mA 下轉移至 0.2 μm 孔徑硝化纖維素膜（西格瑪，密蘇里州聖路易斯）。硝化纖維素膜在 5%脫脂奶粉中在室溫下培育 2 小時。膜與 IFN 抗血清（1:1000 效價）一起在至少 4℃下培育隔夜，之後在含有 0.1% Tween 之 PBS 中連續洗滌三次（10 分鐘/洗滌）。膜與結合至辣根過氧化酶（HRP）之二級抗體（Zymed，加州舊金山）一起在室溫下培育 2 小時，之後洗滌三次。最後，使硝化纖維素紙與增強型化學發光受質（ECL）（皮爾斯，伊利諾州羅克福德）反應 5 分鐘，用 Whatman 紙片乾燥，且暴露於 X 射線膜。

【0779】 **圖 3** 指示 MOD-901X-變異體由抗 IFN-β1a 抗體識別。SDS PAGE 凝膠使用庫馬斯藍染色（a），或（B）使用單株抗 IFN-β1a 抗體吸墨並染色。

材料與方法（實例 8-11）：

【0780】 ***質體構築***

【0781】 基於 OXM 胺基酸序列（寄存編號 NP_002045）及 CTP 胺基酸序列（寄存編號 NP_149032）在真核表現載體（pCI-dhfrr）中構築七種 OXM 質體。

【0782】 此等質體之示意性表示展示在**表 28** 中。質體構築之詳細描述如下。

【0783】 **表 28**：質體之示意性描述

	質體變異體描述	核酸序列
1	OXM-CTP-CTP	SEQ ID NO: 67
2	CTP-OXM-CTP	SEQ ID NO: 65
3	CTP-CTP-OXM	SEQ ID NO: 68
4	CTP-OXM-CTP-CTP	SEQ ID NO: 66
5	OXM-CTP-CTP-CTP	SEQ ID NO: 69
6	OXM-CTP-CTP-CTP-CTP	SEQ ID NO: 70
7	OXM-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	SEQ ID NO: 71

【0784】 OXM 變異體 CTP-OXM-CTP（0.5C CTP-OXM-CTP，GenArt，GA 編號 0804377）之核酸序列在針對 DG44 表現系統之密碼子使用最佳化之後合成。將含有 0.5C CTP-OXM-CTP 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 601-0-p142-1 純系。

【0785】 ***構築 CTP-OXM-CTP***

【0786】 使用以下引子以便合成 601-6-p149-1（CTP-OXM-CTP）。

【0787】 **引子 25** 5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'（SEQ ID NO: 95）。

【0788】 **引子 85R** 5' CTGGCTGTGCTGGGGCAGAATGGGTGT 3'（SEQ ID NO: 96）。

【0789】 **引子 86** 5' CCCCAGCACAGCCAGGG 3'（SEQ ID NO: 97）。

【0790】 **引子 74R** 5' GCGGCCGCATCCAGACCT 3'（SEQ ID NO: 98）。

【0791】 進行三個 PCR 反應。第一反應用引子 25 及引子 85R 以及作為模板之 402-3-p81-4 之質體 DNA（CTP-hGH-CTP-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 181 bp 產物。第二反應用引子 86 及引子 74R 以及作為模板之 601-0-p142-1 之質體 DNA（0.5C CTP-OXM-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 224 bp 產物。最後一個反應用引子 25 及 74R 以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於 PCR 擴增，形成約 391 bp 產物，且其接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。將含有 CTP-OXM-CTP 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 601-6-p149-1 純系。

【0792】 編碼 CTP-OXM-CTP 之核酸序列如下：

【0793】 tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgccagctcttcttctaaggctccacccccatctctgccagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagcacagccagggcaccttccaccagcgactacagcaagtacctggacagcagaagggcccaggacttcgtccagtggctgatgaacaccaagaggaacaggaacaacatcgcttcctctagctccaaggcccctccaccctctctgcctagccccctctcggctgcctggcccatccgacacaccaatcctgccacagtgatgaaggtctggatgcggccgc（SEQ ID NO: 65）。

【0794】 編碼 CTP-OXM-CTP 之胺基酸序列如下：

【0795】 MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRRNNIASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 58）。

【0796】 ***構築 CTP-OXM-CTP-CTP***

【0797】 使用以下引子以便合成 601-3-p158-2（CTP-OXM-CTP-

CTP）：

【0798】 引子 **25** 5' CTCTAGAGGACATGGCCAC 3'（含有 XbaI 之限制位點）（SEQ ID NO: 99）。

【0799】 引子 **87^{R}** 5' GCTGGAGCTAGCGATGTTGTTCCTGTTCC 3'（含有 OXM 之 3'端及 CTP 之 5'端）（SEQ ID NO: 100）。

【0800】 引子 **88** 5' ACATCGCTAGCTCCAGCAGCAAGGCC 3'（含有 OXM 之 3'端及 CTP 之 5'端）（SEQ ID NO: 101）。

【0801】 引子 **74^{R}** 5' GCGGCCGCATCCAGACCT 3'（含有 NotI 之限制位點）（SEQ ID NO: 102）。

【0802】 進行三個 PCR 反應。第一反應用引子 25 及引子 87R 以及作為模板之 601-6-p149-1 之質體 DNA（CTP-OXM-CTP-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 290 bp 產物。第二反應用引子 88 及引子 74R 以及作為模板之 402-3-p81-4 之質體 DNA（CTP-hGH-CTP-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 200 bp 產物。最後一個反應用引子 25 及 74R 以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於 PCR 擴增，形成約 450 bp 產物，且其接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。將含有 CTP-OXM-CTP-CTP 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 601-3-p158-2 純系。

【0803】 編碼 CTP-OXM-CTP-CTP 之核酸序列如下：

【0804】 tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcct gctgtgcctgccatggctgcaggagggcagcgccagctcttcttctaaggctccacccccatctctgcc cagccccagcagactgccgggccccagcgacacacccattctgccccagcacagccagggcaccttc accagcgactacagcaagtacctggacagcagaagggcccaggacttcgtccagtggctgatgaaca

ccaagaggaacaggaacaacatcgctagctccagcagcaaggcccctcccccgagcctgccctcccc aagcaggctgcctgggccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcctc catccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtc tggatgcggccgc（SEQ ID NO: 66）。

【0805】 編碼 CTP-OXM-CTP-CTP 之胺基酸序列如下：

【0806】 MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPS PSRLPGPSDTPILPQHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRN RNNIASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLP GPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 59）。

【0807】 ***構築 OXM-CTP-CTP***

【0808】 使用以下引子以便合成 601-2-p160-2（OXM-CTP-CTP）：

【0809】 引子 **75** 5' CTCCCAGTTCAATTACAGCT 3'（在 XbaI 限制位點之前含有 pCI-dhfr 之序列）（SEQ ID NO: 103）。

【0810】 引子 **89^{R}** 5' GCTGTGAGCGCTGCCCTCCTGCAG 3'（含有 OXM 之 5'端）（SEQ ID NO: 104）。

【0811】 引子 **90** 5' GCGCTCACAGCCAGGGCACCTTC 3'（含有 OXM 之 5'端）（SEQ ID NO: 105）。

【0812】 引子 **74^{R}** 5' GCGGCCGCATCCAGACCT 3'（含有 NotI 之限制位點）（SEQ ID NO: 106）。

【0813】 進行三個 PCR 反應。第一反應用引子 75 及引子 89R 以及作為模板之 601-0-p142-1 之質體 DNA（0.5C CTP-OXM-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 175 bp 產物。第二反應用引子 90 及引子 74R 以

及作為模板之 601-3-p158-2 之質體 DNA（CTP-OXM-CTP-CTP）進行；由於 PCR 擴增，形成約 200 bp 產物。最後一個反應用引子 25 及 74R 以及作為模板之先前兩個反應之產物的混合物進行；由於 PCR 擴增，形成約 391 bp 產物，且其接合至 TA 選殖載體（Invitrogen，目錄 K2000-01）。將含有 OXM-CTP-CTP 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 601-2-p160-2 純系。

【0814】 編碼 OXM-CTP-CTP 之核酸序列如下：

【0815】 tctagaggacatggccacagggagcaggaccagcctgctgctggctttcggcctgctgtgtctgccatggctgcaggagggcagcgctcacagccagggcaccttcaccagcgactacagcaagtacctggacagcagaagggcccaggacttcgtccagtggctgatgaacaccaagaggaacaggaacaacatcgctagctccagcagcaaggcccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctggcccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc（SEQ ID NO: 67）

【0816】 編碼 OXM-CTP-CTP 之胺基酸序列如下：

【0817】 LEDMATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSAHSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ（SEQ ID NO: 60）

【0818】 ***構築 CTP-CTP-OXM***

【0819】 OXM 變異體（CTPx2-OXM，GenArt，GA 編號 1067101）之核酸序列在針對 DG44 表現系統之密碼子使用最佳化之後合成。將片段插入至 Excellgene 真核表現載體中，得到 p162 純系。

【0820】 編碼 CTP×2-OXM 之核酸序列如下：

【0821】 ctatagggcgaattgaaggaaggccgtcaaggccgcatgagctctctagaggac atggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccatggctgcagga gggcagcgccagctccagcagcaaggcccctcccccgagcctgccctccccaagcaggctgcctgg gccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggcccctcctccatccctgccatcccc ctcccggctgcctggcccctctgacacccctatcctgcctcagcacagccagggcaccttcaccagcg actacagcaagtacctggacagcagaagggcccaggacttcgtccagtggctgatgaacaccaagag gaacaggaacaacatcgcttgatgaaggtctggatgcggccgcggtaccctgggcctcatgggccttc ctttcactgcccgctttccag（SEQ ID NO: 68）。

【0822】 編碼 CTP×2-OXM 之胺基酸序列如下：

【0823】 M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T K R N R N N I A R S G C G R G T L G L M G L P F T A R F P（SEQ ID NO: 61）。

【0824】 ***構築 OXM-CTP×3***：

【0825】 OXM 變異體（OXM-CTP×3，GenArt，GA 編號 1017864）之核酸序列在針對 DG44 表現系統之密碼子使用最佳化之後合成。將含有 OXM-CTP×3 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至吾人之真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 pCI-dhfr-OXM-ctp×3-p216-4 純系。

【0826】 編碼 OXM-CTP×3 之核酸序列如下：

【0827】 tctagactcgagcgatcgccatggccaccggctctaggacctccctgctgctggc cttcggcctgctgtgcctgccctggctgcaggaaggcagcgctcactcccagggcaccttcacctccg

actactccaagtacctggactctcggagagcccaggacttcgtgcagtggctgatgaacaccaagcgg aaccggaacaatatcgcctcctcaagctccaaggcacctccaccttccctgcctagcccttccagactcc ctgggcccagtgacacccctatcctgcctcagtccagctccagcaaggccccacccctagcctgcctt ctccttctcggctgcctggccccagcgatactccaattctgccccagtcctccagcagtaaggctccccc tccatctctgccatcccccagcagactgccaggcccttctgatacacccatcctcccacagtgatgagga tccgcggccgc（SEQ ID NO: 69）。

【0828】 編碼 OXM-CTP×3 之胺基酸序列如下：

【0829】 M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T K R N R N N I A S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q（SEQ ID NO: 62）。

【0830】 ***構築 OXM-CTP×4：***

【0831】 OXM 變異體（OXM-CTP×4，GenArt，GA 編號 1115769）之核酸序列在針對 DG44 表現系統之密碼子使用最佳化之後合成。將含有 OXM-CTP×4 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 pCI-dhfr-OXM-ctp×4-p254-3 純系。

【0832】 編碼 OXM-CTP×4 之核酸序列如下：

【0833】 tctagactcgagcgatcgccatggctaccggctccagaacctctctgctgctggc cttcggcctgctgtgtctgccttggctgcaagagggcagcgctcattcccagggcaccttcacctccga ctactccaagtacctggactctcgcagagcccaggacttcgtgcagtggctgatgaacaccaagcgga accggaacaatatcgcctcctccagctccaaggcccctcctccatctctgccatccccagtagactgc ctgggccctctgacacccctatcctgcctcagtccagctcctctaaggccccaccaccttccctgcctag

cccttcaagactgccaggccctagcgatacaccaattctgccccagtcctccagcagcaaggctccccc acctagcctgccttctccatcaaggctgcctggcccatccgataccccaattttgcctcagagcagctct agcaaggcacctccccccagtctgccctctccaagcagactccctggcccttcagacactcccattctg ccacagtgatgaggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 70）

【0834】 編碼 OXM-CTP×4 之胺基酸序列如下：

【0835】 M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T K R N R N N I A S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q（SEQ ID NO: 63）。

【0836】 ***構築 OXM-CTP×5 ：***

【0837】 OXM 變異體（OXM-CTP×5，GenArt，GA 編號 1115770）之核酸序列在針對 DG44 表現系統之密碼子使用最佳化之後合成。將含有 OXM-CTP×5 序列之 XbaI-NotI 片段分離。將片段插入至真核表現載體 pCI-dhfr 中，得到 pCI-dhfr-OXM-ctp×5-p255-1 純系。

【0838】 編碼 OXM-CTP×5 之核酸序列如下：

【0839】 ctctagactcgagcgatcgccatggctaccggctccagaacctctctgctgctgg ccttcggcctgctgtgtctgccttggctgcaagagggcagcgctcattcccagggcaccttcacctccg actactccaagtacctggactctcgcagagcacaggacttcgtgcagtggctgatgaacaccaagcgg aaccggaacaatatcgcctcctccagctccaaggcccctcctccatctctgccatccccagtagactg cctgggccctctgacaccctatcctgcctcagtccagctcctctaaggctccaccaccttccctgccta gcccttcaagactgccaggccctagcgatacaccaattctgccccagtcctccagcagcaaggctccc

ccacctagcctgccttctccatcaaggctgcctggcccatccgataccccaattttgcctcagagcagct ctagcaaggcacctccccccagtctgccctctccaagcagactccctggcccttcagacactccaatcc tcccacagtcctctagctctaaagctccacctcccagcctgcccagccctagtagactccccggaccttc tgataccccatcttgccccagtgatgaggatccgcggccgc（SEQ ID NO: 71）。

【0840】 編碼 OXM-CTP×5 之胺基酸序列如下：

【0841】 M A T G S R T S L L L A F G L L C L P W L Q E G S A H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T K R N R N N I A S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q S S S S K A P P P S L P S P S R L P G P S D T P I L P Q（SEQ ID NO: 64）。

【0842】 ***OXM-CTP 變異體之表現、純化及表徵***

【0843】 OXM-CTP 之所有七種變異體在 XLG 之 CHO 表現細胞株（Excellgene Company，瑞士（Switzerland））中暫時表現並產生。OXM-CTP 收集物之濃度水準使用 OXM ELISA 套組（Bachem 目錄號 S-1393.0001）測定。收集物使用 DEAE 管柱純化，接著用木菠蘿凝集素管柱作為第二純化步驟。最終溶離份用 10 mM 緩衝劑檸檬酸鹽、147 mM NaCl（pH 6）透析。經純化變異體之濃度使用 1.9=1 mg/ml 之消光係數由在 280 nm 下之吸光度測定。1.9 為理論上針對 OXM 肽計算之消光係數。由於 CTP 肽在 280 nm 下不吸收，故將相同消光係數應用於 OXM-CTP 變異體。OXM 原生肽以化學方式合成（Almac Company，愛爾蘭（Ireland）），且其肽含量藉由胺基酸分析測定。

【0844】 ***OXM-CTP 變異體之藥物動力學（PK）特徵曲線***

【0845】 OXM 肽及 OXM-CTP 變異體之藥物動力學特徵曲線如下評估。雄性史泊格-多利（SD）-1 大鼠用以下各者之單次劑量皮下（SC）或靜脈內（IV）投予：原生 OXM（n=6，230 μg/kg）；變異體 CTP-OXM-CTP、CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP 及 CTP-CTP-OXM（n=6，230 μg/kg）或變異體編號 OXM-CTP-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP（n=6，153 μg/kg）。每組 3 隻動物之群組在交替時間點下抽血。OXM 血清濃度使用商業 ELISA 套組（Bachem，目錄號 S-1393.0001）分析。研究設計概述在**表 29** 中。研究分成 3 個連續實驗，實驗 1 號（組 1-4）、實驗 2 號（組 5-9）及實驗 3 號（組 10-13）。

【0846】 **表 29**：PK 研究設計之概述.

