



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102770450 B

(45) 授权公告日 2015. 12. 02

(21) 申请号 201180009864. 4

1-36、说明书第 6、22 页。

(22) 申请日 2011. 02. 10

WO 2008077616 A1, 2008. 07. 03, 权利要求

1-36、说明书第 6、22 页。

(30) 优先权数据

CN 101379077 A, 2009. 03. 04, 全文。

10153715. 7 2010. 02. 16 EP

61/306177 2010. 02. 19 US

Jennifer A Dumon et al. Factor VIII-Fc Fusion Protein Shows Extended Half-Life and Hemostatic Activity in Hemophilia A Dogs.

《BLOOD》. 2009, 第 114 卷 (第 22 期), 第 228 页。

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2012. 08. 16

(86) PCT 国际申请的申请数据

审查员 赵天

PCT/EP2011/051959 2011. 02. 10

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02011/101284 EN 2011. 08. 25

(73) 专利权人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 G. 博尔特 K. 克杰加尔德

P. L. 诺尔比

(74) 专利代理机构 中国专利代理 (香港) 有限公

司 72001

代理人 孔青 林森

(51) Int. Cl.

C07K 14/755(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2008077616 A1, 2008. 07. 03, 权利要求

权利要求书1页 说明书32页

序列表59页

(54) 发明名称

因子 VIII 融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及经修饰的凝血因子。具体地讲, 本发明涉及缀合的因子 VIII 分子, 所述因子 VIII 分子与诸如抗体结合蛋白或 Fc 结构域等多肽融合。

1. 一种与融合配偶体融合的 FVIII 分子, 其中所述融合配偶体全部或部分置换因子 VIII 分子的 a3 区, 所述 FVIII 分子序列如 SEQ ID NO:1 所示, 其中, 当融合配体部分置换 a3 区域时, 所述因子 VIII 分子在跨越 SEQ ID NO:1 的氨基酸 1670-1684 的区域内仅包含突变 Y1680F 或 Y1680C, 且其中所述突变调节 FVIII 分子与 vWF 的亲合力。

2. 权利要求 1 的分子, 其中所述融合配偶体是白蛋白。

3. 权利要求 2 的分子, 其中所述分子与侧基缀合。

4. 权利要求 1 的分子, 其中所述因子 VIII 分子与 Fc 受体融合。

5. 权利要求 4 的分子, 其中所述 Fc 受体是 Fc γ RI。

6. 权利要求 1-5 中任一项的分子, 其中所述因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。

7. 权利要求 1-5 中任一项的分子, 其中所述 FVIII 融合蛋白与侧基缀合。

8. 权利要求 7 的分子, 其中所述侧基选自以下列出的一种或多种: 亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。

9. 权利要求 1-8 中任一项的分子的制备方法, 其中所述方法包括在合适条件下温育包含编码所述分子的核酸序列的宿主细胞。

10. 权利要求 1-8 中任一项的分子在制备用于治疗血友病的药物中的用途。

11. 一种包含权利要求 1-8 中任一项的分子的药物组合物。

因子 VIII 融合蛋白

发明领域

[0001] 本发明涉及经修饰的凝血因子。特别是,本发明涉及与非同源多肽融合的因子 VIII 分子,所述多肽例如抗体结合多肽,例如 Fc 受体或 Fc 结构域。本发明还涉及所述分子的用途以及所述分子的生产方法。

[0002] 发明背景

[0003] A 型血友病是由凝血因子 VIII (FVIII) 活性缺乏或功能障碍所致的一种遗传性出血性疾病。临床表现不在于最初的止血,即血块的形成正常发生,但血块因缺乏相继的凝血酶形成而不稳定。该病通过静脉内注射从血液中分离的或重组产生的凝血因子 FVIII 而得以治疗。

[0004] 目前的治疗推荐由传统的按需治疗向预防转变。与冯维勒布兰德因子 (von Willebrandt Factor) 结合的内源 FVIII 的循环半衰期是 12-14 小时,因此预防性治疗应一周进行数次,以使患者获得几乎无症状的生活。IV 给予对于许多人,尤其是儿童和年轻人而言伴随明显的不便和 / 或痛苦。

[0005] 在具有显著延长的循环半衰期的因子 VIII 变体的开发中已经采用多种方法。很多这类方法都涉及到将因子 VIII 与亲水性聚合物例如 PEG (聚乙二醇) 缀合在一起。

[0006] 因此本领域需要具有因子 VIII 活性的新的因子 VIII 产品,其包括一种或多种以下特征:优选在结构上是同源的,优选为安全的,优选为生物可降解的,并优选具有显著延长的循环半衰期,以减少每周给予因子 VIII 的次数。本领域同样需要用于提供这类分子的相对简单的方法。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明涉及重组因子 VIII 分子,其中所述因子 VIII 分子是融合蛋白。本发明还涉及所述分子的制备方法以及所述分子的用途。所述分子优选具有改良的循环半衰期。

[0009] 发明描述

[0010] 定义

[0011] 融合蛋白:融合蛋白 / 嵌合蛋白,是通过原本编码分开的蛋白质的两种以上基因结合而产生的蛋白质。该融合基因经翻译而得到具有来源于每个原有蛋白质的功能特性的单个多肽。可将本发明的因子 VIII 分子与另一多肽融合。优选地,因子 VIII 融合蛋白将具有比非融合因子 VIII 分子更长的循环半衰期。

[0012] 可将很多种融合配偶体与 FVIII 部分结合起来。这些融合配偶体可通过不同机制改变融合蛋白相对于野生型 FVIII 的性能。

[0013] 推定多种融合配偶体通过与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与 FcRn 相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是免疫球蛋白 Fc 结构域、人血清白蛋白 (hSA) 和转铁蛋白或这些蛋白的组成部分。由与推定通过与 FcRn 相互作用而延迟 FVIII 的多肽结合的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 2。尽管因为 IgG 抗体的相对长的循环半衰期而通常优选 IgG Fc 结构域,但“Fc 融合衍生物”或“Fc 融合蛋白”在本文中意指包括与可来源于任何抗体同种型的 Fc 结构域融合的本发明

FVIII 变体。Fc 结构域还可经修饰以调节某些效应子功能,例如补体结合和 / 或与某些 Fc 受体结合。FVIII 与具有与 FcRn 受体结合的能力的 Fc 结构域的融合,通常将会导致融合蛋白的循环半衰期延长(与 wt FVIII 的半衰期相比)。在 IgG Fc 结构域中 234、235 和 237 位的突变通常将会导致与 Fc γ RI 受体的结合减少,还可能导致与 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIII 受体的结合减少。这些突变不改变与 FcRn 受体的结合,其通过内吞再循环途径而促进了长循环半衰期。优选地,本发明的融合蛋白经修饰的 IgG Fc 结构域包含一个或多个以下突变,所述突变将会分别导致对某些 Fc 受体的亲和力下降(L234A、L235E 和 G237A)以及 C1q-介导的补体结合降低(A330S 和 P331S)。

[0014] 然而,本发明也包含这样的 FVIII 变体:其与例如与新生儿 Fc 受体的结合特性发生改变 Fc 结构域融合。如果例如 Fc 结构域变体具有增加的与例如新生儿 Fc 受体的亲和力,可能融合蛋白的体内循环半衰期将得到进一步延长。据信调节 Fc 结构域与新生儿 Fc 受体的亲和力的人 IgG 中氨基酸置换的实例是 T250Q、M252Y、S254T、T256E、P257I、T307A、Q311I 和 M428L(残基编号按照 EU 索引)。

[0015] 推定其它融合配偶体通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 Fc 受体,例如 Fc γ RI(CD64)或 FcRn 或这些蛋白的组成部分。由与推定通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 3。

[0016] 推定某些融合配偶体通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是低密度脂蛋白受体家族 Fc 受体成员,例如低密度脂蛋白受体相关蛋白或这些蛋白的组成部分,例如重复簇 5(CR5)、6(CR6)和 / 或 7(CR7)。由与推定通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 4。

[0017] 推定其它融合配偶体通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是与血小板表面上的蛋白质例如 GPIIIa 结合的单链(SC)抗体。在 SC 抗体中,源自免疫球蛋白重链的多肽序列可位于源自免疫球蛋白轻链的多肽序列的 N-端。该顺序称为 HC-LC。源自免疫球蛋白重链的多肽序列也可位于源自免疫球蛋白轻链的多肽序列的 C-端。这后一种顺序称为 LC-HC。由与推定通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 5。

[0018] 推定一些融合配偶体通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是单链抗血清白蛋白抗体(SC抗HSA)和白蛋白结合多肽例如 ABD035 多肽。白蛋白结合多肽可重复若干次,例如 4 次重复,正如在 4XABD035 融合配偶体中所示。由与推定通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 6。

[0019] 推定其它融合配偶体通过保护(shielding)而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过保护而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是具有非疏水性氨基酸段例如序列 A(seq A)的多肽或充满弹性蛋白样多肽(ELP)例如 ELP60 的多肽。由与推定通过保护而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 7。

[0020] 推定某些融合配偶体通过调节与 vWF 的亲和力而延迟 FVIII 的体内清除。推定通

过调节与 vWF 的亲合力而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 FVIII 的 a3 区（野生型人 FVIII 的氨基酸 1649-1689）或 a3 区的部分，因此给 FVIII 添加一个或多个额外的 a3 区。由与推定通过调节与 vWF 的亲合力而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 8。

[0021] 推定某些融合配偶体通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是生长激素结合蛋白（GHBP）、凝血因子 IX（FIX）部分、vWF 部分、vWF 结合蛋白、绒毛膜促性腺激素部分和凝血因子 X（FX）部分。源自 FIX 的融合配偶体的非限制性实例是人 FIX 的氨基酸 298-342（FIX298-342）和人 FIX 的氨基酸 47-125（FIX47-125）。源自 vWF 的融合配偶体的非限制性实例是人 vWF 的氨基酸 1-272（vWF1-272）、人 vWF 的氨基酸 1-1390（vWF1-1390）和人 vWF 的氨基酸 497-716（vWF497-716）。源自绒毛膜促性腺激素的融合配偶体的非限制性实例是人绒毛膜促性腺激素 β -链的 C-端 28 个氨基酸（hCG C-端）。源自 FX 的融合配偶体的非限制性实例是人 FX 活化肽（F10AP）。由与推定通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 9。

[0022] 推定某些融合配偶体通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 FVIII 的 C2 结构域，因此给 FVIII 添加一个或多个额外 C2 结构域。由与推定通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 10。

[0023] Fc 受体：Fc 受体是识别和结合抗体的 Fc 部分的细胞表面受体。根据其结构、细胞分布和与 IgG 的亲合力，将 Fc 受体分为 3 类：Fc γ RI（CD64）、Fc γ RII（CD32）和 Fc γ RIII（CD16）。依据本发明，与因子 VIII 分子融合的 Fc 受体可以是全长或部分长度的 Fc 受体、及其任何变体（变体包括氨基酸取代、缺失和添加）。如果它们是部分长度的，则应保留与抗体结合的能力。

[0024] 冯维勒布兰德因子（vWF）：vWF 是存在于血浆中并在内皮（在怀布尔-帕拉德体中）、巨核细胞（血小板 α -颗粒）和内皮下结缔组织中组成性地产生的一种大的单聚/多聚糖蛋白。其主要功能是与其它蛋白、尤其是与因子 VIII 结合，并且它在血细胞粘附于受伤部位中是重要的。

[0025] 因子 VIII 与 vWF 结合的同时在循环中失活；因子 VIII 当未与 vWF 结合时快速降解或被清除。因此由此断定，迄今已认为降低或消除 FVIII 的 vWF 结合能力在获取具有延长循环半衰期的因子 FVIII 变体中是非常不希望的途径。

[0026] 术语“与 vWF 的结合能力降低”在本文中意指包括因子 VIII 变体，其中与 vWF 的结合能力降低至少 50%，优选至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、和最优选约 100%。FVIII 与 vWF 的结合可通过 ELISA 样测定来检测或使用表面等离子共振来测定为与固定化 vWF 的直接结合。在因子 VIII 中负责与 vWF 结合的区域是跨越残基 1670-1684 的区域，其公开于 EP0319315。设想涉及该区域的因子 VIII 点突变和/或缺失突变（deltion mutant）将会改变与 vWF 结合的能力。本发明特别优选的点突变的实例包括包含一个或多个以下点突变的变体：Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0027] 因子 VIII 分子：FVIII/因子 VIII 是由肝细胞产生的一种大而复杂糖蛋白。FVIII 由 2351 个氨基酸组成，包括信号肽，并含有由同源性限定的若干不同结

构域。有 3 个 A 结构域、1 个独特的 B 结构域和 2 个 C 结构域。结构域的顺序可列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII 在血浆内以在 B-A3 边界分开的 2 条链而循环。这两条链通过二价金属离子结合而连接。A1-A2-B 链称为重链 (HC)，而 A3-C1-C2 称为轻链 (LC)。

[0028] 内源因子 VIII 分子在体内作为具有不同大小的 B 结构域的分子库而循环。在体内可能发生的是对 B 结构域的逐步酶切除，产生具有不同大小的 B 结构域的分子库。通常认为在 740 位的切割 (B 结构域的最后部分正是因此而被切除) 的发生与凝血酶激活相关。然而，这并不能排除因子 VIII 变体 (其中例如在 740 位的切割位点已经受损) 可具有活性。