在 C57BL/6 小鼠中之 IPGTT 研究

組編號	測試物品變異體編號	動物數/組/時間點	給藥途徑	性別	OXM 之劑量水準（μg/大鼠）	OXM 之劑量水準（μg/kg）	時間點（給藥後小時）
1	OXM	6/3	IV	雄性	34	230	0（給藥前）、5 min、15 min、25 min、35 min、45 min、60 min、75 min、1.5 h、2 h
2	CTP-OXM-CTP	6/3	IV	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、48 h
3	CTP-OXM-CTP-CTP	6/3	IV	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、48 h
4	CTP-CTP-OXM	6/3	IV	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、3 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、48 h

5	OXM	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、5 min、15 min、25 min、35 min、45 min、60 min、75 min、1.5 h、2 h
6	CTP-OXM-CTP	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d
7	CTP-OXM-CTP-CTP	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d
8	CTP-CTP-OXM	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d
9	OXM-CTP-CTP	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d
10	OXM	6/3	SC	雄性	34	230	0（給藥前）、5 min、15 min、25 min、35 min、45 min、60min、75 min、1.5 h、2 h
11	OXM-CTPX3	6/3	SC	雄性	23	153	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d、4 d
12	OXM-CTPX4	6/3	SC	雄性	23	153	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d、4 d
13	OXM-CTPX5	6/3	SC	雄性	23	153	0（給藥前）、10 min、30 min、1 h、2 h、4 h、6 h、8 h、24 h、36 h、2 d、3 d、4 d

【0847】 量測隔夜禁食之小鼠的葡萄糖（給藥前葡萄糖）。緊鄰之後，其用測試物品中之一種 IP 注射。注射後十五分鐘或 120 分鐘，量測

葡萄糖含量（葡萄糖之時間零點），接著經由 IP 注射（1.5 g/kg）投予葡萄糖。在 10、20、30、60、90、120 及 180 分鐘下進行其他葡萄糖量測。血糖含量使用手持型血糖儀藉由尾靜脈取樣來量測。

【0848】 ***在 C57BL/6 小鼠中之食物攝入研究***

【0849】 注射前至少一週，將小鼠稱重且轉移至微型籠中以便適應（每籠一隻小鼠）。在適應期期間，其每天經處理且接受兩次媒劑注射以使在研究期期間的壓力減到最少。實驗前一天，使小鼠禁食。禁食後十七小時，在早期輕階段（900-1000 h）下，再稱重小鼠（在 IP 注射之前），接著單次 IP 注射 1700 nmol/kg（10 μl/1 g 小鼠）OXM 肽或 OXM-CTP 變異體 OXM-CTPX3、OXM-CTPX4 及 OXM-CTPX5。在注射之後，使小鼠返回至其養籠（每籠 1 隻小鼠），且提供量經預先稱重之食物。藉由稱重食物，在注射後 0、1、2、4、6、8、21、32 及 44、55、68、80、93 及 141 小時量測食物攝入。在實驗結束時，再次稱重大鼠。

結果

實例 8：構築 CTP 修飾的 OXM

【0850】 藉由基因工程化，CTP 肽 cDNA 融合至人類 OXM cDNA，產生七種不同 OXM-CTP 變異體，如**表 28** 中所詳述。驗證質體之核苷酸序列，且將質體暫時轉染至 XLG 之 CHO 表現細胞株（Excellgene Company，瑞士）中。OXM-CTP 變異體分泌至生長培養基中，對收集物進行收集，且測定 OXM-CTP 含量。

實例 9：OXM-CTP 變異體之表現、純化及表徵

【0851】 量測生產培養基（收集物）中 OXM-CTP 變異體之分泌

量。分泌量概述在**表 31** 中。考慮到重組肽之標準暫時轉染表現量，所獲得之分泌量較高。

【0852】 **表 31**：OXM-CTP 分泌量之概述

變異體	CTP-OXM-CTP	CTP-OXM-CTP-CTP	OXM-CTP-CTP	CTP- CTP-OXM	OXM-CTPX4	OXM-CTPX4	OXM-CTPX5
收集物濃度（μg/ml）	31.1	15.3	3.3	51.9	13.9	15.3	14.4

【0853】 集物根據*材料與方法*中所述之方法純化。變異體 OXM-CTPX3、OXM-CTPX4 及 OXM-CTPX5 之最終樣品藉由 SDS-PAGE（庫馬斯染色（**圖 11A**）及抗 OXM 西方墨點分析（**圖 11B**））分析。對於變異體 CTP-OXM-CTP、CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP 及 CTP-CTP-OXM，來自純化製程之樣品藉由庫馬斯染色及西方墨點分析兩者（**圖 12**）分析。正如所料，OXM-CTP 變異體展示出大小差異，與融合至肽之 CTP 卡匣數目相關。相對高分子量指示，在 CTP 肽之潛在絲胺酸位點上可能存在較高 O-聚糖鏈佔有率。OXM 肽不與抗 OXM 抗體反應，可能歸因於在轉移大小較小之肽方面的技術困難。庫馬斯染色展示出，OXM-CTP 變異體經高度純化，且主要含有較高形式。

實例 10：OXM-CTP 變異體之藥物動力學（PK）特徵曲線

【0854】 在雄性 SD-1 大鼠中分析 OXM 肽與 OXM-CTP 變異體相比之藥物動力學特徵曲線。動物用以下各者之單次 IV（實驗 1，**圖 13A**）或單次 SC（實驗 2 及 3，**圖 13B-13C**）注射投予：原生 OXM 或 OXM-CTP 變異體 CTP-OXM-CTP、CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP、CTP-CTP-OXM（230 μg/kg 肽）或變異體 OXM-CTPX3、OXM-CTPX4 及 OXM-CTPX5（153 μg/kg 肽）。OXM 或 OXM-CTP 變異體在指示時

間點下之血清濃度使用商業 ELISA 分析。PK 特徵曲線展示在**圖 13** 中，且習知非房室 PK 參數概述在表 32 中。向 OXM 添加 CTP 肽引起原生 OXM 之半衰期自 0.22 小時延長至各種 OXM-CTP 變異體之 2.7-10 小時（表 32 SC 投予；實驗 2 及 3）。

【0855】 將兩個 CTP 拷貝以三種不同方式添加至 OXM 肽中，製造變異體 CTP-OXM-CTP、OXM-CTP-CTP 及 CTP-CTP-OXM。當 CTP 串聯添加至 OXM 之 C 端時，得到血清半衰期之最顯著延長；變異體 OXM-CTP-CTP 之 T½為 4.76 小時。三個 CTP 與 OXM C 端之融合與兩個 CTP 之融合相比不引起半衰期延長。出人意料地，向 OXM c 端添加四個及五個 CTP 拷貝使 T½延長高達 10 小時（**表 32**）。

【0856】 如由 AUC 參數反映之暴露對於變異體 OXM-CTP-CTP 大部分增加約 17 倍（實驗 2），而對於變異體 OXM-CTPX4 及 OXM-CTPX5 增加約 30 倍（實驗 3）此等結果指示，在向 OXM 肽添加四或五個 CTP 拷貝之後，有優異的延長作用。

【0857】 如由實驗 1 及 2 計算之生物可用性對於 CTP-OXM-CTP-CTP 增加，但對於 CTP-OXM-CTP 及 CTP-CTP-OXM 未發現顯著改進（**表 32**）。

【0858】 **表 32**：如在三個不同實驗中所測定之 OXM 肽及 OXM-CTP 變異體之習知非房室 PK 參數。

		T1/2 **hr**	**T1/2β** **hr**	**Cmax** **ng/ml**	**Tmax** **hr**	**AUC (0-t)** **ng-hr/ml**	**AUC∞** **ng-hr/ml**	**CL** **ml/hr/kg**	**Vd** **ml/kg**	**MRT** **hr**	***生物可用性*** ***%***
實例 1	**OXM**	0.29	NA	NA	NA	211.7	213.9	993.0	417.0	0.34	
	CTP-OXM-CTP	0.25	1.57	NA	NA	592.7	598.0	355.3	806.9	0.81	
	CTP-OXM-CTP-CTP	0.28	1.61	NA	NA	968.2	977.4	217.4	506.4	0.80	

IV.	CTP-CTP-OXM	0.27	1.20	NA	NA	488.6	490.4	433.3	748.1	0.86	
實例2 SC.	**OXM**	0.22		118.40	0.08	42.52	42.84	4960.39	1564.40	0.37	20.09
	CTP-OXM-CTP	3.28		31.11	1.00	144.87	170.82	1243.97	5887.75	4.73	24.44
	CTP-OXM-CTP-CTP	4.39		30.18	6.00	313.98	320.86	662.28	4139.25	6.62	32.43
	OXM-CTP-CTP	4.76		50.90	6.00	697.00	702.10	302.70	2078.90	8.20	NA
	CTP-CTP-OXM	2.74		27.77	1.00	114.15	129.85	1636.55	6459.76	4.10	23.36
實例3 SC.	**OXM**	0.18		36.4	0.08	13.1	13.3	16999	4375		
	OXM-CTPX3	3.78		25.1	2.0	308.9	312	512.8	2797		
	OXM-CTPX4	10.15		21.1	2.0	400.4	431.9	355.4	5379.6		
	OXM-CTPX**5**	9.63		21.2	8	431	442	346.2	4812		

【0859】 展示出 T1/2 及 AUC∞增加倍數之各組之間的比較證實，OXM-CTP×4 及 OX-CTP×5 與其他變異體相比在此等參數方面為優異的（**表 33**）。

【0860】 **表 33**：如自實驗 1-3 所計算之與 OXM 肽相比 OXM-CTP 變異體之 PK 參數的增加倍數.

	變異體	T1/2 樣品/OXM 肽	AUC∞ 樣品/OXM 肽
實例 1 IV.	CTP-OXM-CTP	NA	2.8
	CTP-OXM-CTP-CTP	NA	5.6
	CTP-CTP-OXM	NA	2.29
實例 2 SC.	CTP-OXM-CTP	14.9	3.98
	CTP-OXM-CTP-CTP	19.9	7.48
	OXM-CTP-CTP	21.6	16.3
	CTP-CTP-OXM	12.4	3.03
實例 3 SC.	OXM-CTP-CTP-CTP	21	23.45
	OXM-CTP-CTP-CTP-CTP	56.4	32.478
	OXM-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	53.5	33.23

實例11：CTP修飾的OXM誘導葡萄糖耐受性

【0861】 IPGTT研究在C57BL/6小鼠中進行，展現出OXM經由刺激胰島素分泌來增強葡萄糖清除率。IP葡萄糖耐受性測試（IPGTT）評估OXM之葡萄糖降低作用。為了評估OXM或OXM-CTP變異體之活體內活性，應用IPGTT模型。向隔夜禁食的C57BL/6小鼠IP注射OXM肽或OXM-CTP變異體，接著IP注射葡萄糖（1.5 g/kg），並且利用血糖儀自尾靜脈量測血糖含量（**圖14**）。在兩個連續實驗中評估OXM-CTP變異體；實驗

1用於變異體CTP-OXM-CTP、CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP、CTP-CTP-OXM（**圖14A及14C**），而實驗2用於變異體OXM-CTP-CTP-CTP、OXM-CTPX4及OXM-CTPX5（**圖14B及14D**）。IP投予OXM（100 nmol/kg）或OXM-CTP變異體（100 nmol/kg）15分鐘或2小時（OXM肽及變異體OXM-CTPX4），隨後IP注射葡萄糖，且對葡萄糖耐受性之誘導與媒劑（緩衝液）組相比。量測到OXM-CTP變異體CTP-OXM-CTP-CTP、OXM-CTP-CTP、OXM-CTPX3、OXM-CTPX4及OXM-CTPX5之顯著作用，如由與媒劑組相比與對所計算AUC具有較低影響之100 nmol/kg OXM肽相比血糖AUC降低20%-30%所反映（**圖14**，降低1%，實驗1及6.7%，實驗2）。出人意料地，CTP-OXM-CTP引起葡萄糖含量增加，而CTP-CTP-OXM對葡萄糖耐受性具有較小影響。OXM-CTPX4即使在葡萄糖之前120分鐘投予時亦誘導葡萄糖耐受性活性，而OXM肽活性不再顯而易見。此結果與此變異體之改進的藥物動力學特徵曲線比對。

實例12：製造相關CTP修飾的多肽構築體

相關CTP修飾的多肽之表現

【0862】 *細胞轉染（核轉染）：*穩定表現藉由將相關CTP修飾的多肽之基因整合至標靶細胞之染色體中來達成：最初將基因引入至細胞中，隨後引入至細胞核中，且其最後整合至染色體DNA中。在基因轉移之後，在含有選擇標記物（諸如二氫葉酸還原酶（DHFR））之培養基中培育細胞。

【0863】 *純系選擇* - 藉由接種在96孔培養盤中來限制稀釋單細胞。將選擇應用於單細胞培養物，且可重複若干次以獲得100%純系純度。基

於生長曲線、純系表徵、比生產率及蛋白質特徵曲線之最高製造純系在1 L搖瓶中繁殖，隨後接種在生物反應器中。簡言之：

【0864】 產生相關蛋白之多肽的細胞株藉由重組DNA技術製造。貫穿主細胞庫及工作細胞庫（MCB；WCB）之衍生始終，使用無動物組分培養基。哺乳動物細胞之轉染使用轉染試劑（例如FuGENE-6（Roche Applied Science））進行，所述哺乳動物細胞可包含可選擇元素，例如dhfr陰性CD DG44細胞（CHO細胞），其適於無蛋白培養基及懸浮生長。穩定純系藉由在細胞培養物中之限制稀釋步驟來分離。最高製造純系用濃度增加之可選擇藥劑（例如甲胺喋呤（MTX））擴增。基於純系群體倍增水準（PDL）、相關CTP修飾的多肽之生產率（皮克/細胞/天，PCD）及在所選擇培養基中獲得細胞密度之最大值，分離最高製造純系，且將其用於製備研發庫，接著製造合格的主細胞庫（MCB）及工作細胞庫（WCB）。

上游製程

【0865】 相關CTP修飾的多肽之上游製程由2種類型之培養基調配物組成；即，生長培養基（培養基1）及生產培養基（培養基2）。培養基1包含用於選擇之藥劑，例如甲胺喋呤（MTX），且培養基2除用於選擇之藥劑（例如MTX）外與培養基1一致。培養基1用於在接種於200公升（L）生物反應器中之前的細胞培養物繁殖（**圖15之步驟1-4**），且培養基2用於N-2步驟（最終產物之前的兩次繁殖，「N」係指最終產物）、200 L生物反應器（**圖15之步驟5**）及供規模放大用之1000 L生產用生物反應器（**圖15之步驟6**）。

製造製程：相關多肽

【0866】 所選擇純系以1000 L規模製造於無血清培養基中。所給出哺乳動物細胞株（例如CHO細胞株）之培養物在數個步驟中自工作細胞庫（WCB）之單個小瓶擴增至最終生產培養物體積。測試生產細胞培養上清液之生物負荷、細菌內毒素、生產率及外源病毒。所述製程使用50 L及200 L生物反應器（用於接種的生物反應器）及1000公升生物反應器（用於規模放大）進行。所有產物接觸表面均為拋棄式的，而非拋棄式的產物接觸設備為產物專用的。此等件之設備在批次之間經清潔及消毒。培養物擴增至50 L及200 L生物反應器，隨後接種在1000 L生物反應器中。最終規模放大及分批進料生物反應器生產在1000 L拋棄式生物反應器中進行。細胞之移除使用拋棄式過濾器系統（Millipore深度過濾器）實現。

【0867】 一個或兩個WCB小瓶在37℃下解凍。將細胞離心，且用10 mL新鮮培養基低量搖瓶將細胞集結粒再懸浮至目標濃度，且在37±0.5℃、5±1% CO_2下培育。在第2次轉種之後，進一步擴增具有較高存活率之細胞培養物；丟棄其他細胞培養物。在搖瓶中伴隨體積增加之四個轉種步驟用預定義步驟參數（諸如接種濃度及工作體積）進行。之後為兩個接種生物反應器步驟之體積用於典型1000 L生物反應器運作。

【0868】 50 L及200 L種子生物反應器用作接種生物反應器。在接種之前，200 L生物反應器用約50 L適當細胞培養基（例如PowerCHO 2CD培養基2（不含MTX））填充。製程控制設定為如下參數：pH 7，溫度37℃，DO50%。此等參數應用於預調節培養基以及種株培育製程。

【0869】 當製程參數控制在其預定義範圍內時，開始接種物轉移。在細胞團塊在50 L及200 L種子生物反應器中擴增期間，不向製程應用進料添加。在種子生物反應器中預期的培育時間為3至4天，隨後細胞轉移至

1000 L生產用生物反應器中。每天獲取用於過程中控制（IPC）之樣品。

在1000公升生產用生物反應器中之細胞繁殖（步驟7，圖15）

【0870】 培養物在生物反應器中在37℃、20%溶解氧（DO）及pH 7.2下培育約11天（視細胞之存活率而定）。在第3天，pH偏移至6.9，直至收集。在第4天，添加進料（無脂質之Power Feed A）。進料體積與33%最終生物反應器體積相等。在第6天，將DMSO添加至生物反應器中。將葡萄糖進料溶液添加至培養物中，以便維持所期望的濃度，且添加1 M碳酸氫鈉藥團以便維持所期望的培養物濃度（HCO_3）。收集物使用預定義準則進行。在前四天期間，每天對細胞培養物進行取樣以用於細胞計數、存活率及代謝分析。自第5天起，每天兩次對培養物進行取樣以用於細胞計數、存活率及代謝分析，且自第9天起，亦用於利用逆相HPLC之比生產率。相關CTP修飾的多肽之生產率為至少500公克/公升，且高度糖基化形式由收集物中至少70%全部相關CTP蛋白之多肽組成。

【0871】 本文中呈現之實例使用補料分批模式製造相關CTP修飾的多肽，但本領域中熟習此項技術者可使用大體上類似的純化流程發展灌注模式。可替代地，本領域中熟習此項技術者可發展其中培育持續時間可甚至高達7-120天之灌注方法。

細胞收集及儲存（圖15之步驟7）

【0872】 收集物使用拋棄式過濾方法系列進行。為了澄清收集物，進行深度過濾及0.2 μm過濾。澄清之後為0.45/0.2 μm過濾。沖洗深度過濾器，且用空氣將殘餘液體吹出系統。過濾製程以≤15 L/min之泵送速度及最大定義之壓力運作。隨後，過濾器用Tris-HCl緩衝液洗滌，且用加壓空氣吹出以增加產物回收率。

【0873】 測試澄清的收集物之生物負荷、細菌內毒素、利用RP-HPLC、SDS-PAGE、西方墨點法、HPC Elisa分析之特定蛋白含量、殘餘DNA、活體外病毒分析、病毒樣粒子、S+L-及支原體。

純化製程

【0874】 純化流程描述於**圖16**中。

超濾及透濾1-UFDF1（步驟8）

【0875】 澄清的收集物使用中空纖維濾筒或等效的基於TFF之UFDF步驟濃縮及透濾。濾筒標稱分子量截斷大小為10,000 kDa。利用RP-HPLC及HCP Elisa測試經濃縮及透濾之收集物之特定蛋白含量。

藉由培育進行之病毒不活化（步驟9）

【0876】 材料依序經由Millipore 1.55 m2過濾器及無菌Sartopore 2 XLG 10"過濾器過濾至無菌混合袋中（深度過濾步驟）。接著，添加溶液以使病毒內含物不活化，例如添加Tris/10% Triton溶液至最終濾液體積，使Triton濃度達至1%（w/w）。在培育之後，在加載在陰離子交換管柱上之前，產物溶液用0.2 μm過濾器單元過濾。

陰離子交換-瓊脂糖快速流動層析（步驟10）

【0877】 用樹脂填充之陰離子交換管柱用於此步驟。管柱以預定義床高度填充。由於在分析中由Triton引起之干擾，故在添加Triton之前測定負荷中之特定蛋白。使陰離子交換管柱平衡，且以病毒不活化的庫加載，且接著洗滌。進行第二洗滌，且將材料溶離且接著儲存在環境溫度（18-26℃）下以便次日處理或在2-8℃下儲存較長時間。所有層析步驟均以下流模式進行。可替代地，步驟可以上流模式運作。測試溶離液之利用RP-HPLC（目標：主峰以單峰形式溶離）、HCP Elisa、SDS-PAGE、西

方墨點法之特定蛋白及殘餘DNA。

疏水性相互作用層析（HIC）管柱層析（步驟11）

【0878】 HIC樹脂用於此步驟。管柱為呈預定義床高度之填充管柱。HIC層析在1-5個循環中進行，視產物量而定。可替代地，可運作至多10個循環。HIC負荷藉由用硫酸銨調節陰離子交換管柱溶離液來製備。使管柱平衡，且以經調節及0.2 μm過濾之陰離子交換溶離液加載，且接著洗滌，且將材料溶離，且接著儲存在2-8℃下直至進一步處理。