[0029] 本文所用的“因子 VIII”或“FVIII”是指作为内源性凝血途径的成员并对凝血而言至关重要的人血浆糖蛋白。“天然 FVIII”是如 SEQ ID NO. 1 (氨基酸 1-2332) 所示的全长人 FVIII 分子。B 结构域跨越 SEQ ID NO 1 中的氨基酸 741-1648

[0030]

SEQ ID NO 1:

```
ATRRYYLGAVELSWDYMQSOLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT
DHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGA EYDD
QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
VNRS L PGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTP EVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDN SPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYS SFVNMERDLASGLI
GPLLIC YKESVDQRGNOIMSOKRNVILFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFOA
SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTD FL SVFFSGYTFKHKVMYEDTLTLFPF
SGETVFM SMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGOYYEDSYEDISAYLLSKN
NAIEPRSF SQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWF AHRT PMPKIQNVSSDLLMLLRQ
```

[0031]

SPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSLSEMTHTFRPQLHHSGDMVFTPESEGLQL
 RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAAGTONTSSLGPPSPMPVHYDSQLDIT
 LFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHG
 PALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDFEKKVTP
 LIHDMMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPES
 ARWIQORTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVGQNFLEKNKVVVGKGEFTKDVGLKE
 MVFPSSRNLFNLNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLF
 LLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVE
 KYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTL
 TQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSLPLIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFDQDNSSHL
 PAASYRKKDSGVQESSHFLOGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVEN
 TVLPKPDLPKTSQKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNQSPGHLDLVEGSLLGTEGAIKWNEAN
 RPKGVFPLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFAKKKDTILSL
 NACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVLRHQREITRTTLQSDQEEID
 YDDTISVEMKKEDFDIYDEDEENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQS
 GSVPOFKKVVFQFETDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFY
 SSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMHMAPTKDEFDCWAYFSDVDLEKO
 VHSGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME
 DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEE
 YKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI
 RDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFS
 SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNFNPPIIARYIRLHPHTHSIR
 STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAW
 RPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGK
 VKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0032] 本发明的因子 VIII 分子可以是 B 结构域截短的因子 FVIII 分子,其中剩余结构域基本对应于 SEQ ID NO 1 中氨基酸编号 1-740 和 1649-2332 所示序列,尽管在残基 1670-1684 之间的 vWF 结合区内可能也有例如一个或多个改变。然而,本发明的 B 结构域截短的分子可与 SEQ ID NO 1 所示序列具有微小差异,意即剩余结构域(即 3 个 A 结构域和 2 个 C 结构域)与 SEQ ID NO 1 所示氨基酸序列(氨基酸 1-740 和 1649-2332)可具有微小差异,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸差异或约 1%、2%、3%、4% 或 5% 差异,这是因为可引入突变以降低例如 vWF 结合能力这一事实。此外,可能在分子的其它位置导入氨基酸修饰(取代、缺失等),以改变因子 VIII 与多种其它组分(例如 LRP、多种受体、其它凝血因子、细胞表面)的结合能力,引入和/或消除糖基化位点等。

[0033] 本发明的因子 VIII 分子具有因子 VIII 活性,意即以下能力:在凝血级联中以与 FVIII 功能类似或等同的方式起作用,通过与被激活的血小板上的 FIXa 相互作用而诱导 FXa 的形成,并支持血块的形成。该活性可通过本领域熟知的技术在体外评估,所述技术为例如凝血分析、内源凝血酶潜在性分析等。本发明的因子 VIII 分子具有 FVIII 活性,其为天然人 FVIII 活性的至少约 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、和 100% 或甚至超过 100%。

[0034] B结构域：因子 VIII 中的 B 结构域跨越 SEQ ID NO 1 的氨基酸 741-1648。B 结构域在若干不同位点被切割，在循环血浆 FVIII 分子中产生大的异质性。高度糖基化的 B 结构域的准确功能尚未知晓。已经知道的是该结构域对于凝血级联中的 FVIII 活性而言并非必要。这种明显的功能缺乏得到以下事实支持：B 结构域缺失的 / 截短的 FVIII 看来具有与在全长天然 FVIII 中所见的相同的体内性能。话虽如此，据显示 B 结构域可减少与细胞膜的缔合，至少在无血清条件下是如此。

[0035] B结构域截短的 / 缺失的因子 VIII 分子：将内源全长 FVIII 合成为单链前体分子。分泌之前，将前体切割成重链和轻链。可由 2 种不同策略产生重组 B 结构域缺失的 FVIII。将无 B 结构域的重链以及轻链分别合成为两种不同多肽链（两链策略）或者将 B 结构域缺失的 FVIII 合成为单条前体多肽链（单链策略），其按照与全长 FVIII 前体相同的方式切割为重链和轻链。

[0036] 在 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽中，重链和轻链部分通常被接头间隔开来。为了尽量减小在 B 结构域缺失的 FVIII 中引入免疫原性表位的风险，接头序列优选源自 FVIII B 结构域。至少，接头必须包含蛋白酶识别位点，所述酶将 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽分离为重链和轻链。在全长 FVIII 的 B 结构域中，氨基酸 1644-1648 构成该识别位点。在 B 结构域缺失的 FVIII 激活时导致接头去除的凝血酶位点位于重链上。因此，接头的大小和氨基酸序列不大可能影响其经由凝血酶激活而从剩余 FVIII 分子上切除。B 结构域的缺失对于 FVIII 的产生是有利的。然而，B 结构域的部分可包括在接头中而不降低产率。B 结构域对产率的负面效应并不归因于 B 结构域的任何特定尺寸或序列。

[0037] 截短的 B 结构域可含有若干 O- 糖基化位点。然而，依据一个优选的实施方案，所述分子在截短的 B 结构域中包含仅 1 个、备选 2、3 或 4 个 O 联寡糖。

[0038] 依据一个优选的实施方案，截短的 B 结构域包含仅 1 个可能的 O- 糖基化位点并且侧链例如 PEG 或白蛋白结合剂与该 O- 糖基化位点共价缀合。

[0039] 可将在本发明的 B 结构域截短的分子中的 O 联寡糖连接到 O- 糖基化位点，所述位点通过重组方式和 / 或通过经由 B 结构域截短而将“隐藏的”O- 糖基化位点暴露而人工产生。在这两种情况下，可通过设计 B 结构域截短的因子 VIII 的氨基酸序列并随后对所述氨基酸序列进行计算机 (*in silico*) 分析，预测截短的 B 结构域中 O- 糖基化位点的概率，从而制备所述分子。可在合适宿主细胞中合成有相对高概率具有所述糖基化位点的分子，然后分析糖基化模式并随后选择在截短的 B 结构域中具有 O 联糖基化的分子。

[0040] 所述因子 VIII 分子也含有大量 N 联寡糖并且它们每个都可同样作为用于连接疏水性侧基的锚。

[0041] 用于产生本发明的重组因子 VIII 融合蛋白的合适宿主细胞优选是哺乳动物来源的，以确保所述分子被糖基化。在实施本发明时，所述细胞是哺乳动物细胞，更优选已确立的哺乳动物细胞系，包括但不限于 CHO、COS-1、幼仓鼠肾 (BHK) 和 HEK293 细胞系。其它合适的细胞系包括但不限于大鼠 Hep I、大鼠 Hep II、TCMK、人肺、DUKX 细胞 (CHO 细胞系)。还可使用的是 3T3 细胞、Namalwa 细胞、骨髓瘤和骨髓瘤与其它细胞的融合物。在某些实施方案中，所述细胞可以是突变的或重组的细胞，例如与其所来源的细胞类型相比表达在质量或数量上不同的酶谱的细胞，所述酶催化蛋白质的翻译后修饰（例如糖基化酶例如糖基转移酶和 / 或糖苷酶，或加工酶例如前肽）。DUKX 细胞 (CHO 细胞系) 是特别优选的。

[0042] 目前优选的细胞是 HEK293、COS、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 和骨髓瘤细胞, 尤其是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0043] 在 wt FVIII 分子中 B 结构域的长度为约 908 个氨基酸。在本发明分子中截短的 B 结构域的长度可在约 10- 约 800 个氨基酸的范围内变化, 例如约 10 个氨基酸 - 约 700 个氨基酸, 例如约 12-500 个氨基酸、12-400 个氨基酸、12-300 个氨基酸、12-200 个氨基酸、15-100 个氨基酸、15-75 个氨基酸、15-50 个氨基酸、15-45 个氨基酸、20-45 个氨基酸、20-40 个氨基酸、或 20-30 个氨基酸。所述截短的 B 结构域可包含重链和 / 或轻链的片段和 / 或 wt FVIII 分子中不存在的人工导入序列。术语“B 结构域截短的”和“B 结构域缺失的”在本文中可互换使用。

[0044] 改良的循环半衰期: 与野生型因子 VIII 分子相比, 本发明的分子具有改变的循环半衰期, 优选增加的循环半衰期。循环半衰期优选增加至少 10%, 优选至少 15%, 优选至少 20%, 优选至少 25%, 优选至少 30%, 优选至少 35%, 优选至少 40%, 优选至少 45%, 优选至少 50%, 优选至少 55%, 优选至少 60%, 优选至少 65%, 优选至少 70%, 优选至少 75%, 优选至少 80%, 优选至少 85%, 优选至少 90%, 优选至少 95%, 优选至少 100%, 更优选至少 125%, 更优选至少 150%, 更优选至少 175%, 更优选至少 200%, 和最优选至少 250% 或 300%。甚至更优选地, 所述分子具有的循环半衰期增加至少 400%, 500%, 600%, 或甚至 700%。

[0045] 亲水性聚合物: 本发明的侧基优选是非天然存在的亲水性聚合物, 其包含至少一个非天然存在的聚合部分。在另一实例中, 非天然存在的修饰基团是经修饰的碳水化合物。

[0046] 示例性的本发明亲水性聚合物包括水溶性聚合物, 其可以是直链或支链并且可包含一个或多个独立选择的聚合部分, 例如聚(亚烷基二醇)及其衍生物。本发明的聚合修饰基团可包括水溶性聚合物, 例如聚(乙二醇)及其衍生物(PEG, m-PEG)、聚(丙二醇)及其衍生物(PPG, m-PPG)等。

[0047] 本发明水溶性聚合物的聚合物主链可以是聚(乙二醇)(即 PEG)。本发明相关的术语 PEG 包括任何形式的聚(乙二醇), 包括烷氧基 PEG、双功能 PEG、多臂 PEG、分叉 PEG、分支 PEG、垂悬 PEG (即具有挂在聚合物主链上的一个或多个官能团的 PEG 或相关聚合物)、或其中具有可降解键的 PEG。

[0048] 聚合物主链可以是直链或支链的。支链聚合物主链是本领域公知的。通常, 支链聚合物具有中央分支核心部分和与该中央分支核心连接的多个直链聚合物链。常使用支链形式的 PEG, 其可通过将氧化乙烯加成到不同多元醇例如甘油、季戊四醇和山梨醇中而制备。中央分支部分也可源自若干氨基酸, 例如赖氨酸或半胱氨酸。在一个实例中, 支链聚(乙二醇)可以通式表示为 $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$, 其中 R 代表核心部分, 例如甘油或季戊四醇, m 代表臂的数目。多臂 PEG 分子, 例如美国专利号 5, 932, 462 (其通过引用全部结合到本文中) 中描述的那些, 也可用作聚合物主链。

[0049] 许多其它聚合物也适合本发明。非肽和水溶性的聚合物主链特别可用于本发明。合适聚合物的实例包括但不限于其它聚(亚烷基二醇)、例如聚(丙二醇) (“PPG”)、乙二醇和丙二醇等的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇(olefinic alcohol))、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(羟丙基甲基丙烯酰胺)、聚([α]-羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚磷腈、聚噁唑啉、聚(N-丙烯酰吗啉)(例如美国专利号 5, 629, 384 (其通过引用全部结合到本文中) 中描述的), 及其共聚物、三元共聚物和混合物。

[0050] 尽管所述聚合物主链每条链的分子量可变化,但典型的范围为约 100 Da- 约 160,000 Da,例如约 5,000 Da- 约 100,000 Da。更具体地讲,每种本发明缀合的亲水性聚合物的大小可在以下范围内变化:约 500 Da- 约 80,000 Da,例如约 1000 Da- 约 80,000 Da;约 2000 Da- 约 70,000 Da;约 5000- 约 70,000 Da;约 5000- 约 60,000 Da;约 10,000- 约 70,000 Da;约 20,000- 约 60,000 Da;约 30,000- 约 60,000 Da;约 30,000- 约 50,000 Da;或约 30,000- 约 40,000 Da。应当知道,这些大小代表估计值,而并非准确测量值。依据一个优选的实施方案,将本发明的分子与亲水性聚合物的异质群体缀合,所述聚合物为例如大小如下的 PEG:例如 10,000、40,000 或 80,000 Da +/- 约 5000、约 4000、约 3000、约 2000 或约 1000 Da。