HIC溶離液超濾及透濾2（步驟12）

【0879】 將HIC溶離液濃縮及透濾，減少體積，且製備用於CHT管柱步驟之材料。將HIC溶離液濃縮且接著透濾。一旦pH及電導率經測定在範圍中，即將系統瀝乾且0.45/0.2 μm過濾至無菌袋中。將經濃縮、透濾之HIC溶離液之最終體積在環境室溫（18-26℃）下儲存隔夜。利用A_{280}測試保留物之生物負荷、細菌內毒素及特定蛋白。

多模式或混合模式蛋白質層析（步驟13）

【0880】 用樹脂填充之多模式或混合模式蛋白質層析管柱用於此步驟。管柱為呈預定義床高度之填充管柱。使管柱平衡，且以經濃縮及透濾之HIC溶離液加載，且用4個管柱體積（CV）緩衝液洗滌。收集流過物及洗滌材料，且將其在環境溫度（18-26℃）下保持隔夜直至進一步處理。

陽離子交換-瓊脂糖層析（步驟14）

【0881】 用陽離子交換瓊脂糖樹脂填充之管柱用於此步驟。管柱為呈預定義床高度之填充管柱。所述負荷藉由調節多模式或混合模式蛋白質層析流過物部分來製備。在pH調節之後，將溶液加載至管柱上，之後進行洗滌步驟。收集流過物用於進一步處理。調節pH，且材料經由0.45/0.2

μm過濾器過濾。將材料在環境溫度（18-26℃）下儲存隔夜或在2-8℃下儲存至多24小時。所有層析步驟均以下流模式進行。

藉由奈米過濾進行之病毒不活化（步驟15）

【0882】 病毒過濾使用Asahi Planova 20N病毒過濾器進行。將具有0.45/0.2 μm或0.1 μm膜之Sartopore 2過濾器用作奈米過濾器之預濾器。將病毒過濾器預先平衡且用以WFI製得之最終調配物預致敏。經調節的SP流過物在連續壓力下通過過濾器系列且收集在無菌生物處理袋中。過濾器系列用調配物緩衝液沖洗以使產物回收率達至最大。過濾器在使用前後按照製造商推薦之程序進行完整性測試使用後測試包含金粒子測試，亦按照製造商之程序。

原料藥之UFDF3及過濾及儲存（步驟16）

【0883】 將病毒濾液濃縮至製備物中目標最終DS濃度（其可在5-100 mg/ml之範圍內變化）以便整批過濾及填充。單次使用或可重複使用的卡匣用於此步驟，且截斷為3-30 KDa。將產物在第一步中濃縮至5-25 mg/ml，且用10 mM檸檬酸鹽、147 mM NaCl（pH 6.4）透濾（≥7 DF體積）。調節最終產物濃度，且用Millipak 100過濾器過濾。將經過濾之產物溶液等分，且冷凍在-70±5℃之溫度下。

藥品製造

【0884】 調配藥品（DP）製程開始於解凍原料藥（DS）。藥品藉由以下方式獲得：使用調配物緩衝液將原料藥（DS）稀釋至所需濃度，無菌過濾且填充在標準2R小瓶或其他初步包裝（諸如濾筒或預填注射器）中。熟練的業內人士將瞭解，術語「原料藥」（DS）可涵蓋或相當於活性醫藥成分（API）。在一個實施例中，如本文所闡述之相關CTP修飾的

多肽為包括大量經純化藥物之原料藥（DS）。熟練的業內人士亦將瞭解，術語「藥品」（DP）可涵蓋在無菌條件下分配至最終容器（例如小瓶）中後的經最終調配的藥物。在一個實施例中，如本文所闡述之相關CTP修飾的多肽為包括經最終調配和相關CTP修飾的多肽之藥品（DP）。

相關CTP修飾的多肽之表徵

【0885】 收集物中之CTP修飾的多肽含量及經高度糖基化形式之百分比藉由特定RP-HPLC方法測定。收集物中之總蛋白藉由布萊德福分析測定。由所選擇純系生產之收集物中的特定蛋白百分比相對於收集物中之總蛋白高於70%。另外，發展製造上游製程，以實現與經低糖基化形式相比高比例的經高度糖基化的CTP修飾的蛋白質。經高度糖基化的形式為目標形式，因為其引起CTP修飾的多肽半衰期之較長延長。

O-聚糖含量

【0886】 糖剖析藉由以下方式執行：釋放聚糖，之後用2-胺基苯甲醯胺（2AB）進行聚糖標記，清洗且藉由NP-HPLC分析。簡言之進行O-聚糖含量分析以計算每莫耳相關CTP修飾的多肽O-聚糖莫耳數。O-聚糖之末端半乳糖單元藉由β-半乳糖苷酶以酶促方式自蛋白質裂解。此等游離半乳糖單元在CarboPac PA20管柱上分離且用脈衝式電流測定法偵測。半乳糖（Gal）使用外部校準用半乳糖參考標準定量。半乳糖含量可為與O-聚糖結構Gal-GalNAc之含量直接相關。原料藥及藥品批次之分析展現穩健的批次與批次一致性。此出人意料的穩健的糖基化含量為顯著的，展示出相比於本領域中已知的，每個CTP之O-聚糖數目得以改進。

完整分子量分析樣品

【0887】 進行不同DS批次之分子量分析，其目的在於獲得關於O鍵聯的糖基化位點數目之資訊。完整樣品以及使用神經醯胺酶脫唾液酸化之樣品及使用O-糖苷酶脫O-糖基化之樣品藉由線上LC/ES-MS分析。結果展示出，絲胺酸佔有率%與本領域中已知的水準相比出人意料地高（與本文中製造的相關CTP修飾的多肽中之高達6個相比，僅4個絲胺酸經糖基化）。

CTP修飾的蛋白質樣品之O鍵聯糖基化位點佔有率

【0888】 4個不同DS批次之O-糖基化位點佔有率在M掃描下進行，其旨在獲得關於每個分子O鍵聯的糖基化位點數目之資訊。樣品使用神經醯胺酶脫唾液酸化，之後對經還原/羧甲基化樣品進行胰蛋白酶消化。最終，對經處理樣品進行線上LC/ES-MS，且使用指定軟體進行對MS資料之解釋。對獲自胰蛋白酶消化混合物之分析之資料的評估產生允許映射100%蛋白質序列之信號。O-糖基化可在N端及C端CTP區兩者上進行。佔有之位點鑑別為在脯胺酸之後的絲胺酸殘基以及在絲胺酸重複序列區中的四個絲胺酸中之兩個。總共至多18個絲胺酸殘基可用作O-聚糖之連接位點。偵測到批次之間無顯著差異。

純度

【0889】 RP-HPLC根據分子的極性分離分子。自較大極性至較小極性溶劑之移動相梯度用於使極性較強的分子先於極性較小的分子溶離。相關形式使用在220 nm下之UV偵測與原生蛋白分離。相關形式及主峰之相對峰面積（面積%）可藉由對相應峰面積進行積分來計算。原料藥及藥品之主峰由超過97%峰面積組成，指示高度純化產物及有效純化製程。

【0890】 尺寸排阻HPLC為根據大小分離分子之層析技術。在所選擇

之分級分離範圍中，較大分子先於較小分子溶離。分離機制為非吸附的，且分子在等度條件下溶離。SEC允許目標分子之單體與較高分子量形式（諸如二聚物及聚合物）分離。發展SEC方法以分析原料藥及藥品中二聚物及聚合物之含量。

RP-HPLC含量方法

【0891】 此方法正用於中間體樣品之含量測定以及中間體樣品中未糖基化CTP修飾的多肽%之測定，其利用逆相層析法進行。逆相HPLC因分子的極性而分離分子。相對非極性分子接合至管柱材料，而帶電荷的及極性分子在不實現與管柱之相互作用的情況下溶離。

【0892】 接合之分子藉助於自極性至較小極性溶液之梯度溶離。最強極性之分子首先溶離，之後為極性小於分子。偵測經由在214 nm下吸收進行。

病毒清除率

【0893】 製造製程解決及減低具有內源及外源病毒之最終藥品之污染的能力已為初步評估之主題。GLP相容研究已根據可適用指導進行，用於研究性產物，使用三種外加至製造製程之按比例縮小段中之模型病毒，以定量此等步驟不活化或清除外加病毒群體之能力。在表示為log10調節滴定度之病毒量的情況下，log10清除率因數僅僅藉由將輸出值減去輸入值來測定。作為log10數值，加上清除率因數以推導所有評估步驟之整體清除率因數。A-MuLV視為表示可能存在的CHO逆轉錄病毒之模型病毒，不活化及移除污染性A-MuLV病毒所需之量測獲得至少antilog10之清除率因數，例如病毒對數下降因數（LRF）為約22，展示出整個製程具有優越的移除病毒的能力。對於作為耐藥性非包膜小病毒之PPV，藉由奈米過濾

步驟獲得穩健移除。

【0894】 儘管已在本文中說明及描述本文揭示之某些特徵，但本領域中普通技術人員現將想到多種修改、替代、變化及等效物。因此，應理解，所附申請專利範圍意欲涵蓋如屬於本文揭示之真實精神內的所有此類修改及變化。

【序列表】

<110> 以色列商歐科生物製品有限公司(OPKO BIOLOGICS LTD.)

<120> 長效CTP修飾的多肽

<140> TW 110139563
<141> 2015-12-10

<150> US 62/090,104
<151> 2014-12-10

<150> US 62/090,116
<151> 2014-12-10

<150> US 62/090,124
<151> 2014-12-10

<160> 115

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 1

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met

65 70 75 80

Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
100 105 110

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
130 135 140

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
145 150 155 160

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
165 170 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
180 185 190

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
195 200 205

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 2
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 2

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65 70 75 80

Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
85 90 95

Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
100 105 110

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
115 120 125

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
130 135 140

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
145 150 155 160

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
165 170 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
180 185 190

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
195 200 205

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser
210 215 220

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
225 230 235 240

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
245

<210> 3
<211> 277
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 3

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

```
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
        115                 120                 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
    130                 135                 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
                165                 170                 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
            180                 185                 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
        195                 200                 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
    210                 215                 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
                245                 250                 255

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
            260                 265                 270

Pro Ile Leu Pro Gln
        275
```

<210> 4
<211> 387
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 4

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly
115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp

180 185 190

Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
195 200 205

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro
210 215 220

Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala
225 230 235 240

Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu
245 250 255

Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp
260 265 270

Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu
275 280 285

Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn
290 295 300

Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val
305 310 315 320

Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln
325 330 335

Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg
340 345 350

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn
355 360 365

Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr
370 375 380

Gly Asp Arg
385

<210> 5
<211> 221
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 5

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
210 215 220

<210> 6
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 6

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65 70 75 80

```
Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
                85                  90                  95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
            100                 105                 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
        115                 120                 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
    130                 135                 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145                 150                 155                 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
                165                 170                 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
            180                 185                 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
        195                 200                 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
    210                 215                 220

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225                 230                 235                 240

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
                245
```

<210> 7
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 7

```
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1               5                  10                  15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
            20                  25                  30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
        35                  40                  45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
    50                  55                  60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met
65                  70                  75                  80

Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu
                85                  90                  95

Ser Glu Ala Val Leu Arg Ser Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln
            100                 105                 110

Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu
        115                 120                 125

Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala
    130                 135                 140

Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr
145                 150                 155                 160

Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg
                165                 170                 175

Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
```

180 185 190

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
195 200 205

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215 220

<210> 8
<211> 193
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 8

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu
20 25 30

Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu
35 40 45

Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu
50 55 60

Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg
65 70 75 80

Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu
85 90 95

Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser
100 105 110

Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly

115 120 125

Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu
130 135 140

Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile
145 150 155 160

Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu
165 170 175

Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp
180 185 190

Arg

<210> 9
<211> 271
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 9

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
20 25 30

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
35 40 45

Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
50 55 60

Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys

65 70 75 80

Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
85 90 95

Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
100 105 110

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
115 120 125

Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
130 135 140

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
145 150 155 160

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
165 170 175

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
180 185 190

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
195 200 205

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
210 215 220

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
225 230 235 240

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
245 250 255

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
260 265 270

<210> 10
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 10

```
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1               5                  10                  15

Thr Thr Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
            20                  25                  30

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
        35                  40                  45

Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
    50                  55                  60

Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
65                  70                  75                  80

Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
                85                  90                  95

Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
            100                 105                 110

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
        115                 120                 125

Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
    130                 135                 140

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
145                 150                 155                 160
```

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
165 170 175

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
180 185 190

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
195 200 205

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
210 215 220

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
225 230 235 240

Leu Pro Gln

<210> 11
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 11

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
20 25 30

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
35 40 45

Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
50 55 60

Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
65 70 75 80

Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
85 90 95

Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
100 105 110

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
115 120 125

Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
130 135 140

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
145 150 155 160

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
165 170 175

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
180 185 190

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
195 200 205

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
210 215

<210> 12
<211> 243
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 12

```
Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1               5                  10                  15

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

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
        35                  40                  45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
    50                  55                  60

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

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
                85                  90                  95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val
            100                 105                 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
        115                 120                 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
    130                 135                 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145                 150                 155                 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
                165                 170                 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys
            180                 185                 190

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
```

195 200 205

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
210 215 220

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
225 230 235 240

Leu Pro Gln

<210> 13
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 13

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

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

Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg
35 40 45

Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu
50 55 60

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

Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser
85 90 95

Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val

100 105 110

Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu
115 120 125

Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys
130 135 140

Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser
145 150 155 160

His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr
165 170 175

Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys
180 185 190

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
195 200 205

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
210 215

<210> 14
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP肽

<400> 14

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
20 25 30

<210> 15

<211> 28
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP肽

<400> 15

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
20 25

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP肽

<400> 16

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
1 5 10

<210> 17
<211> 786
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 17
tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60

tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctccccc 120

gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180

cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc 720

ccgactcccg gggccctcgg acaccccgat cctcccacaa taaaggtctt ctggatccgc 780

ggccgc 786

<210> 18
<211> 873
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的EPO

<400> 18
tctagaggtc atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtccct 60

tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctccccc 120

gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180

cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240

ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga acactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300

cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360

agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420

ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480

ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540

tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600

cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660

caggacaggg gacagatcct cttcctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc 720

ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc 780

tcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc 840

tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc 873

<210> 19
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> EPO信號肽

<400> 19

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly
20 25

<210> 20
<211> 166
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> IFN-β

<400> 20

Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1 5 10 15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
20 25 30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
35 40 45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln

50 55 60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65 70 75 80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
85 90 95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
100 105 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
115 120 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
130 135 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145 150 155 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
165

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GLP-1

<400> 21

His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 22

<211> 661
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 22
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcatgagct acaacctgct gggcttcctg cagaggtcca gcaacttcca 120

gtgccagaag ctgctgtggc agctgaacgg caggctggaa tactgcctga aggacaggat 180

gaacttcgac atcccagagg aaatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 240

cctgaccatc tacgagatgc tgcagaacat cttcgccatc ttcaggcagg acagcagcag 300

caccggctgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc aacgtgtacc accagatcaa 360

ccacctgaaa accgtgctgg aagagaagct ggaaaaggag gacttcacca ggggcaagct 420

gatgagcagc ctgcacctga agaggtacta cggcagaatc ctgcactacc tgaaggccaa 480

ggagtacagc cactgcgcct ggaccatcgt gagggtggag atcctgagga acttctactt 540

catcaacagg ctgaccggct acctgaggaa cagctccagc agcaaggccc ctccaccttc 600

cctgcccagt ccaagccgac tccctgggcc ctccgataca ccaattctgc cacagtgatg 660

a 661

<210> 23
<211> 765
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 23
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcatgagct acaacctgct gggcttcctg cagaggtcca gcaacttcca 120

gtgccagaag ctgctgtggc agctgaacgg caggctggaa tactgcctga aggacaggat 180

gaacttcgac atcccagagg aaatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 240

cctgaccatc tacgagatgc tgcagaacat cttcgccatc ttcaggcagg acagcagcag 300

caccggctgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc aacgtgtacc accagatcaa 360

ccacctgaaa accgtgctgg aagagaagct ggaaaaggag gacttcacca ggggcaagct 420

gatgagcagc ctgcacctga agaggtacta cggcagaatc ctgcactacc tgaaggccaa 480

ggagtacagc cactgcgcct ggaccatcgt gagggtggag atcctgagga acttctactt 540

catcaacagg ctgaccggct acctgaggaa cagctccagc agcaaggccc ctccaccttc 600

cctgcccagt ccaagccgac tccctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag 660

ctcctctaag gcccctcctc catccctgcc atccccctcc cggctgcctg gcccctctga 720

caccctatc ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 765

<210> 24
<211> 849
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 24
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccacccccc agcctgccca gccccagcag 120

actgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180

cctgcagagg tccagcaact tccagtgcca gaagctgctg tggcagctga acggcaggct 240

ggaatactgc ctgaaggaca ggatgaactt cgacatccca gaggaaatca agcagctgca 300

gcagttccag aaggaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360

catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420

ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480

ggaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540

aatcctgcac tacctgaagg ccaaggagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600

ggagatcctg aggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaacagctc 660

cagcagcaag gcccctccac cttccctgcc cagtccaagc cgactccctg ggccctccga 720

cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc taaggccccc cctccatccc tgccatcccc 780

ctcccggctg cctggccccc ctgacacccc tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatc 840

cgcggccgc 849

<210> 25
<211> 409
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 25

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
20 25 30

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
35 40 45

Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
50 55 60

Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
65 70 75 80

Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
85 90 95

Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
100 105 110

Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
115 120 125

```
Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
    130                 135                 140

Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
145                 150                 155                 160

Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
                165                 170                 175

Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
            180                 185                 190

Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
        195                 200                 205

Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
    210                 215                 220

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
225                 230                 235                 240

Leu Pro Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser
                245                 250                 255

Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu
            260                 265                 270

Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys
        275                 280                 285

Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu
    290                 295                 300

Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr
305                 310                 315                 320

Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His
```

325 330 335

Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu
340 345 350

Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr
355 360 365

Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys
370 375 380

Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile
385 390 395 400

Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
405

<210> 26
<211> 1261
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 26
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccacccccc agcctgccca gccccagcag 120

gctgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180

cctgcagagg tccagcaact tccagtgcca gaaactgctg tggcagctga acggcaggct 240

ggaatactgc ctgaaggacc ggatgaactt cgacatcccc gaagagatca agcagctgca 300

gcagttccag aaagaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360

catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420

ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480

agaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540

aatcctgcac tacctgaagg ccaaagagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600

ggagatcctg cggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaacagctc 660

cagcagcaag gcccctccac cctccctgcc ctccccaagc agactgcccg gaccctccga 720

cacaccaatt ctgccacaga tgtcctacaa tctgctcgga tttctgcagc gctcctccaa 780

ctttcagtgt cagaagctcc tctggcagct caatggccgc ctggaatatt gtctgaaaga 840

cagaatgaat tttgacatcc cagaggaaat taaacagctc cagcagtttc agaaagaaga 900

tgctgctctc acaatctatg aaatgctcca gaatatcttt gcaatctttc gccaggacag 960

ctcctccacc gggtggaatg agacaattgt cgagaatctg ctcgccaatg tctatcatca 1020

gatcaatcac ctcaagacag tcctcgaaga aaaactcgaa aaagaagatt tcacacgcgg 1080

caaactgatg tcctccctgc atctgaagcg ctactatggg cgcatcctgc attatctgaa 1140

agctaaagaa tactcccact gtgcttggac aattgtgcgc gtcgagatcc tgagaaactt 1200

ttatttcatt aaccgcctga caggatacct gcgcaactga tgaaggtctg gatgcggccg 1260

c 1261

<210> 27
<211> 673
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 27
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccacccccc agcctgccca gccccagcag 120

gctgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180

cctgcagagg tccagcaact tccagtgcca gaaactgctg tggcagctga acggcaggct 240

ggaatactgc ctgaaggacc ggatgaactt cgacatcccc gaagagatca agcagctgca 300

gcagttccag aaagaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360

catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420

ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480

agaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540

aatcctgcac tacctgaagg ccaaagagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600

ggagatcctg cggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaactgatg 660

agtccgcggc cgc 673

<210> 28
<211> 763
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP修飾的IFN

<400> 28
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60

caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccacccccc agcctgccca gccccagcag 120

actgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180

cctgcagagg tccagcaact tccagtgcca gaagctgctg tggcagctga acggcaggct 240

ggaatactgc ctgaaggaca ggatgaactt cgacatccca gaggaaatca agcagctgca 300

gcagttccag aaggaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360

catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420

ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480

ggaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540

aatcctgcac tacctgaagg ccaaggagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600

ggagatcctg aggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaacagctc 660

cagcagcaag gcccctccac cttccctgcc cagtccaagc cgactccctg ggccctccga 720

tacaccaatt ctgccacagt gatgaaggtc tggatgcggc cgc 763

<210> 29
<211> 166
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> IFN-β

<400> 29

```
Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln
1               5                  10                  15

Ser Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu
            20                  25                  30

Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln
        35                  40                  45

Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln
    50                  55                  60

Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn
65                  70                  75                  80

Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn
                85                  90                  95

His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr
            100                 105                 110

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg
        115                 120                 125

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr
    130                 135                 140

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu
145                 150                 155                 160

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn
                165
```

<210> 30
<211> 1356
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII

<400> 30
ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200

ggcatcgtca gctggggcca gggctgcgca accgtgggcc actttggggt gtacaccagg 1260

gtctcccagt acatcgagtg gctgcaaaag ctcatgcgct cagagccacg cccaggagtc 1320

ctcctgcgag ccccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

<210> 31
<211> 444
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII

<400> 31

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 32
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII

<400> 32

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly

245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg
435 440 445

<210> 33
<211> 1442
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP

<400> 33
ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

cctagcagac tgcctgggcc cagcgacacc cccatcctgc cccagtgagg atccgcggcc 1440

gc 1442

<210> 34
<211> 472
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP

<400> 34

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile

115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser
435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
465 470

<210> 35
<211> 1535
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP-CTP

<400> 35

ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

ctgctgagag ccccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

cctagcagac tgcctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctcctctaag 1440

gcccctcctc catccctgcc atccccctcc cggctgccag gcccctctga cacccctatc 1500

ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 1535

<210> 36
<211> 500
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP-CTP

<400> 36

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala

145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser
435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
485 490 495

Ile Leu Pro Gln
500

<210> 37
<211> 1621
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有SP之FVII-CTP-CTP-CTP（MOD-5014）

<400> 37

ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

ctgctgagag ccccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

cctagcagac tgcctgggcc cagtgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1440

gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt 1500

ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1560

ccaggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgcttaatta 1620

a 1621

<210> 38
<211> 528
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有信號肽之FVII-CTP-CTP-CTP（MOD-5014）

<400> 38

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
35 40 45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
50 55 60

Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile
65 70 75 80

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
85 90 95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
100 105 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
115 120 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser
435 440 445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
450 455 460

Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
465 470 475 480

Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
485 490 495

Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro
500 505 510

Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
515 520 525

<210> 39

<211> 1607
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP4X

<400> 39
ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

cctagcagac tgcctgggcc cagtgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1440

gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt 1500

ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1560

ccaggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgc 1607

<210> 40
<211> 532
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP4x

<400> 40

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala
20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu
35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser
50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu
65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe
100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser
130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser
145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys
165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly
180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile
210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys
225 230 235 240

Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu
245 250 255

His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro
260 265 270

Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg
275 280 285

Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu
290 295 300

Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser

305 310 315 320

Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu
325 330 335

Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu
340 345 350

Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met
355 360 365

Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp
370 375 380

Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr
385 390 395 400

Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly
405 410 415

Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
420 425 430

Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser
435 440 445

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
450 455 460

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
465 470 475 480

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
515 520 525

Leu Pro Gln Gly
530

<210> 41
<211> 1775
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP5x

<400> 41
ctcgaggaca tggtctccca ggccctcagg ctcctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60

tgcctggctg cagtcttcgt aacccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120

cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180

gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240

ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300

tcctgcaagg accagctcca gtcctatatc tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360

aactgtgaga cgcacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420

cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480

ctgctggcag acggggtgtc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540

attctagaaa aaagaaatgc cagcaaaccc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600

cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720

aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780

gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840

aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900

cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960

ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020

ctcaacgtgc cccggctgat gacccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080

tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140

tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200

ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260

gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320

ctgctgagag ccccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgcccagc 1380

cctagcagac tgcctgggcc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctcctctaag 1440

gctccaccac cttccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1500

ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgccttctcc atcaaggctg 1560

cctggcccat ccgatacccc aattttgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc 1620

agtctgccct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctccaatcct cccacagtcc 1680

tctagctcta aagctccacc tcccagcctg cccagcccta gtagactccc cggaccttct 1740

gataccccca tcttgcccca gtgatgagga tccgc 1775

<210> 42
<211> 589
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-CTP5x

<400> 42

Leu Glu Asp Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu
1 5 10 15

Gly Leu Gln Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala
20 25 30

His Gly Val Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu
35 40 45

Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser
50 55 60

Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu
65 70 75 80

Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys
85 90 95

Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe
100 105 110

Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp
115 120 125

Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser
130 135 140

Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser
145 150 155 160

Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys
165 170 175

Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly
180 185 190

Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln
195 200 205

Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile
210 215 220

Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys
225 230 235 240

Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu

245 250 255

His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro
260 265 270

Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg
275 280 285

Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu
290 295 300

Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser
305 310 315 320

Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu
325 330 335

Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu
340 345 350

Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met
355 360 365

Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp
370 375 380

Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr
385 390 395 400

Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly
405 410 415

Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met
420 425 430

Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser
435 440 445

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
450 455 460

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
465 470 475 480

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
485 490 495

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
500 505 510

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
515 520 525

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
530 535 540

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser
545 550 555 560

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
565 570 575

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser
580 585

<210> 43
<211> 1404
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX

<400> 43
gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatt 60

gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat gaaaacgcca 120

acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag tttgttcaag 180

ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca cgagaagttt 240

ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga gatcagtgtg 300

agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatgtt 360

ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga 420

atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt tgctcctgta 480

ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg ccatttccat 540

gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcacccg tgctgagact gtttttcctg 600

atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca 660

cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat 720

tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc tctatcgtta 780

atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tggtgttaaa attacagttg 840

tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc 900

gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaaccat gacattgccc 960

ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg 1020

acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080

gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttctccagta ccttagagtt ccacttgttg 1140

accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200

gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260

aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggtgaagag tgtgcaatga 1320

aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380

caaagctcac ttgaacgcgg ccgc 1404

<210> 44
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX

<400> 44

```
Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1               5                  10                  15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
            20                  25                  30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
    130                 135                 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
```

180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr
450 455 460

<210> 45
<211> 1502
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP

<400> 45
gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60

tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120

aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180

gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240

tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt 300

gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360

tggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaaggtggt ttgctcctgt 480

actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540

tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccc gtgctgagac tgtttttcct 600

gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660

acccaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgccaa accaggtcaa 720

ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780

aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840

gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900

cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960

cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020

gacaaggaat acacgaacat cttcctcaaa tttggatctg gctatgtaag tggctgggga 1080

agagtcttcc acaaagggag atcagcttta gttcttcagt accttagagt tccacttgtt 1140

gaccgagcca catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct 1200

ggcttccatg aaggaggtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttact 1260

gaagtggaag ggaccagttt cttaactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg 1320

aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtatg tcaactggat taaggaaaaa 1380

acaaagctca ctagctccag cagcaaggcc cctcccccga gcctgccctc cccaagcagg 1440

ctgcctgggc cctccgacac accaatcctg ccacagtgat gaaggtctgg atccgcggcc 1500

gc 1502

<210> 46
<211> 489
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP

<400> 46

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

```
Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
        35                  40                  45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
    50                  55                  60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65                  70                  75                  80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
                85                  90                  95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
            100                 105                 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
        115                 120                 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
    130                 135                 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145                 150                 155                 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
                165                 170                 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
            180                 185                 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
        195                 200                 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
```

225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
485

<210> 47
<211> 1585
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP-CTP

<400> 47
gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60

tgccttttag gatatctact cagtgctgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120

aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180

gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240

tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt 300

gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360

tggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420

aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgctgata acaaggtggt ttgctcctgt 480

actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540

tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagctcaccc gtgctgagac tgtttttcct 600

gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660

acccaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgccaa accaggtcaa 720

ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcgtt 780

aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840

gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900

cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960

cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020

acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080

gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt ccacttgttg 1140

accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200

gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260

aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggtgaagag tgtgcaatga 1320

aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380

caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctcccccgag cctgccctcc ccaagcaggc 1440

tgcctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctcctctaag gcccctcctc 1500

catccctgcc atccccctcc cggctgcctg gcccctctga cacccctatc ctgcctcagt 1560

gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 1585

<210> 48
<211> 517
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP-CTP

<400> 48

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn

35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
210 215 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225 230 235 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
245 250 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
260 265 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
275 280 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
290 295 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305 310 315 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
325 330 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
340 345 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
355 360 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
370 375 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385 390 395 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser

435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln
515

<210> 49
<211> 1673
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有SP之FIX-CTP-CTP-CTP（MOD-3013）

<400> 49
tctagagtcg accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc 60

atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat 120

gaaaacgcca acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag 180

tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca 240

cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga 300

gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc 360

tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt 420

aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt 480

tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg 540

ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcacccg tgctgaggca 600

gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc 660

actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa 720

ccaggtcaat tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc 780

tctatcgtta atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tggtgttaaa 840

attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga 900

aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaaccat 960

gacattgccc ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt 1020

tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt 1080

ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt 1140

ccacttgttg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200

ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260

catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggtgaagag 1320

tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt 1380

aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccccgag cctgccctcc 1440

ccaagcaggc tgcctgggcc cagtgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctccagcaag 1500

gccccacccc ctagcctgcc ttctccttct cggctgcctg gccccagcga tactccaatt 1560

ctgccccagt cctccagcag taaggctccc cctccatctc tgccatcccc cagcagactg 1620

ccaggccctt ctgatacacc catcctccca cagtgatgag gatccgcggc cgc 1673

<210> 50
<211> 545
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有SP之FIX-CTP-CTP-CTP（MOD-3013）

<400> 50

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr

1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg Tyr Asn
35 40 45

Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg Glu Cys
50 55 60

Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn
65 70 75 80

Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly Asp Gln
85 90 95

Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Asp Ile
100 105 110

Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys Asn Cys
115 120 125

Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu Gln Phe
130 135 140

Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr Glu Gly
145 150 155 160

Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe
165 170 175

Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala
180 185 190

Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu
195 200 205

```
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe
    210                 215                 220

Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp
225                 230                 235                 240

Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile
                245                 250                 255

Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly
            260                 265                 270

Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu
        275                 280                 285

His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn
    290                 295                 300

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu
305                 310                 315                 320

Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile
                325                 330                 335

Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr
            340                 345                 350

Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val
        355                 360                 365

Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg
    370                 375                 380

Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His
385                 390                 395                 400

Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val
```

405 410 415

Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly
420 425 430

Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser
435 440 445

Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser
450 455 460

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
485 490 495

Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
500 505 510

Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
515 520 525

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
530 535 540

Gln
545

<210> 51
<211> 1757
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP4x

<400> 51
tctagagtcg accccgccat gcagcgcgtg aacatgatca tggcagaatc accaggcctc 60

atcaccatct gccttttagg atatctactc agtgctgaat gtacagtttt tcttgatcat 120

gaaaacgcca acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag 180

tttgttcaag ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca 240

cgagaagttt ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga 300

gatcagtgtg agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc 360

tatgaatgtt ggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt 420

aacattaaga atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt 480

tgctcctgta ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg 540

ccatttccat gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcacccg tgctgaggca 600

gtttttcctg atgtggacta tgtaaattct actgaagctg aaaccatttt ggataacatc 660

actcaaagca cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttggtggaga agatgccaaa 720

ccaggtcaat tcccttggca ggttgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc 780

tctatcgtta atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tggtgttaaa 840

attacagttg tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga 900

aatgtgattc gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaaccat 960

gacattgccc ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt 1020

tgcattgctg acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt 1080

ggctggggaa gagtcttcca caaagggaga tcagctttag ttcttcagta ccttagagtt 1140

ccacttgttg accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg 1200

ttctgtgctg gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc 1260

catgttactg aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg gggtgaagag 1320

tgtgcaatga aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt 1380

aaggaaaaaa caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccccgag cctgccctcc 1440

ccaagcaggc tgcctgggcc ctctgacacc cctatcctgc ctcagtccag ctcctctaag 1500

gccccaccac cttccctgcc tagcccttca agactgccag gccctagcga tacaccaatt 1560

ctgccccagt cctccagcag caaggctccc ccacctagcc tgccttctcc atcaaggctg 1620

cctggcccat ccgatacccc aattttgcct cagagcagct ctagcaaggc acctcccccc 1680

agtctgccct ctccaagcag actccctggc ccttcagaca ctcccattct gccacagtga 1740

tgaggatccg cggccgc 1757

<210> 52
<211> 583
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP4x

<400> 52

Ser Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu
1 5 10 15

Ser Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala
20 25 30

Glu Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn
35 40 45

Arg Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly
50 55 60

Asn Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala
65 70 75 80

Arg Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln
85 90 95

Tyr Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly
100 105 110

Ser Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly
115 120 125

Phe Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn
130 135 140

Gly Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val
145 150 155 160

Cys Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys
165 170 175

Glu Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr
180 185 190

Ser Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val
195 200 205

Asn Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr
210 215 220

Gln Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys
225 230 235 240

Pro Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala
245 250 255

Phe Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala
260 265 270

His Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His
275 280 285

Asn Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg
290 295 300

Ile Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His
305 310 315 320

Asp Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr

325 330 335

Val Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu
340 345 350

Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys
355 360 365

Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp
370 375 380

Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met
385 390 395 400

Phe Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp
405 410 415

Ser Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr
420 425 430

Gly Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly
435 440 445

Ile Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr
450 455 460

Lys Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
465 470 475 480

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser
485 490 495

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
500 505 510

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
515 520 525

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
530 535 540

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
545 550 555 560

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
565 570 575

Leu Pro Gln Gly Ser Ala Ala
580

<210> 53
<211> 1840
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP5x

<400> 53
ctagagtcga ccccgccatg cagcgcgtga acatgatcat ggcagaatca ccaggcctca 60

tcaccatctg ccttttagga tatctactca gtgctgaatg tacagttttt cttgatcatg 120

aaaacgccaa caaaattctg aatcggccaa agaggtataa ttcaggtaaa ttggaagagt 180

ttgttcaagg gaaccttgag agagaatgta tggaagaaaa gtgtagtttt gaagaagcac 240

gagaagtttt tgaaaacact gaaagaacaa ctgaattttg gaagcagtat gttgatggag 300

atcagtgtga gtccaatcca tgtttaaatg gcggcagttg caaggatgac attaattcct 360

atgaatgttg gtgtcccttt ggatttgaag gaaagaactg tgaattagat gtaacatgta 420

acattaagaa tggcagatgc gagcagtttt gtaaaaatag tgctgataac aaggtggttt 480

gctcctgtac tgagggatat cgacttgcag aaaaccagaa gtcctgtgaa ccagcagtgc 540

catttccatg tggaagagtt tctgtttcac aaacttctaa gctcacccgt gctgaggcag 600

tttttcctga tgtggactat gtaaattcta ctgaagctga aaccattttg gataacatca 660

ctcaaagcac ccaatcattt aatgacttca ctcgagttgt tggtggagaa gatgccaaac 720

caggtcaatt cccttggcag gttgttttga atggtaaagt tgatgcattc tgtggaggct 780

ctatcgttaa tgaaaaatgg attgtaactg ctgcccactg tgttgaaact ggtgttaaaa 840

ttacagttgt cgcaggtgaa cataatattg aggagacaga acatacagag caaaagcgaa 900

atgtgattcg aattattcct caccacaact acaatgcagc tattaataag tacaaccatg 960

acattgccct tctggaactg gacgaaccct tagtgctaaa cagctacgtt acacctattt 1020

gcattgctga caaggaatac acgaacatct tcctcaaatt tggatctggc tatgtaagtg 1080

gctggggaag agtcttccac aaagggagat cagctttagt tcttcagtac cttagagttc 1140

cacttgttga ccgagccaca tgtcttcgat ctacaaagtt caccatctat aacaacatgt 1200

tctgtgctgg cttccatgaa ggaggtagag attcatgtca aggagatagt gggggacccc 1260

atgttactga agtggaaggg accagtttct taactggaat tattagctgg ggtgaagagt 1320

gtgcaatgaa aggcaaatat ggaatatata ccaaggtatc ccggtatgtc aactggatta 1380

aggaaaaaac aaagctcact agctccagca gcaaggcccc tcccccgagc ctgccctccc 1440

caagcaggct gcctgggccc tctgacaccc ctatcctgcc tcagtccagc tcctctaagg 1500

ctccaccacc ttccctgcct agcccttcaa gactgccagg ccctagcgat acaccaattc 1560

tgccccagtc ctccagcagc aaggctcccc cacctagcct gccttctcca tcaaggctgc 1620

ctggcccatc cgatacccca attttgcctc agagcagctc tagcaaggca cctcccccca 1680

gtctgccctc tccaagcaga ctccctggcc cttcagacac tccaatcctc ccacagtcct 1740

ctagctctaa agctccacct cccagcctgc ccagccctag tagactcccc ggaccttctg 1800

ataccccccat cttgccccag tgatgaggat ccgcggccgc 1840

<210> 54
<211> 610
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FIX-CTP5x