[0051] 侧链/侧基:也可将本发明的因子 VIII 分子与并非亲水性聚合物的侧基缀合。本发明的侧链可以例如选自以下列出的一种或多种:脂肪酸及其衍生物(有时也称为“白蛋白结合剂”)、肽等。本发明的疏水性侧基优选是生物可降解的。此外,可有不只一个疏水性侧基与单个因子 VIII 分子缀合,例如有 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个。此外由此得出还可将本发明的因子 VIII 分子与一个或多个疏水性侧基以及一个或多个疏水性侧基、肽侧基等缀合。

[0052] 因此,单个本发明的因子 VIII 分子可包含侧基,例如亲水性和疏水性/肽类侧基。然而,将该分子与不同类型侧基缀合伴随着另外的努力,因此这种解决方案可变得在实践中相对不实用。本发明的分子因此优选仅包含 1 种侧链(例如亲水性侧链/疏水性侧链)。

[0053] 然而,迄今为止,并不认为因子 VIII 同疏水性侧基的缀合是同亲水性基团的缀合的具有吸引力的备选。一种解释可能是预期到需要采用使用有机溶剂的费力和/或苛刻的化学方法。另一种解释可能是预期通常相对小的疏水性分子不能有效地将缀合的(大)因子 VIII 分子与例如白蛋白结合并因此可能保护分子免于清除。

[0054] 白蛋白结合剂缀合物

[0055] 已知可通过使用白蛋白结合侧链来改善这种蛋白质的体内性能。这种侧链或白蛋白结合剂可在给予之前连接到所述蛋白质上并且例如可以在体内稳定所述蛋白质或改进或延长所述蛋白质的体内半衰期。

[0056] 因此白蛋白结合剂可促进衍生物在血流中循环。白蛋白结合剂可具有延长或延迟与之结合的蛋白质的作用时间的效果,这是因为以下事实:肽衍生物和白蛋白的复合物仅缓慢崩解以释放活性药物成分。因此,优选的取代基或侧链作为整体可称为白蛋白结合部分。

[0057] 白蛋白结合剂(白蛋白结合部分)可包含与白蛋白结合以及因此在血流中循环的延长特别相关的部分,所述部分因此可称为延长部分。延长部分优选位于白蛋白结合部分相比于其与肽的连接点的相反一端或附近。

[0058] 在一个优选的实施方案中,白蛋白结合剂是或包含能够与白蛋白形成非共价复合物的侧链。白蛋白结合剂可与白蛋白非共价结合和/或可逆结合。白蛋白结合剂可与白蛋白特异性结合。根据下述方法可以清楚的是,白蛋白结合剂可结合到环糊精。白蛋白结合剂可与环糊精非共价结合和/或可逆结合。白蛋白结合剂可与环糊精特异性结合。

[0059] 本文所述的白蛋白结合剂通常是疏水性基团。

[0060] 白蛋白结合部分的其它部分,即介于延长部分和与肽的连接点之间的部分,可称

为接头部分、接头、间隔物等。然而,这类接头的存在是任选的,因此白蛋白结合部分可与延长部分相同。

[0061] 在特别的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分是亲脂的,和/或在生理 pH (7.4) 下带负电荷。

[0062] 白蛋白结合部分和/或延长部分可通过缀合化学例如烷基化、酰化或形成酰胺而与肽的氨基共价连接;或通过例如酯化、烷基化、腈化而与羟基共价连接。

[0063] 在一个优选的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分的活性酯在形成酰胺键的条件下与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基共价连接(该过程称为酰化)。

[0064] 除非另有说明,否则当谈及蛋白质酰化时,应当理解为氨基与糖蛋白上的唾液酸残基连接。

[0065] 对于本发明的目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”包括这些分子的未反应形式以及反应形式。是否意指一种形式或其它形式,根据其中使用术语的上下文是清楚的。

[0066] 白蛋白结合部分可以是或可包括脂肪酸或脂肪二酸或其衍生物或其任一种。

[0067] 术语“脂肪酸”是指具有 4-28 个碳原子、例如 16 个碳原子的脂族一羧酸。其优选是无支链的,和/或偶数个的,并且它可以是饱和或不饱和的。

[0068] 术语“脂肪二酸”是指如上定义的、但在 ω 位置上具有额外羧酸基团的脂肪酸。因此,脂肪二酸是二羧酸。

[0069] 命名按照本领域常用的命名,例如 $-\text{COOH}$ 以及 $\text{HOOC}-$, 是指羧基; $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 是亚苯基; $-\text{CO}-$ 以及 $-\text{OC}-$, 是指羰基 ($\text{O}=\text{C}<$); 和 $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-$ 是指苯氧基。

[0070] 在一个优选的实施方案中,所述接头部分,如果存在的话,具有 2-80 个 C 原子、优选 5-70 个 C 原子。在额外优选的实施方案中,所述接头部分,如果存在的话,具有 4-20 个杂原子,优选 2-40 个杂原子,更优选 3-30 个杂原子。杂原子的特别优选的实例是 N 原子和 O 原子。H 原子不是杂原子。

[0071] 在另一个实施方案中,所述接头包含至少一个 OEG 分子、和/或至少一个谷氨酸残基,或相应的基团(OEG 是指 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即以下基团: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$)。

[0072] 在一个优选的实施方案中,所述接头部分包含通过酰胺键与唾液酸残基连接的二羧基残基。在优选的实例中,所述二羧基残基具有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。在另外的优选实例中,所述二羧基残基具有 0-10 个杂原子,优选 0-5 个杂原子。

[0073] 在另一个优选的实例中,所述接头部分包含同时含有氨基和远端羧基的基团,所述基团通过其远端羧基经由酰胺键与唾液酸残基连接。在一个优选的实施方案中,该基团是 OEG 基团。

[0074] 氨基酸谷氨酸(Glu)包含 2 个羧酸基团。其 γ -羧基优选用于与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基、或与 OEG 分子的氨基(如果有的话)、或与另一 Glu 残基的氨基(如果有的话)形成酰胺键。Glu 的氨基进而与延长部分的羧基、或与 OEG 分子的羧基(如果有的话)、或与另一 Glu 的 γ -羧基(如果有的话)形成酰胺键。这种包含 Glu 的方式偶尔简称为“ γ -Glu”。

[0075] 不受理论的束缚,设想之所以将疏水性侧基与具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接,而不是将这类侧基与具有正常 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接可能有利的原因在于:侧基的相对大小在大的因子 VIII/vWF 复合物中是相对小的。假定相对大的侧基在保护游离因子 VIII 不被清除中起更有效的作用。还假定 FVIII 的半衰期与 vWF 的相关。与 vWF 结合能力降低的 FVIII 分子最有可能具有暴露的清除表位,所述清除表位通常已被 vWF 保护。因而假定通过连接侧基,该“清除保护”可被恢复。在其它情况下,侧基例如抗体片段的连接可通过例如将所述分子与具有相对长循环半衰期的蛋白、细胞或血小板连接而起作用。