<400> 54

Arg Val Asp Pro Ala Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser

1 5 10 15

Pro Gly Leu Ile Thr Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu
20 25 30

Cys Thr Val Phe Leu Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg
35 40 45

Pro Lys Arg Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn
50 55 60

Leu Glu Arg Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg
65 70 75 80

Glu Val Phe Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr
85 90 95

Val Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser
100 105 110

Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe
115 120 125

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly
130 135 140

Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys
145 150 155 160

Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu
165 170 175

Pro Ala Val Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser
180 185 190

Lys Leu Thr Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn
195 200 205

Ser Thr Glu Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln
210 215 220

Ser Phe Asn Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro
225 230 235 240

Gly Gln Phe Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe
245 250 255

Cys Gly Gly Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His
260 265 270

Cys Val Glu Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn
275 280 285

Ile Glu Glu Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile
290 295 300

Ile Pro His His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp
305 310 315 320

Ile Ala Leu Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val
325 330 335

Thr Pro Ile Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys
340 345 350

Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly
355 360 365

Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg
370 375 380

Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe
385 390 395 400

Cys Ala Gly Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser

405 410 415

Gly Gly Pro His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly
420 425 430

Ile Ile Ser Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile
435 440 445

Tyr Thr Lys Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys
450 455 460

Leu Thr Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
465 470 475 480

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser
485 490 495

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro
500 505 510

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala
515 520 525

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
530 535 540

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
545 550 555 560

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
565 570 575

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
580 585 590

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Gly Ser
595 600 605

Ala Ala
610

<210> 55
<211> 2413
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 弗林蛋白酶

<400> 55
tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca 60

ggaaccttgg tcctgctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg 120

gctgtgcgca tccctggagg cccagcggtg gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc 180

ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccacttct ggcatcgagg agtgacgaag 240

cggtccctgt cgcctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag 300

tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca 360

gaccccaagt ttcctcagca gtggtacctg tctggtgtca ctcagcggga cctgaatgtg 420

aaggcggcct gggcgcaggg ctacacaggg cacggcattg tggtctccat tctggacgat 480

ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagttttgat 540

gtcaatgacc aggaccctga cccccagcct cggtacacac agatgaatga caacaggcac 600

ggcacacggt gtgcgggggga agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tggtgtaggt 660

gtggcctaca acgcccgcat tggaggggtg cgcatgctgg atggcgaggt gacagatgca 720

gtggaggcac gctcgctggg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg 780

ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc 840

ttccgtgggg ttagccaggg ccgaggggggg ctgggctcca tctttgtctg ggcctcgggg 900

aacgggggcc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg 960

ctgtccatca gcagcgccac gcagtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgctcg 1020

tccacactgg ccacgaccta cagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact 1080

gacttgcggc agaagtgcac ggagtctcac acgggcacct cagcctctgc ccccttagca 1140

gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa 1200

cacctggtgg tacagacctc gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat 1260

ggtgtgggcc ggaaagtgag ccactcatat ggctacgggc ttttggacgc aggcgccatg 1320

gtggccctgg cccagaattg gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcat catcgacatc 1380

ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc 1440

ctgggcgagc ccaaccacat cactcggctg gagcacgctc aggcgcggct caccctgtcc 1500

tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggtcagcc ccatgggcac ccgctccacc 1560

ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcatg 1620

acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggg tcctagagat tgaaaacacc 1680

agcgaagcca acaactatgg gacgctgacc aagttcaccc tcgtactcta tggcaccgcc 1740

cctgaggggc tgcccgtacc tccagaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagtcag 1800

gcctgtgtgg tgtgcgagga aggcttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc 1860

cctccaggct tcgccccccа agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920

accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cacgcctcat gtgccacatg ccaggggccg 1980

gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cacgcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040

tgctcccggc aaagccagag cagccgagag tccccgccac agcagcagcc acctcggctg 2100

cccccggagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgccctc acacctgcct 2160

gaggtggtgg ccggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttcctg 2220

gtcctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cgggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280

ggcctcatct cctacaaggg gctgcccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340

tcagaagagg acgagggccg gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgccctc 2400

tgaacgcggc cgc 2413

<210> 56
<211> 794
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 弗林蛋白酶

<400> 56

```
Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr
1               5                  10                  15

Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn
            20                  25                  30

Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val
        35                  40                  45

Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr
    50                  55                  60

Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His
65                  70                  75                  80

Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu
                85                  90                  95

Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu
            100                 105                 110

Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr
        115                 120                 125

Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly
    130                 135                 140

His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His
145                 150                 155                 160

Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn
                165                 170                 175
```

```
Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn
            180                 185                 190

Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn
        195                 200                 205

Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val
    210                 215                 220

Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu
225                 230                 235                 240

Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro
                245                 250                 255

Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu
            260                 265                 270

Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile
        275                 280                 285

Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn
    290                 295                 300

Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala
305                 310                 315                 320

Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr
                325                 330                 335

Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val
            340                 345                 350

Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser
        355                 360                 365

Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala
```

370 375 380

Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr
385 390 395 400

Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val
405 410 415

Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly
420 425 430

Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg
435 440 445

Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg
450 455 460

Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His
465 470 475 480

Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn
485 490 495

Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg
500 505 510

Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe
515 520 525

Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser
530 535 540

Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr
545 550 555 560

Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu
565 570 575

Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser
580 585 590

Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys
595 600 605

Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp
610 615 620

Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val
625 630 635 640

Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu
645 650 655

Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu
660 665 670

Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln
675 680 685

Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu
690 695 700

Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu
705 710 715 720

Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu
725 730 735

Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met
740 745 750

Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln
755 760 765

Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg

770 775 780

Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu
785 790

<210> 57
<211> 37
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 調酸素

<400> 57

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 58
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-OXM-CTP

<400> 58

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr
50 55 60

Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu
65 70 75 80

Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Ser Ser Ser Ser Lys
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
100 105 110

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
115

<210> 59
<211> 147
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-OXM-CTP-CTP

<400> 59

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr
50 55 60

Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu
65 70 75 80

Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Ser Ser Ser Ser Lys
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
100 105 110

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
130 135 140

Leu Pro Gln
145

<210> 60
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-CTP

<400> 60

Leu Glu Asp Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe
1 5 10 15

Gly Leu Leu Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala His Ser Gln
20 25 30

Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala
35 40 45

Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn
50 55 60

Ile Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
65 70 75 80

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro
100 105 110

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
115 120

<210> 61
<211> 140
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-CTP-OXM

<400> 61

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
20 25 30

Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp
35 40 45

Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
50 55 60

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
65 70 75 80

Pro Gln His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu
85 90 95

Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys
100 105 110

Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Arg Ser Gly Cys Gly Arg Gly Thr Leu
115 120 125

Gly Leu Met Gly Leu Pro Phe Thr Ala Arg Phe Pro
130 135 140

<210> 62
<211> 147
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-CTP-CTP

<400> 62

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala His Ser Gln Gly Thr Phe
20 25 30

Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe
35 40 45

Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
65 70 75 80

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
100 105 110

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
130 135 140

Leu Pro Gln
145

<210> 63
<211> 175
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-4x

<400> 63

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala His Ser Gln Gly Thr Phe
20 25 30

Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe
35 40 45

Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
65 70 75 80

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
100 105 110

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
130 135 140

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
145 150 155 160

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
165 170 175

<210> 64
<211> 203
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-5x

<400> 64

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala His Ser Gln Gly Thr Phe
20 25 30

Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe
35 40 45

Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala Ser
50 55 60

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
65 70 75 80

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
85 90 95

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
100 105 110

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
115 120 125

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
130 135 140

Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser
145 150 155 160

Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser
165 170 175

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
180 185 190

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
195 200

<210> 65
<211> 391
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-OXM-CTP

<400> 65
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agcacagcca 180

gggcaccttc accagcgact acagcaagta cctggacagc agaagggccc aggacttcgt 240

ccagtggctg atgaacacca agaggaacag gaacaacatc gcttcctcta gctccaaggc 300

ccctccaccc tctctgccta gcccctctcg gctgcctggc ccatccgaca caccaatcct 360

gccacagtga tgaaggtctg gatgcggccg c 391

<210> 66

<211> 475
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-OXM-CTP-CTP

<400> 66
tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60

cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120

gcccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacaccc attctgcccc agcacagcca 180

gggcaccttc accagcgact acagcaagta cctggacagc agaagggccc aggacttcgt 240

ccagtggctg atgaacacca agaggaacag gaacaacatc gctagctcca gcagcaaggc 300

ccctcccccg agcctgccct ccccaagcag gctgcctggg ccctccgaca caccaatcct 360

gccacagagc agctcctcta aggcccctcc tccatccctg ccatcccccc cccggctgcc 420

tggcccctct gacaccccta tcctgcctca gtgatgaagg tctggatgcg gccgc 475

<210> 67
<211> 391
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-CTP

<400> 67
tctagaggac atggccacag ggagcaggac cagcctgctg ctggctttcg gcctgctgtg 60

tctgccatgg ctgcaggagg gcagcgctca cagccagggc accttcacca gcgactacag 120

caagtacctg gacagcagaa gggcccagga cttcgtccag tggctgatga acaccaagag 180

gaacaggaac aacatcgcta gctccagcag caaggccccc cccccgagcc tgccctcccc 240

aagcaggctg cctgggccct ccgacacacc aatcctgcca cagagcagct cctctaaggc 300

ccctcctcca tccctgccat ccccctcccg gctgcctggc ccctctgaca cccctatcct 360

gcctcagtga tgaaggtctg gatgcggccg c 391

<210> 68

<211> 481
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> CTP-CTP-OXM

<400> 68
ctatagggcg aattgaagga aggccgtcaa ggccgcatga gctctctaga ggacatggcc 60

accggcagca ggaccagcct gctgctggcc ttcggcctgc tgtgcctgcc atggctgcag 120

gagggcagcg ccagctccag cagcaaggcc cctcccccga gcctgccctc cccaagcagg 180

ctgcctgggc cctccgacac accaatcctg ccacagagca gctcctctaa ggcccctcct 240

ccatccctgc catcccccctc ccggctgcct ggcccctctg acacccctat cctgcctcag 300

cacagccagg gcaccttcac cagcgactac agcaagtacc tggacagcag aagggcccag 360

gacttcgtcc agtggctgat gaacaccaag aggaacagga acaacatcgc ttgatgaagg 420

tctggatgcg gccgcggtac cctgggcctc atgggccttc ctttcactgc ccgctttcca 480

g 481

<210> 69
<211> 481
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-CTP-CTP

<400> 69
tctagactcg agcgatcgcc atggccaccg gctctaggac ctccctgctg ctggccttcg 60

gcctgctgtg cctgccctgg ctgcaggaag gcagcgctca ctcccagggc accttcacct 120

ccgactactc caagtacctg gactctcgga gagcccagga cttcgtgcag tggctgatga 180

acaccaagcg gaaccggaac aatatcgcct cctcaagctc caaggcacct ccaccttccc 240

tgcctagccc ttccagactc cctgggccca gtgacacccc tatcctgcct cagtccagct 300

ccagcaaggc cccacccccct agcctgcctt ctccttctcg gctgcctggc cccagcgata 360

ctccaattct gccccagtcc tccagcagta aggctccccc tccatctctg ccatccccca 420

gcagactgcc aggcccttct gatacaccca tcctcccaca gtgatgagga tccgcggccg 480

c 481

<210> 70
<211> 565
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-4x

<400> 70
tctagactcg agcgatcgcc atggctaccg gctccagaac ctctctgctg ctggccttcg 60

gcctgctgtg tctgccttgg ctgcaagagg gcagcgctca ttcccagggc accttcacct 120

ccgactactc caagtacctg gactctcgca gagcccagga cttcgtgcag tggctgatga 180

acaccaagcg gaaccggaac aatatcgcct cctccagctc caaggccccc cctccatctc 240

tgccatcccc cagtagactg cctgggccct ctgacacccc tatcctgcct cagtccagct 300

cctctaaggc cccaccacct tccctgccta gcccttcaag actgccaggc cctagcgata 360

caccaattct gccccagtcc tccagcagca aggctccccc acctagcctg ccttctccat 420

caaggctgcc tggcccatcc gataccccaa ttttgcctca gagcagctct agcaaggcac 480

ctccccccag tctgccctct ccaagcagac tccctggccc ttcagacact cccattctgc 540

cacagtgatg aggatccgcg gccgc 565

<210> 71
<211> 650
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> OXM-CTP-5x

<400> 71
ctctagactc gagcgatcgc catggctacc ggctccagaa cctctctgct gctggccttc 60

ggcctgctgt gtctgccttg gctgcaagag ggcagcgctc attcccaggg caccttcacc 120

tccgactact ccaagtacct ggactctcgc agagcacagg acttcgtgca gtggctgatg 180

aacaccaagc ggaaccggaa caatatcgcc tcctccagct ccaaggcccc tcctccatct 240

ctgccatccc ccagtagact gcctgggccc tctgacaccc ctatcctgcc tcagtccagc 300

tcctctaagg ctccaccacc ttccctgcct agcccttcaa gactgccagg ccctagcgat 360

acaccaattc tgccccagtc ctccagcagc aaggctcccc cacctagcct gccttctcca 420

tcaaggctgc ctggcccatc cgatacccca attttgcctc agagcagctc tagcaaggca 480

cctcccccca gtctgccctc tccaagcaga ctccctggcc cttcagacac tccaatcctc 540

ccacagtcct ctagctctaa agctccacct cccagcctgc ccagccctag tagactcccc 600

ggaccttctg ataccccccat cttgccccag tgatgaggat ccgcggccgc 650

<210> 72
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 72
aatctagagg tcatcatggg ggtgc 25

<210> 73
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 73
attgcggccg cggatccaga agacctttat tg 32

<210> 74
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 74

taaatattgg ggtgtccgag ggccc 25

<210> 75
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 75
ccaatattac cacaagcccc accacgcctc at 32

<210> 76
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 76
tgcggccgcg gatccttatc tgtcccctgt cctgc 35

<210> 77
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 77
gccctgctgt cggaagc 17

<210> 78
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 78
attgcggccg cggatccaga agacctttat tg 32

<210> 79
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 79
ctttgaggaa gaggagccca ggactgggag gc 32

<210> 80
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 80
cctgggctcc tcttcctcaa aggc 24

<210> 81
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 81
gcttccgaca gcagggc 17

<210> 82
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 82
gtttagtgaa ccgtcagaat 20

<210> 83

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 83
ttgaggaaga tgttcgtgta 20

<210> 84
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 84
attacagttg tcgcaggtga 20

<210> 85
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 85
gctggagcta gtgagctttg ttttttcctt 30

<210> 86
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 86
ttttcactgc attctagttg tgg 23

<210> 87
<211> 20
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 87
ctcccagttc aattacagct 20

<210> 88
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 88
ggaaaaactg cctcagcacg ggtgagc 27

<210> 89
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 89
gtgctgaggc agtttttcct gatgtggact at 32

<210> 90
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 90
caacacagtg ggcagcag 18

<210> 91
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 91
ctcgaggaca tggtctccca ggccc 25

<210> 92
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 92
tctagaatag gtatttttcc acatg 25

<210> 93
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 93
tctagaaaaa agaaatgcca gc 22

<210> 94
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 94
gcggccgcat cctcagggaa atggggctcg ca 32

<210> 95
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 95
ctctagagga catggccac 19

<210> 96
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 96
ctggctgtgc tggggcagaa tgggtgt 27

<210> 97
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 97
ccccagcaca gccaggg 17

<210> 98
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 98
gcggccgcat ccagacct 18

<210> 99
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 99

ctctagagga catggccac 19

<210> 100
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 100
gctggagcta gcgatgttgt tcctgttcc 29

<210> 101
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 101
acatcgctag ctccagcagc aaggcc 26

<210> 102
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 102
gcggccgcat ccagacct 18

<210> 103
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 103
ctcccagttc aattacagct 20

<210> 104
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 104
gctgtgagcg ctgccctcct gcag 24

<210> 105
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 105
gcgctcacag ccagggcacc ttc 23

<210> 106
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 106
gcggccgcat ccagacct 18

<210> 107
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子

<400> 107
gctcactagc tccagcagca aggcc 25

<210> 108

<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 信號肽IFN β1

<400> 108

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ala Leu Ser
20

<210> 109
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 不具有SP之CTP修飾的EPO

<400> 109

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg
20 25 30

Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys
35 40 45

Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn
50 55 60

Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys
65 70 75 80

Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala
85 90 95

Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser
100 105 110

Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser
115 120 125

Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys
130 135 140

Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr
145 150 155 160

Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe
165 170 175

Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly
180 185 190

Asp Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
195 200 205

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser
210 215 220

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro
225 230 235 240

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
245 250

<210> 110
<211> 38
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII之信號肽

<400> 110

Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
1 5 10 15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
20 25 30

Leu His Arg Arg Arg Arg
35

<210> 111
<211> 490
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 不具有SP之CTP修飾的FVII/FVIIa MOD-5014

<400> 111

Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro Gly Ser Leu Glu Arg Glu
1 5 10 15

Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Ile Phe Lys
20 25 30

Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser Asp Gly Asp
35 40 45

Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp Gln
50 55 60

Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro Ala Phe Glu Gly Arg Asn
65 70 75 80

Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile Cys Val Asn Glu Asn Gly
85 90 95

Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr Gly Thr Lys Arg Ser Cys
100 105 110

```
Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala Asp Gly Val Ser Cys Thr
        115                 120                 125

Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile Pro Ile Leu Glu Lys Arg
    130                 135                 140

Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val Gly Gly Lys Val Cys Pro
145                 150                 155                 160

Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu Leu Val Asn Gly Ala Gln
                165                 170                 175

Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile Trp Val Val Ser Ala Ala
            180                 185                 190

His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg Asn Leu Ile Ala Val Leu
        195                 200                 205

Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Glu Gln Ser Arg Arg
    210                 215                 220

Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr Val Pro Gly Thr Thr Asn
225                 230                 235                 240

His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln Pro Val Val Leu Thr Asp
                245                 250                 255

His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg Thr Phe Ser Glu Arg Thr
            260                 265                 270

Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser Gly Trp Gly Gln Leu Leu
        275                 280                 285

Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met Val Leu Asn Val Pro Arg
    290                 295                 300

Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser Arg Lys Val Gly Asp Ser
```

305 310 315 320

Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala Gly Tyr Ser Asp Gly Ser
325 330 335

Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Ala Thr His Tyr
340 345 350

Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val Ser Trp Gly Gln Gly Cys
355 360 365

Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr Arg Val Ser Gln Tyr Ile
370 375 380

Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu Pro Arg Pro Gly Val Leu
385 390 395 400

Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser
405 410 415

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu
420 425 430

Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro
435 440 445

Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser
450 455 460

Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
485 490

<210> 112
<211> 46
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> FIX之信號肽

<400> 112

Met Gln Arg Val Asn Met Ile Met Ala Glu Ser Pro Gly Leu Ile Thr
1 5 10 15

Ile Cys Leu Leu Gly Tyr Leu Leu Ser Ala Glu Cys Thr Val Phe Leu
20 25 30

Asp His Glu Asn Ala Asn Lys Ile Leu Asn Arg Pro Lys Arg
35 40 45

<210> 113
<211> 499
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 不具有SP之CTP修飾的FIX MOD-3013

<400> 113

Tyr Asn Ser Gly Lys Leu Glu Glu Phe Val Gln Gly Asn Leu Glu Arg
1 5 10 15

Glu Cys Met Glu Glu Lys Cys Ser Phe Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe
20 25 30

Glu Asn Thr Glu Arg Thr Thr Glu Phe Trp Lys Gln Tyr Val Asp Gly
35 40 45

Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser Cys Lys Asp
50 55 60

Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe Glu Gly Lys
65 70 75 80

Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly Arg Cys Glu

85 90 95

Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys Ser Cys Thr
100 105 110

Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val
115 120 125

Pro Phe Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr
130 135 140

Arg Ala Glu Ala Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu
145 150 155 160

Ala Glu Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn
165 170 175

Asp Phe Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe
180 185 190

Pro Trp Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly
195 200 205

Ser Ile Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu
210 215 220

Thr Gly Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu
225 230 235 240

Thr Glu His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His
245 250 255

His Asn Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu
260 265 270

Leu Glu Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile
275 280 285

```
Cys Ile Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser
    290                 295                 300

Gly Tyr Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala
305                 310                 315                 320

Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys
                325                 330                 335

Leu Arg Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly
            340                 345                 350

Phe His Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro
        355                 360                 365

His Val Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser
    370                 375                 380

Trp Gly Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys
385                 390                 395                 400

Val Ser Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser
                405                 410                 415

Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu
            420                 425                 430

Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys
        435                 440                 445

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
    450                 455                 460

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
465                 470                 475                 480

Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
```

485 490 495

Leu Pro Gln

<210> 114
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 不具有SP之CTP修飾的OXM

<400> 114

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
35 40 45

Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
50 55 60

Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
65 70 75 80

Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser
85 90 95

Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
100 105 110

Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
115 120

<210> 115

<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 用於CTP修飾的OXM之SP

<400> 115

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種人類絨膜促性腺激素羧基末端肽（CTP）修飾之凝血因子多肽，其係由凝血因子多肽及三個連接至該凝血因子之羧基末端的CTP單元組成，其中該凝血因子包括凝血因子VII（FVII）或活化的凝血因子VII（FVIIa），其中該多肽之胺基酸序列係如SEQ ID NO: 38或SEQ ID NO: 111所載，其中各CTP之糖基化模式包括至少4至6個O-鍵聯聚糖，至少一個CTP單元包括至少5個O-鍵聯聚糖，且該凝血因子沒有糖基化，且其中該CTP修飾之凝血因子多肽之純度為至少70%。

【請求項2】

如請求項1之多肽，其中該多肽經高度糖基化。

【請求項3】

如請求項1之多肽，其中該CTP修飾之凝血因子多肽經高度唾液酸化。

【請求項4】

如請求項1之多肽，其中該CTP修飾之凝血因子多肽缺乏信號肽。

【請求項5】

如請求項1之多肽，其中該FVIIa缺乏信號肽。

【請求項6】

如請求項1至5中任一項之多肽，其係經由包含以下之步驟之方法製備：

（a）用包括編碼該CTP修飾之凝血因子多肽之編碼部分之表現載體穩定轉染預定數量的細胞，其中該經轉染之細胞表現並分泌該CTP修飾之

凝血因子多肽；

（b）獲得過度表現該CTP修飾之凝血因子多肽之細胞純系；

（c）將該純系在溶液中擴增至預定規模，該純系是獲自最佳表現並分泌該CTP修飾之凝血因子多肽之工作細胞庫（WCB）或主細胞庫（MCB）；

（d）收集該含有該純系之溶液；

（e）過濾該含有該純系之溶液，以獲得澄清的收集物溶液；以及

（f）純化該澄清的收集物溶液，以獲得具有所期望的CTP修飾之凝血因子多肽濃度之經純化的蛋白質溶液，且其中該經純化之CTP修飾之凝血因子多肽經高度糖基化；

從而製造該CTP修飾之凝血因子多肽。

【請求項7】

如請求項6之多肽，其中該經分泌之CTP修飾之凝血因子為缺乏信號肽之CTP修飾之凝血因子多肽的成熟形式。

【請求項8】

如請求項6之多肽，其中該CTP修飾之凝血因子多肽之純度為至少70%。

【請求項9】

如請求項6之多肽，其中該製備方法為無動物衍生物(animal derived-free)方法。

【請求項10】

如請求項6之多肽，其中在步驟（c）中，該CTP修飾之凝血因子多肽以至少30 mg/ml之含量表現。

【請求項11】

如請求項6之多肽，其中在步驟（c）中，在溶液中擴增該純系包括將該純系在溶液中經由一系列轉種步驟擴增至生產用生物反應器水準。

【請求項12】

如請求項11之多肽，其中該生物反應器包括拋棄式生物反應器、不鏽鋼生物反應器、進料分批模式生物反應器、分批模式生物反應器、重複分批模式生物反應器、或灌注模式生物反應器，或其任何組合。

【請求項13】

如請求項6之多肽，其中在步驟（f）中，該澄清的收集物中之至少60%之該CTP修飾之凝血因子多肽包括該CTP修飾之凝血因子多肽之高糖基化形式。

【請求項14】

如請求項6之多肽，其中該方法達成高度糖基化的CTP修飾之凝血因子多肽之至少20%回收率。

【請求項15】

如請求項14之多肽，其中該病毒清除率展示大於12之病毒對數下降因數（LRF）。

【請求項16】

如請求項6之多肽，其進一步包括表徵該CTP修飾之多肽之步驟，該表徵包括測定O-聚糖含量、測定O-聚糖佔有率、或測定該CTP修飾之多肽之純度，或其任何組合。

【請求項17】

如請求項6之多肽，其中該純化（步驟f）包括依序進行以下步驟，

包括：

（g）濃縮、透濾及純化該澄清的收集物溶液；

其中該濃縮、透濾及純化係藉由使該澄清的收集物溶液依序通過陰離子交換管柱及疏水性相互作用管柱來實現；

（h）獲得在步驟（g）之後獲得之該澄清的收集物，並藉由在對病毒有毒性之溶液中培育來使該澄清的收集物中存在的該病毒不活化；

（i）獲得來自步驟（h）之該澄清的收集物溶液，並濃縮、透濾及純化該澄清的收集物溶液，

其中該濃縮、透濾及純化之後使該澄清的收集物溶液依序通過多模式或混合模式蛋白質層析管柱及陽離子交換管柱；

（j）在步驟（i）之後獲得該澄清的收集物溶液，並藉由奈米過濾以物理方式將病毒自該澄清的收集物溶液中移除；以及

（k）在步驟（j）之後獲得該澄清的收集物溶液，並濃縮及透濾該澄清的收集物溶液，獲得含有該高度糖基化形式之CTP修飾之凝血因子多肽之經最大限度純化之澄清的收集物。

【請求項18】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1至17中任一項之多肽及醫藥學上可接受之載劑。

【發明圖式】

【圖1A】



【圖1B】



【圖1C】



【圖1D】

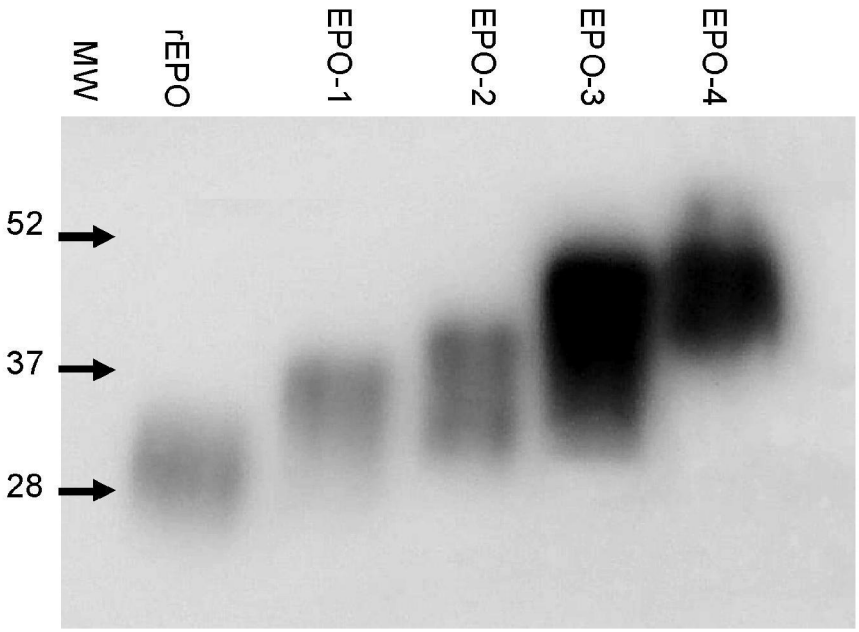


【圖1E】

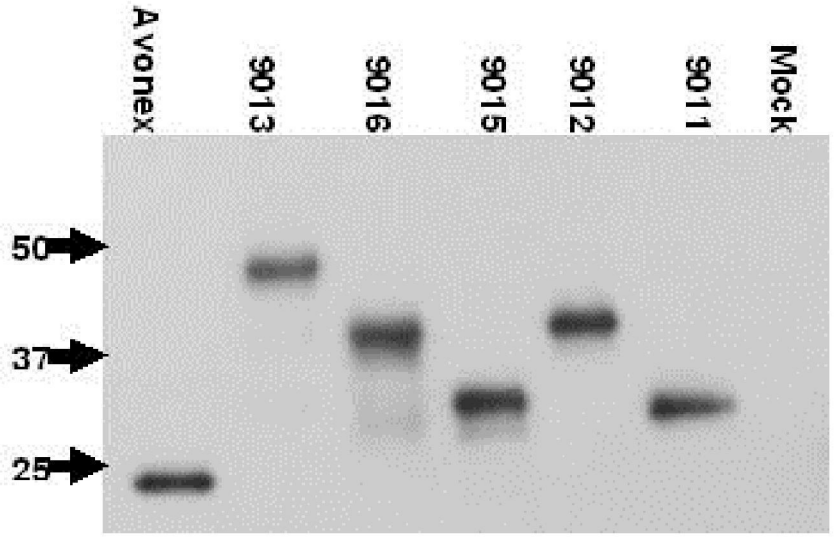


【圖1F】

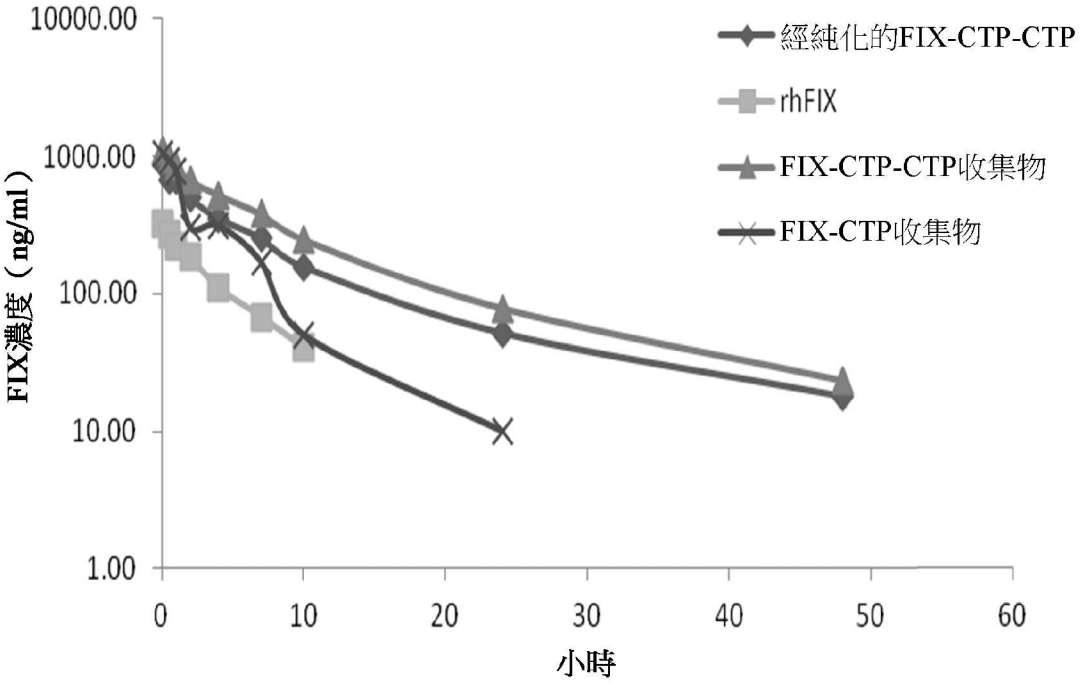




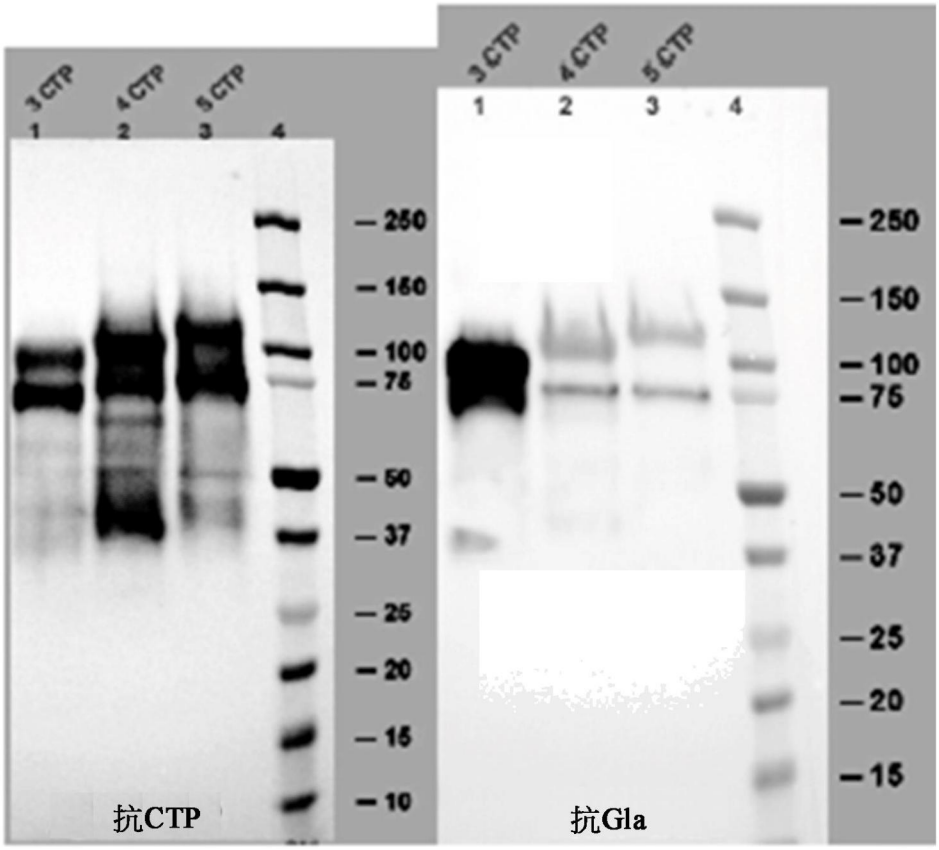
【圖2】


Avonex
9013
9016
9015
9012
9011
Mock
50
37
25

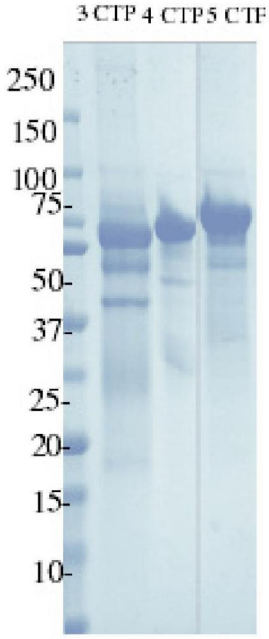
【圖3】


10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
FIX濃度（ng/ml）
0
10
20
30
40
50
60
小時
經純化的FIX-CTP-CTP
rhFIX
FIX-CTP-CTP收集物
FIX-CTP收集物