[0076] 0-联寡糖:N-聚糖和 O-聚糖都通过产生蛋白质的细胞而与该蛋白连接。当初生蛋白质从核糖体向内质网移动时,细胞的 N-糖基化机构识别氨基酸链中的 N-糖基化信号(N-X-S/T 基序)并使之糖基化(Kiely 等,1976;Glabe 等,1980)。

[0077] 同样,O-聚糖连接到氨基酸链中的特异性 O-糖基化位点,但触发 O-糖基化的基序与 N-糖基化信号相比要异质得多,并且我们对氨基酸序列中 O-糖基化位点的预测能力尚不充分(Julenius 等,2004)。因此,人工 O-糖基化位点的构建有一些不确定性。

[0078] 疏水性侧基的连接:可使用化学方法进行因子 FVIII 分子与疏水性侧基的缀合。然而,使用酶促方法具有很多潜在优势。根据本发明优选的酶促方法,可经化学方法制备[疏水性延长基团]-唾液酸基-CMP 底物。使用唾液酸转移酶,可经酶促方法将该底物转移到因子 FVIII 上存在的聚糖上。本发的发明人已经出乎意料地证明无需添加任何有机溶剂就可进行这种酶促方法。使用有机溶剂有很多的不利条件,例如丧失生物活性、环境问题、确保完全除去有机溶剂所采取的额外步骤等。也有可能可避免加入环糊精,环糊精是一种去垢剂,也可造成生物功能的损失。在酶促缀合过程中,添加甘油,例如 5-30% 甘油,优选 10-20% 甘油,可能是有利的。甘油的存在似乎例如在冷冻/融解过程中稳定因子 VIII 分子,并且它还可防止形成因子 VIII 结晶。因此,在缀合过程完成之后,无需除去酶促缀合期间所存在的甘油。

[0079] 唾液酸转移酶:唾液酸转移酶是将唾液酸转移到初生寡糖上的酶。每种唾液酸转移酶对特定的糖底物具有特异性。唾液酸转移酶将唾液酸添加到唾液酸化糖脂(神经节苷脂)的末端部分或添加到糖蛋白的 N-联糖链或 O-联糖链上。存在大约 20 种不同唾液酸转移酶,其可根据它们所作用的受体结构和它们所形成的糖键类型而区分。本发明优选的唾液酸转移酶是 ST3Gal-I (对 O-聚糖具有特异性)和 ST3Gal-III (对 N-聚糖具有特异性)。因此有可能通过例如选择特异性唾液酸转移酶和/或改造具有特定糖基化模式的因子 VIII 分子,对本发明的缀合的因子 VIII 分子的结构进行改造。

[0080] 药物组合物:药物组合物在本文优选意指包括包含本发明因子 VIII 分子的适于胃肠外给药用组合物,例如即用型无菌含水组合物或可在例如水或含水平冲液中重构的干燥的无菌组合物。本发明的组合物可包含多种药学上可接受的赋形剂、稳定剂等。

[0081] 在这类组合物中的额外成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。这类额外成分当然不应对本发明药物制剂的总体稳定性有不利影响。胃肠外给药可通过使用注射器任选笔样注射器经由皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射而进行。或者,胃肠外给药可通过输注泵的方

式而进行。进一步的选项是组合物,其可以是以鼻或肺部喷雾的形式给予 FVIII 化合物的溶液剂或混悬剂。作为再一个进一步的选项,含有本发明 FVIII 化合物的药物组合物也可适于透皮给药,例如通过无针注射或贴剂(任选离子电渗贴剂),或透黏膜给药例如口腔给药。

[0082] 本文所用的术语“治疗”是指对有需要的任何人类或其它动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已经历医师的体检,所述医师已经做出试验性或确定性诊断,表明使用所述特定治疗对所述人类或其它动物受试者的健康而言是有益的。所述治疗的时机和目的可依据受试者的健康现状而因不同个体而异。因此,所述治疗可以是预防性的、治标的、针对症状的和/或治愈性的。

[0083] 第一方面,本发明涉及重组因子 VIII 分子,其中所述因子 VIII 分子是包含因子 VIII 分子和融合配偶体的融合蛋白。在第一实施方案中,所述融合配偶体置换了因子 VIII 分子的 a3 结构域。因此,因子 FVIII 的小的 a3 结构域可被融合配偶体全部或部分置换。在第二实施方案中,所述融合配偶体插入到因子 VIII 的 B 结构域中。B 结构域可以是全长 B 结构域,但在一个优选的实施方案中,B 结构域是显著截短的。因此在融合配偶体的 N- 末端和 C- 末端有至少 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸来自 B 结构域。在另一个优选的实施方案中,所述融合配偶体插入到或位于因子 FVIII 的 C2 结构域的 C- 末端。

[0084] 在第三实施方案中,本发明的因子 VIII 分子与抗体结合分子例如 Fc 受体融合。抗体结合分子的实例列于下表中。在第四实施方案中,因子 VIII 分子与具有与人血清白蛋白结合的能力的分子融合。在另一个实施方案中,因子 VIII 与转铁蛋白融合。其实例也在下文提供。在第五实施方案中,因子 VIII 分子与具有与血小板结合的能力的分子融合,这类分子的具体实例同样在下文提供。在再一个实施方案中,因子 VIII 分子与具有与因子 VIII 清除受体结合的能力的分子融合。

[0085] 在第六实施方案中,本发明的因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。优选地,这类因子 VIII 分子在跨越 SEQ ID NO1 的氨基酸 1670-1684 的区域内包含突变(氨基酸的取代、缺失或添加)。最优选地,这类因子 VIII 分子包含一个以下点突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0086] 在第七实施方案中,本发明的分子与侧基缀合。该侧基可选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。优选地,侧基是 PEG 基团、脂肪酸衍生物或多肽。优选地,使用酶促方法将这类侧基连接到分子上,所述方法为例如 W00331464 中所公开的技术,其中 O- 联聚糖和/或 N- 联聚糖用作接头。

[0087] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体置换因子 VIII 分子的 A3 结构域。

[0088] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和/或增加的对新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和/或 O- 联聚糖连接到融合蛋白。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和/或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏

水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0089] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体插入到因子 VIII 的 B 结构域中。

[0090] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和 / 或增加对的新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖与融合蛋白连接。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中所述 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0091] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体插入到因子 FVIII 的 C2 结构域的 C- 末端。