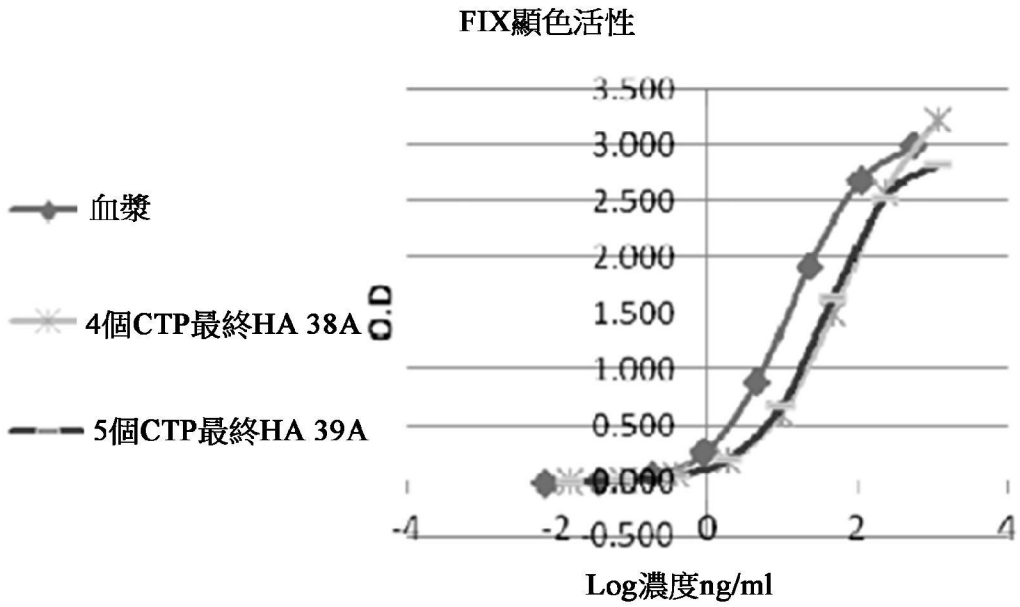
【圖4】


3 CTP
4 CTP
5 CTP
1
2
3
4
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
抗CTP
抗Gla

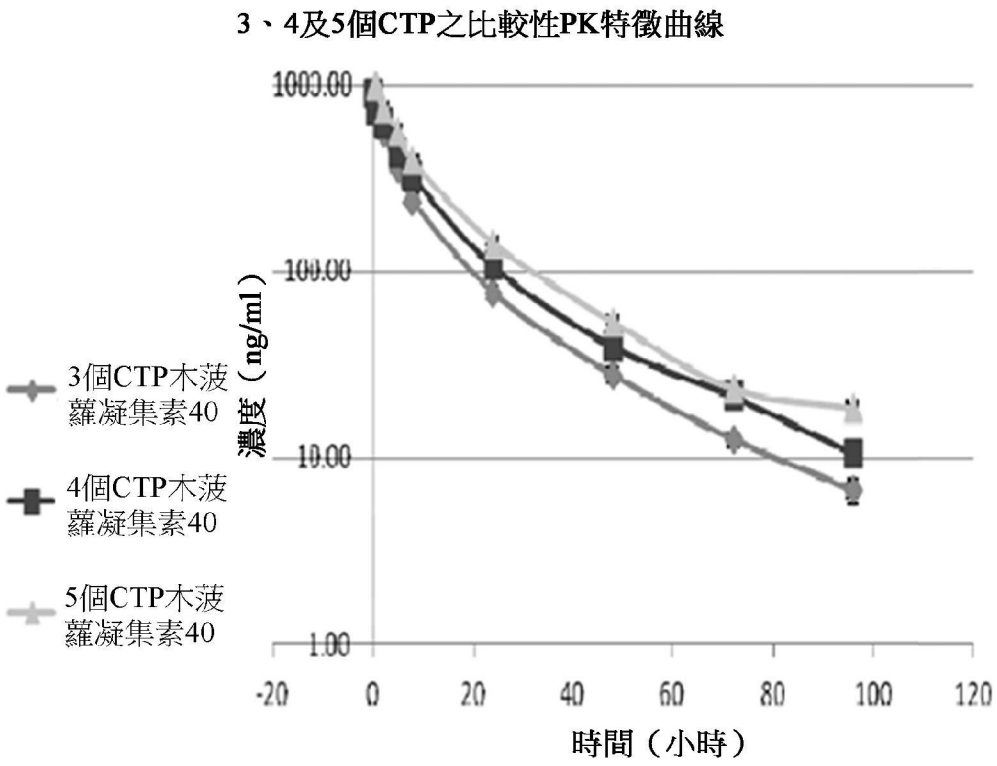
【圖5】


3 CTP 4 CTP 5 CTP
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10

【圖6】


FIX顯色活性
血漿
4個CTP最終HA 38A
5個CTP最終HA 39A
O.D
3.500
3.000
2.500
2.000
1.500
1.000
0.500
0.000
-0.500
-4
-2
0
2
4
Log濃度ng/ml

【圖7】


3、4及5個CTP之比較性PK特徵曲線
3個CTP木菠蘿凝集素40
4個CTP木菠蘿凝集素40
5個CTP木菠蘿凝集素40
濃度（ng/ml）
1000.00
100.00
10.00
1.00
-20
0
20
40
60
80
100
120
時間（小時）

【圖8】



【圖9A】



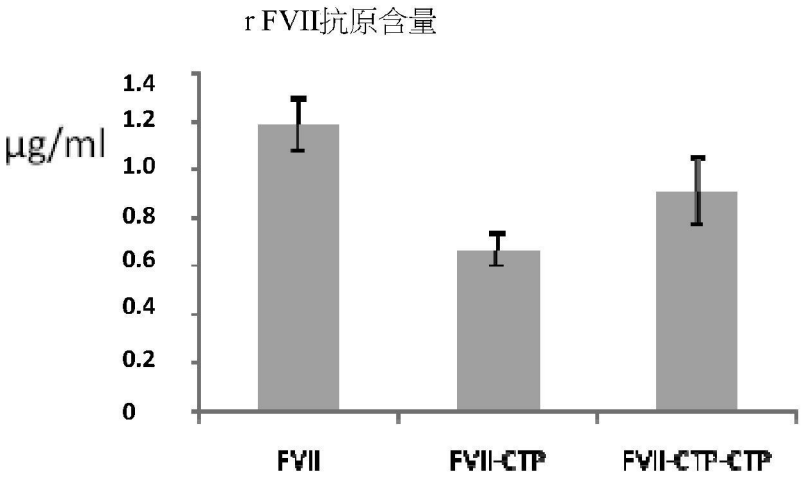
【圖9B】



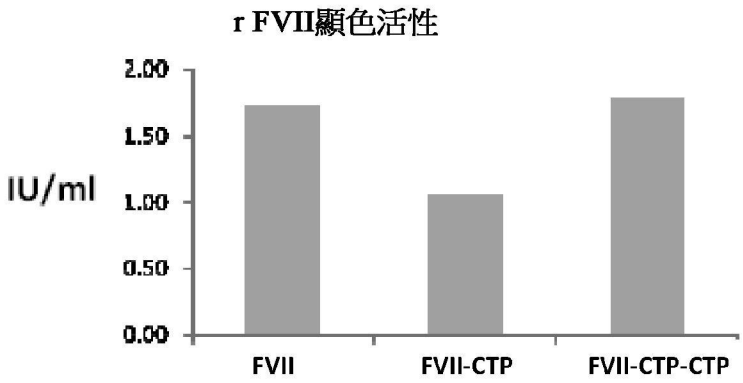
【圖9C】



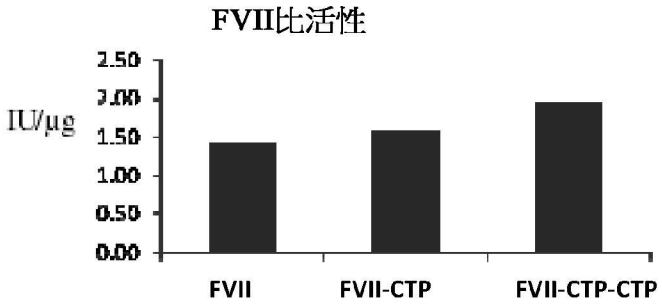
【圖9D】



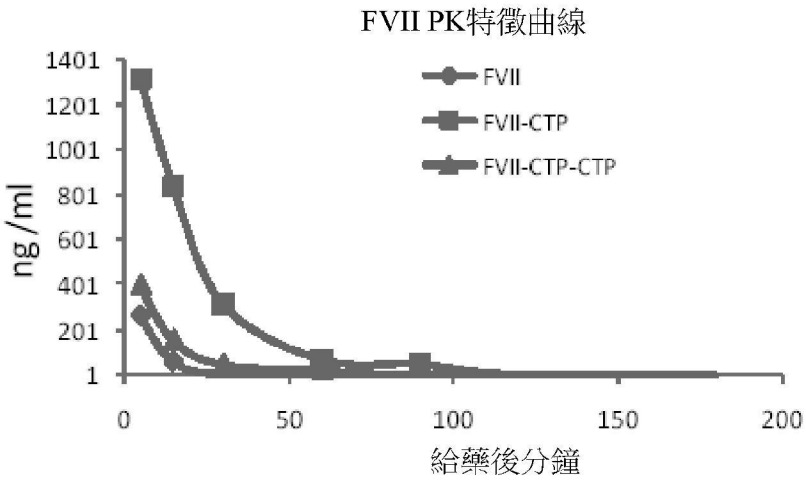
【圖10A】



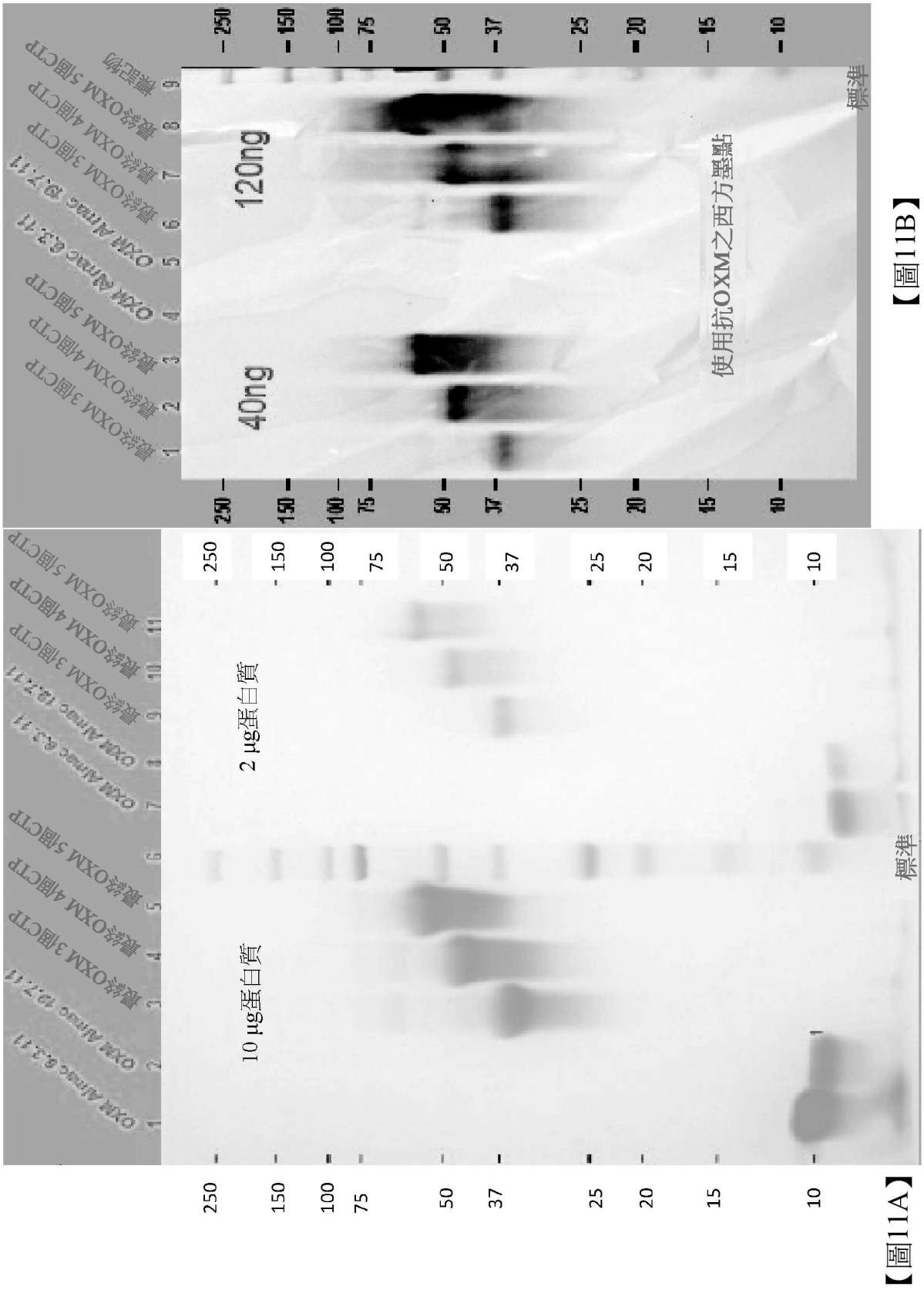
【圖10B】



【圖10C】

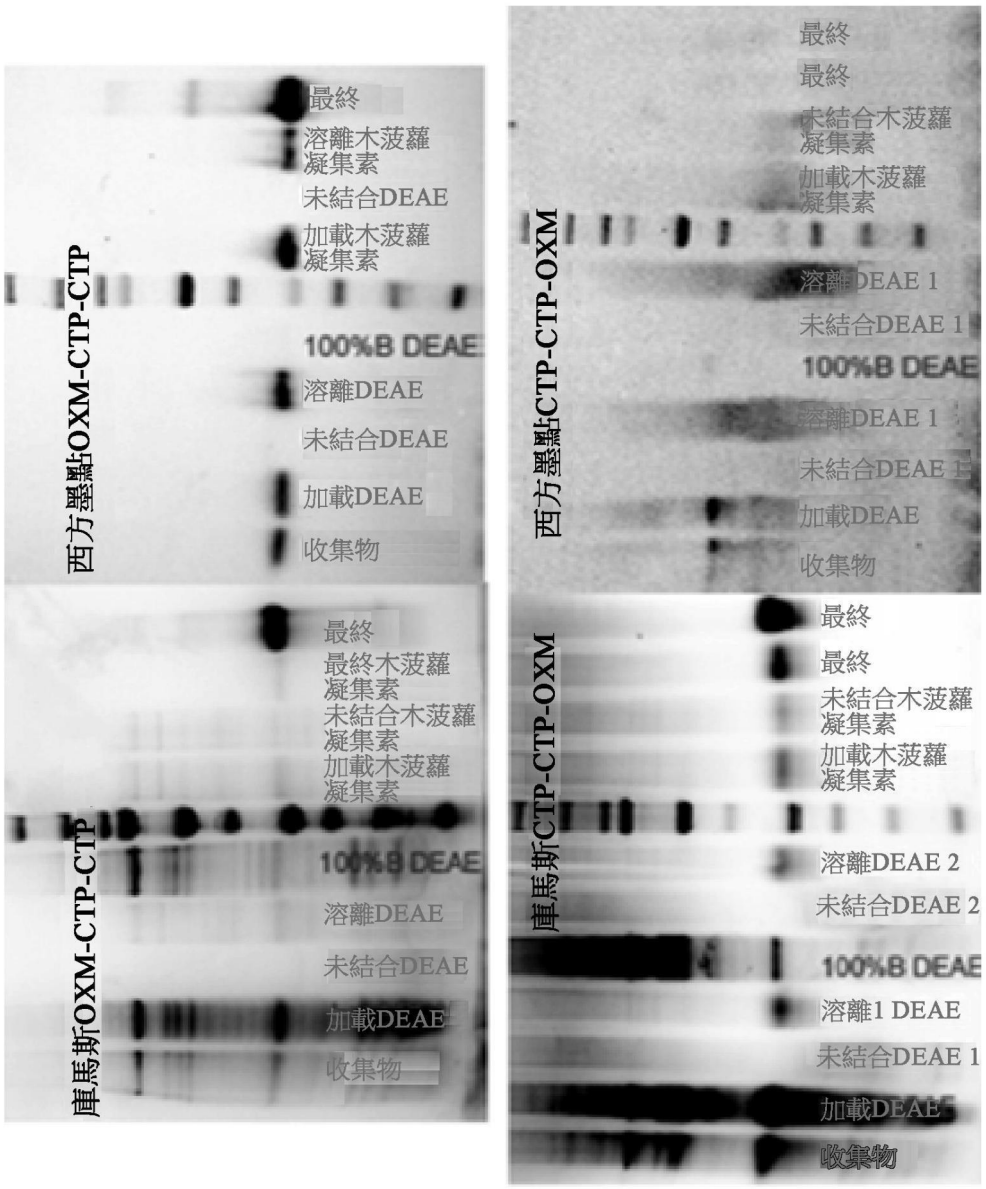


【圖10D】

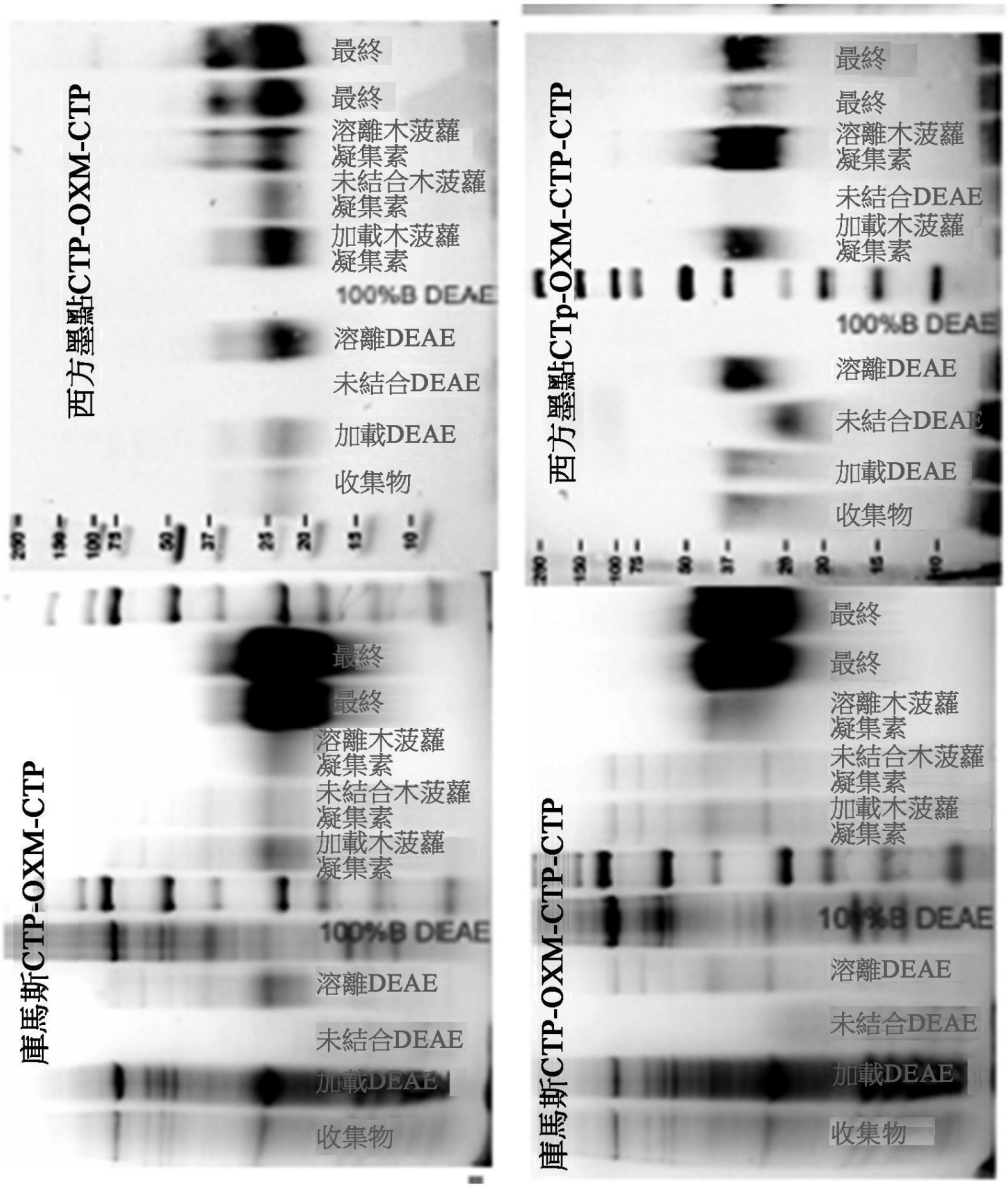

10 μg蛋白質
2 μg蛋白質
標準
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
40ng
120ng
使用抗OXM之西方墨點
聚錄OXM 3個CTP
聚錄OXM 4個CTP
聚錄OXM 5個CTP
OXM Alnac 2,3,11
聚錄OXM 3個CTP
聚錄OXM 4個CTP
聚錄OXM 5個CTP
標準