[0092] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和 / 或增加对的新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖连接到融合蛋白。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中所述 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0093] 另一方面涉及本发明分子的制备方法,其中所述方法包括在合适条件下温育编码所述分子的宿主细胞。因此,本发明也涉及包含编码本发明分子的核酸序列的核酸分子以及表达载体和宿主细胞。经由这类方法获取的或可经由这类方法获取的分子同样是本发明的一个方面。

[0094] 另一方面涉及本发明分子作为药物的用途。

[0095] 另一方面涉及本发明分子用于治疗血友病、优选 A 型血友病的用途。

[0096] 另一方面涉及包含本发明的分子和任选一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0097] 本发明的另一方面涉及血友病的治疗方法,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的本发明分子。

实施例

[0098] 实施例 1

[0099] FVIII 构架和融合配偶体

[0100] 本发明的融合蛋白由与来自另一蛋白的多肽(融合配偶体)连接的 FVIII 蛋白(FVIII 部分)组成。

[0101] 融合蛋白的 FVIII 部分可以是具有 FVIII 活性的任何蛋白。FVIII 部分可以是 B 结构域缺失的/截短的(BDD) FVIII 蛋白,其中 FVIII B 结构域部分已从该蛋白上切除。可构成融合蛋白的 FVIII 部分的 FVIII 构架的非限制性实例见表 1。F8-500 是一种 BDD 人 FVIII 蛋白。从 N-端开始,F8-500 由 FVIII 信号肽(氨基酸 -19 至 -1)、后接无 B 结构域的 FVIII HC(氨基酸 1-740)、21 个氨基酸的接头(SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR)(SEQ ID NO 2)和 FVIII LC(野生型人 FVIII 的氨基酸 1649-2332)组成。21 个氨基酸的接头序列源自 FVIII 的 B 结构域并由全长野生型人 FVIII 的氨基酸 741-750 和 1638-1648 组成。

[0102] F8-500- Δ a3 由无 a3 区的 F8-500 组成。在 F8-500- Δ a3 中,将野生型人 FVIII 的氨基酸 1647-1687 从 F8-500 中除去。因此,氨基酸 1645-1648 处的弗林蛋白酶位点已被破坏。然而,合并的弗林蛋白酶和凝血酶位点是由在 F8-500- Δ a 中的 R1645-H1646-P1688-R1689 氨基酸段所产生的。a3 区对于 FVIII 与 vWF 的结合而言是重要的并因此与野生型 FVIII 相比,降低了 F8-500- Δ a3 对 vWF 的亲合力。

[0103] F8-500-His 由具有插入到 F8-500 接头的 His 标签的 F8-500 组成。因此 F8-500-His 的接头序列是 SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR(SEQ ID NO 3)。

[0104] F8-500- Δ a3-His 由无 a3 区、但具有插入到 F8-500 接头的 His 标签的 F8-500 组成。因此,在 F8-500- Δ a3-His 中,野生型人 FVIII 氨基酸 1647-1687 已从 F8-500 中除去并且接头序列是 SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR(SEQ ID NO 4)。

[0105] F8-500-Y1680F 和 F8-500-Y1680C 由 F8-500 组成,其中全长野生型人 FVIII 的氨基酸 1680 已从酪氨酸分别变为苯丙氨酸和半胱氨酸。这两个氨基酸置换降低了 FVIII 对 vWF 的亲合力。此外,Y1680C 氨基酸置换引入游离半胱氨酸,其可用作将延长部分与融合蛋白缀合的柄(handle)。

[0106] 可将融合配偶体与融合蛋白的 FVIII 部分的若干位置连接。用于连接融合配偶体的 FVIII 上的位置的非限制性实例是在介于 FVIII HC 和 LC 之间的 B 结构域或 B 结构域衍生的接头中的位置,在 a3 的位置,和在 FVIII LC 的 C-端。

[0107] 实施例 2

[0108] 编码 FVIII 构架和融合蛋白的表达载体的构建

[0109] FVIII 和融合配偶体间的融合都涉及用于扩增融合配偶体的 PCR。将限制位点加入到所用的 PCR 引物的末端。限制酶用于克隆融合配偶体 cDNA 或合成 DNA 为 FVIII cDNA。

[0110] 在 F8-500 的 B 结构域中的融合发生在 aa750 和 aa1638 之间。在 B 结构域内或其

侧翼的限制位点 AvrII、NruI、AgeI 和 MluI 用于插入编码融合配偶体的 DNA。

[0111] 对于在 FVIII 轻链羧基端的融合,修饰 F8-500 编码构建体。通过定点诱变消除内部 BamHI 位点 (aa 604-606) 并将编码柔性 (GGGS)₆接头的 DNA 插入到编码区 3'。将一个新的 BamHI 位点引入编码接头的 DNA 的 3' 端,以便于将 C- 端融合配偶体克隆到 BamHI 位点和 NotI 位点之间。然后,插入融合配偶体 DNA。来自该构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)₆-X。类似于 (GGGS)₆ 接头,将最小 GS- 接头 (BamHI 限制位点) 插入到 F8-500 编码区 3' 端。BamHI 限制位点 (GGATCC) 形成 GS (甘氨酸-丝氨酸) 的两个密码子。来自该构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -GS-X。没有任何接头的情况下与 F8-500 的 C- 端的融合如下进行:通过用延伸引物 PCR 扩增融合物,所述延伸引物在 5' 端带有 F8-500 编码区最后的 109 bp 和在 PCR 产物的 3' 端具有 NotI 限制位点。XbaI 限制位点存在于离 F8-500 终止密码子的 104-109 bp 处。XbaI 限制酶和 NotI 限制酶用于克隆无接头的融合配偶体。来自后面这些构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -X。

[0112] 为了在 a3 位置插入融合配偶体编码 DNA 并由此在编码蛋白中用融合配偶体置换 a3,将 SacII 限制位点引入 a3 编码区的 3'。因此,融合配偶体编码 DNA 可通过插入 AgeI 位点和 SacII 位点之间或者 AvrII 位点和 SacII 位点之间而引入。

[0113] hFc (SEQ ID NO 5)

[0114]

```
htcpccpapeaegepsvfifppkpkdtlmisrtpvctvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqys  
tyrvsvitvlhqdwlngkeyckvsnkalpapietiskakgqprepqvyltpperdellknqvsllclvkgfypsdiavewesng  
qpennyktppvidsdgsfflyskitvdksrwwqagrvfscsvmhleahlnhytqksislspgk
```

[0115] mFc (SEQ ID NO 6)