【圖11A】

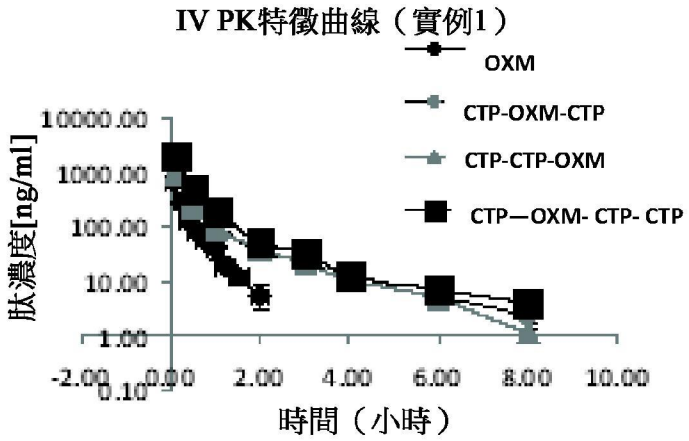
【圖11B】

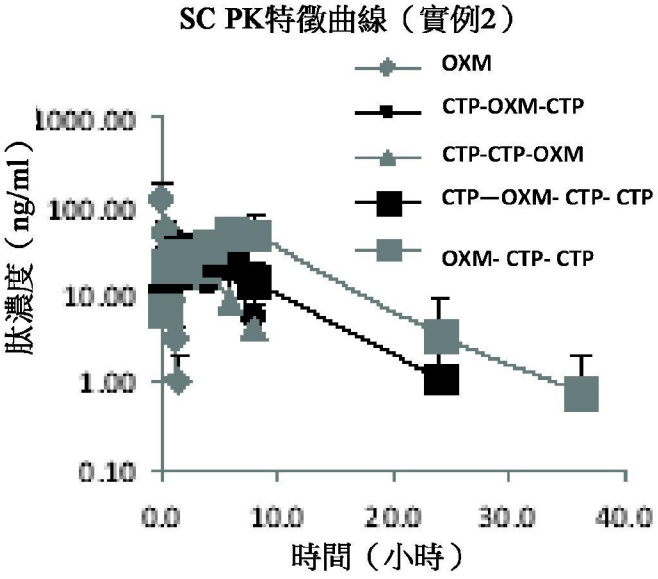

西方墨點OXM-CTP-CTP
最終
溶離木菠蘿凝集素
未結合DEAE
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物
庫馬斯OXM-CTP-CTP
最終
最終木菠蘿凝集素
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物
西方墨點CTP-CTP-OXM
最終
最終
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
溶離DEAE 1
未結合DEAE 1
100%B DEAE
溶離DEAE 1
未結合DEAE 1
加載DEAE
收集物
庫馬斯CTP-CTP-OXM
最終
最終
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
溶離DEAE 2
未結合DEAE 2
100%B DEAE
溶離1 DEAE
未結合DEAE 1
加載DEAE
收集物

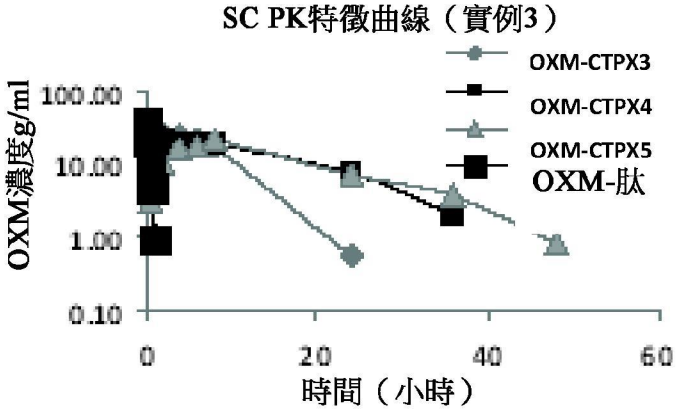
【圖12】


西方墨點CTP-OXM-CTP
最終
最終
溶離木菠蘿凝集素
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物
庫馬斯CTP-OXM-CTP
最終
最終
溶離木菠蘿凝集素
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物
西方墨點CTp-OXM-CTP-CTP
最終
最終
溶離木菠蘿凝集素
未結合DEAE
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物
庫馬斯CTP-OXM-CTP-CTP
最終
最終
溶離木菠蘿凝集素
未結合木菠蘿凝集素
加載木菠蘿凝集素
100%B DEAE
溶離DEAE
未結合DEAE
加載DEAE
收集物

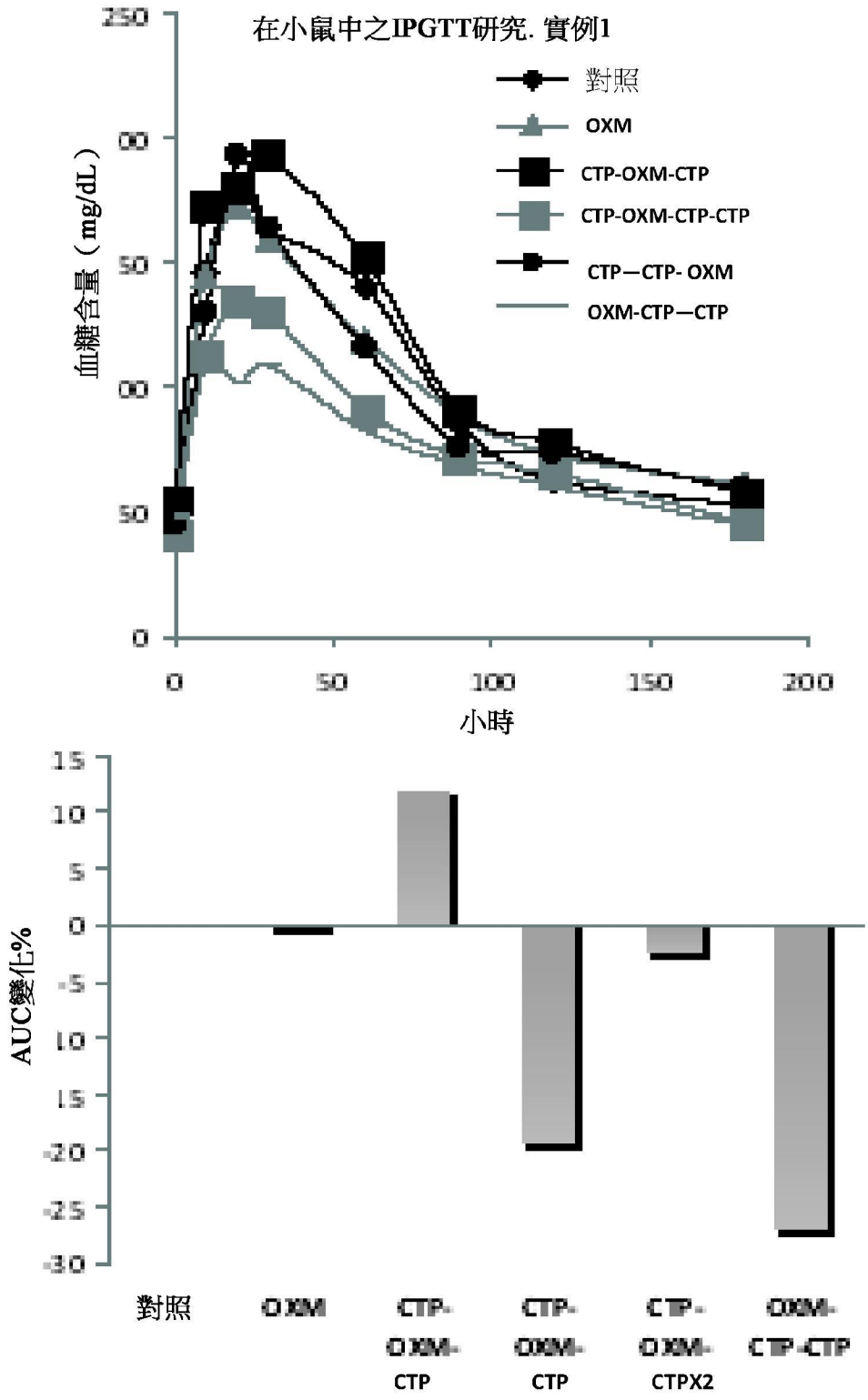
【圖12】續


IV PK特徵曲線（實例1）
OXM
CTP-OXM-CTP
CTP-CTP-OXM
CTP—OXM- CTP- CTP
肽濃度[ng/ml]
10000.00
1000.00
100.00
10.00
1.00
0.10
-2.00
0.00
2.00
4.00
6.00
8.00
10.00
時間（小時）

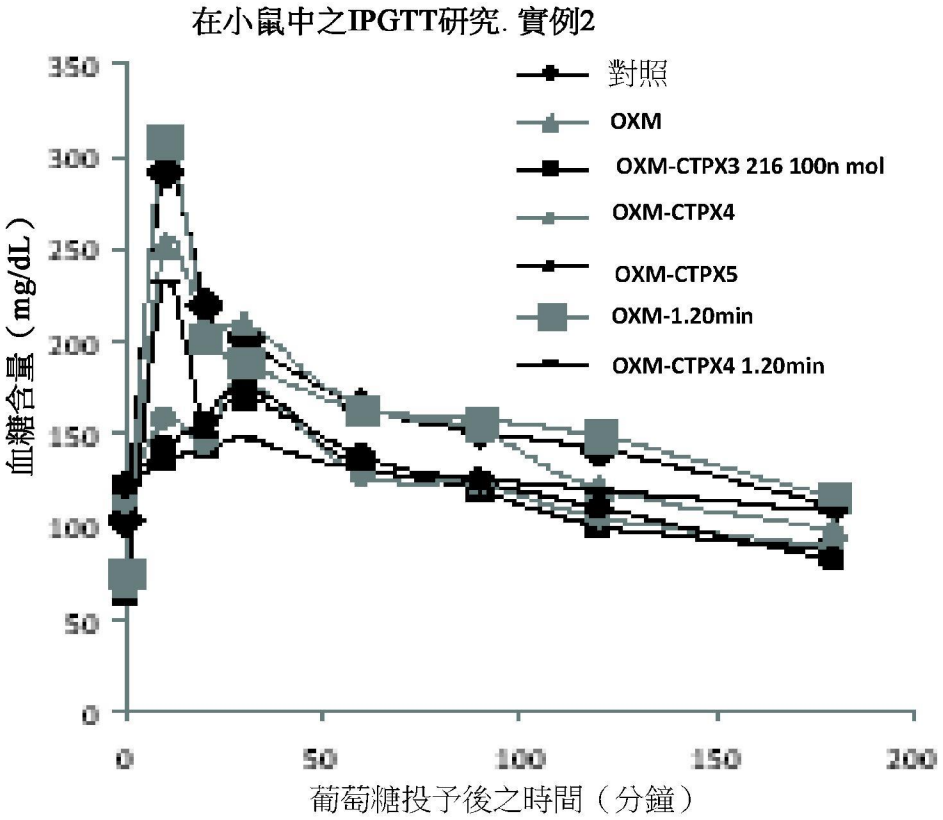

SC PK特徵曲線（實例2）
OXM
CTP-OXM-CTP
CTP-CTP-OXM
CTP—OXM- CTP- CTP
OXM- CTP- CTP
肽濃度（ng/ml）
1000.00
100.00
10.00
1.00
0.10
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
時間（小時）

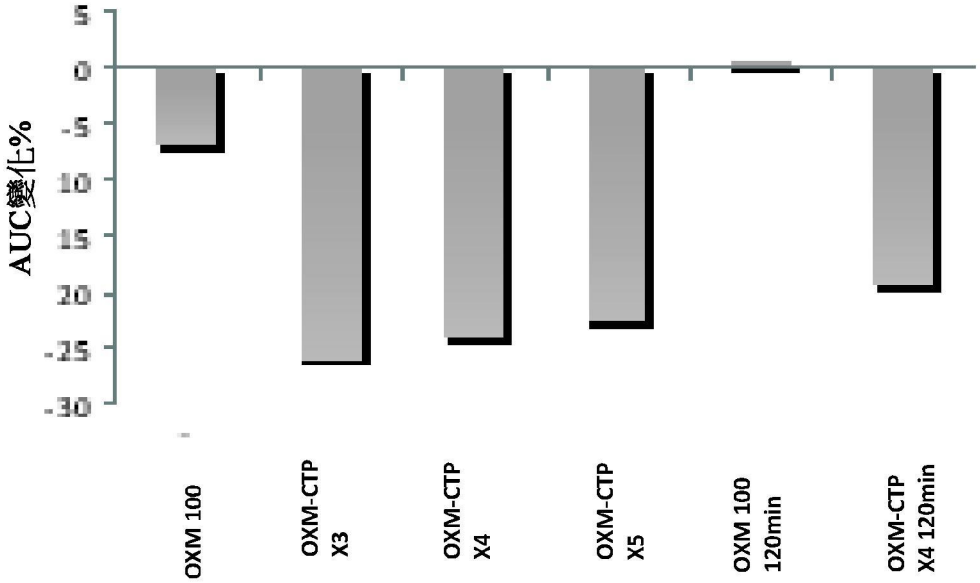

SC PK特徵曲線（實例3）
OXM-CTPX3
OXM-CTPX4
OXM-CTPX5
OXM-肽
OXM濃度g/ml
100.00
10.00
1.00
0.10
0
20
40
60
時間（小時）

【圖13】

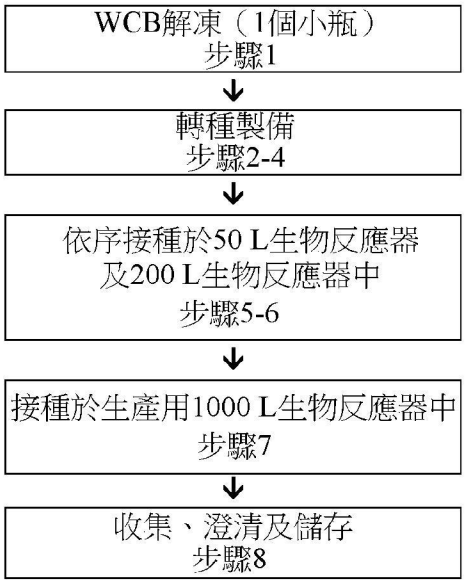

在小鼠中之IPGTT研究. 實例1
血糖含量（mg/dL）
小時
對照
OXM
CTP-OXM-CTP
CTP-OXM-CTP-CTP
CTP—CTP- OXM
OXM-CTP—CTP
AUC變化%
對照
OXM
CTP-OXM-CTP
CTP-OXM-CTP
CTP-OXM-CTPX2
OXM-CTP-CTP

【圖14】

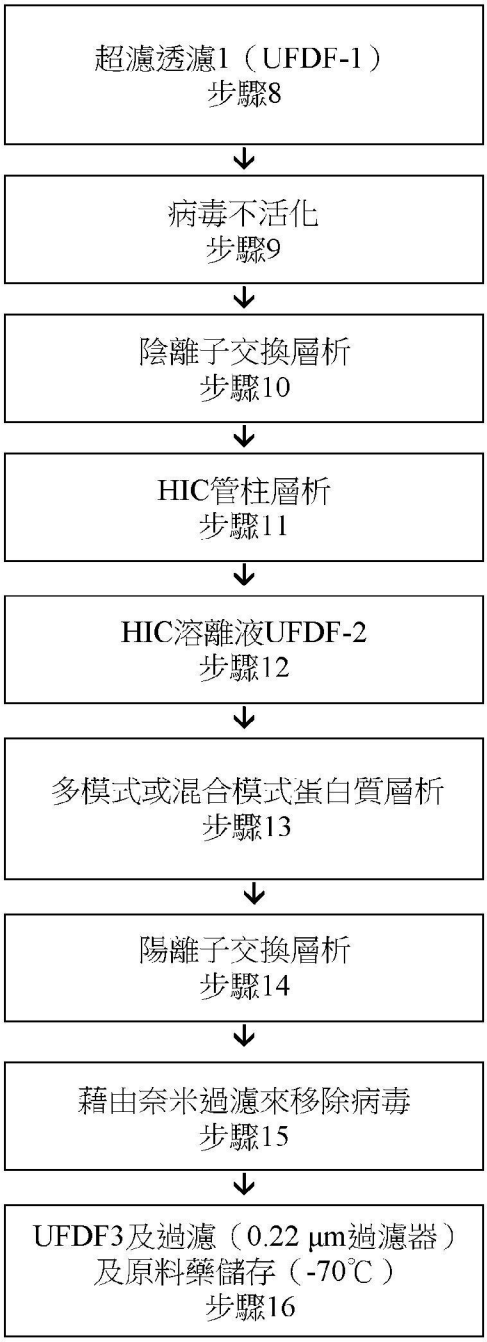

在小鼠中之IPGTT研究. 實例2
血糖含量（mg/dL）
葡萄糖投予後之時間（分鐘）
對照
OXM
OXM-CTPX3 216 100n mol
OXM-CTPX4
OXM-CTPX5
OXM-1.20min
OXM-CTPX4 1.20min
350
300
250
200
150
100
50
0
0
50
100
150
200


AUC變化%
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
OXM 100
OXM-CTP X3
OXM-CTP X4
OXM-CTP X5
OXM 100 120min
OXM-CTP X4 120min

【圖14】續


WCB解凍（1個小瓶）
步驟1
轉種製備
步驟2-4
依序接種於50 L生物反應器
及200 L生物反應器中
步驟5-6
接種於生產用1000 L生物反應器中
步驟7
收集、澄清及儲存
步驟8

【圖15】


超濾透濾1（UFDF-1）
步驟8
病毒不活化
步驟9
陰離子交換層析
步驟10
HIC管柱層析
步驟11
HIC溶離液UFDF-2
步驟12
多模式或混合模式蛋白質層析
步驟13
陽離子交換層析
步驟14
藉由奈米過濾來移除病毒
步驟15
UFDF3及過濾（0.22 μm過濾器）
及原料藥儲存（-70℃）
步驟16

【圖16】