[0116]

```
kpcppckcpapnaegepsvfifppkikdvlmslspmvctvvdvseddqdvqiswfvnnvevllaqlqthredyq  
stlrsvsalpihqdwmsgkefkckvnnkalpapiertiskpkgsrvapqvylpppeeemtkkqvtilcmvidfmpediyvewt  
nngktelnynkntepvidsdgsyfmysklrveknwvemsysscvsyheglhnhhttkfsfrrpgk
```

[0117] 人血清白蛋白 (HSA) (SEQ ID NO 7)

[0118]

```
Dahksevahrfdlgeentkalvialfaqyiqqcpfedhvklynevtefaktcvadesaenodkslhtfgdkictvatir  
etygemadccakqepemecflghkddnprlprlrvpevdvmctafhdneetflkkylyeianhpyfyapeliffakrykaaftec  
cqaadkaadlpkidelrdegkassakqrkcasikqfgerafkawavarlsqrpkaeafaevsklvtdltkvhtecchgdllacadd  
radiakyicenqdsisskileccekpilekshciaevendempadipslaadiveskdvcnkyaekdvflgmflyeyarrhpdyl  
svvlliraktyettilekccaaadphacyakvdefkpivespnlikqncelfeqigeykfqnallvrytkkvpqvstplfevsmigk  
vgskcckhpeakrmpcaedyisvvinqlcvihektpvsvdrvtcceslvnrrpcfalevdetyvpkefnaetftfhadictiseker  
qikkqtaivelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekckaddketcfaeegkkivaasqaalgi
```

[0119] 转铁蛋白 (SEQ ID NO 8)

[0120]

VPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANE
ADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDEPQTFYAVAVVKKDSGFMNQLRGKKS
CHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCG
CSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYK
DCHLAQVPSHTVVARSMG GKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHG-
KDLLFKDSAAGFLKVPPRMDAKMYL
GYEYVTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTED
CIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSAS
DLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAFGSKKDSSLCKLC
MGSGNLNCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEK
DYELLCLDGTRKPVVEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQQHLFGSNVTDCSGN
FCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHDRNTYEKYLGEYVYKAVGNLRKCSTSSLLEACTFRP

[0121] hFc γ RI (CD64) (SEQ ID NO 9)

[0122]

qvdttkavitqppwvsvfgeetvlihcevlhpgssstqwflngtatqtstpeyritsasvndsgeyrcqrglsgrsdpiql
eihrgwllqvssrvftegeplairchawkdilvynviymgkafkffhwnsnitlilknishngtyhcsgrmgkhrytsagisvtvkelf
papvlnasvtspilegnlvtlscetkllqrpqlqlyfsfymgsktlrgmtssseyqiltarredsglywceaatedgnvikrspelelqvlq
lqiptp

[0123] FcRn (SEQ ID NO 10)

[0124]

aeshsllyhltavsspapgtpafwvsgwlgpqqylsynslrgeaepcgawvwenqvswywekettdlrkekflfe
afkalggkgpytlqglgcelgpdntsvptakfaingeefmndikqgtwggdwpealaisqrwqqqdkaaankeltflfscphdre
hlergrgnlewkeppsmrikarpsspgfsvltcsafsfyppeqlqrlfmglaagtggqdfgpnsgdgsfhasssitvksgehhycci
vqhaglaqplrvelespakss

[0125] FcRn-H166K (SEQ ID NO 11)

[0126]

aeshsllyhltavsspapgtpafwvsgwlgpqqylsynslrgeaepcgawvwenqvswywekettdlrkekflfe
afkalggkgpytlqglgcelgpdntsvptakfaingeefmndikqgtwggdwpealaisqrwqqqdkaaankeltflfscphdre
klergrgnlewkeppsmrikarpsspgfsvltcsafsfyppeqlqrlfmglaagtggqdfgpnsgdgsfhasssitvksgehhycci
vqhaglaqplrvelespakss

[0127] LRP-CR5-6 (SEQ ID NO 12)

[0128]

tcppnqfscasgrcipiswtcdldddcgdrsdasascayptcflqtfcnngrcininwrcdndndcgdsdeagc
sh

[0129] LRP-CR6-7 (SEQ ID NO 13)

[0130]

tcflptqftcnngrcininwrcdndndcgdsdeagcshscsstqfkcnsgrcipehwtcdgdndcgdydethan
ctnqatr

[0131] LRP-CR6 (SEQ ID NO 14)

[0132]

tcfpitqftcnngrcinwrcdndndcgdnsdeagcsh

[0133] SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC (SEQ ID NO 15)

[0134]

mdiimtgpsmsvslgdtvsitcasqgissnigwlqkpgksfmgllyygtnlvdgvpsrfegsgsgadysitissl
dsedfadyycvqyaqlpytfgggtkleklggggsgggsggggsnsvlqqsgaelvkpgasvklscasgfnikdtyvhwvkq
rpeeglewigrdpangytkydpkfkgkatitadtssntaylqlssltssedavyycvrplydyamdywgqgtsvtvss

[0135] 接头-SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC (SEQ ID NO 16)

[0136]

mdiimtgpsmsvslgdtvsitcasqgissnigwlqkpgksfmgllyygtnlvdgvpsrfegsgsgadysitissl
dsedfadyycvqyaqlpytfgggtkleklggggsgggsggggsnsvlqqsgaelvkpgasvklscasgfnikdtyvhwvkq
rpeeglewigrdpangytkydpkfkgkatitadtssntaylqlssltssedavyycvrplydyamdywgqgtsvtvssggggsg
gggsggggs

[0137] SC 抗 GPIIIa-2-HC-LC (SEQ ID NO 17)

[0138]

qvqlqqsgaelvrpgtsvklscasgytftnylwgwvkqrpghglewigdiypgggynkynenfkgkatitadtssst
aymqissltssedavvyfcareygnnydyamdswwgqgtsvtvssggggsgggsggggsdivmtqaapsvpvtpgesvsiscr
ssrsllhsngntylcwflqrpqgspqliyrmsniasgvpdrfsgsgsgtaftirirveaedvgvyycmqhleyptffgsgtkleikr

[0139] SC 抗 GPIIIa-2-LC-HC (SEQ ID NO 18)

[0140]

divmtqaapsvpvtpgesvsiscrssrsllhsngntylcwflqrpqgspqliyrmsniasgvpdrfsgsgsgtaftirir
veaedvgvyycmqhleyptffgsgtkleikrgggsgggsggggsqvqlqqsgaelvrpgtsvklscasgytftnylwgwvk
qrpghglewigdiypgggynkynenfkgkatitadtssstaymqissltssedavvyfcareygnnydyamdswwgqgtsvtvss

[0141] ABD035 (SEQ ID NO 19)

[0142]

laeakvlanreldkygvsdfykrlinkaktvegvealkhilaalp

[0143] 序列 A (SEQ ID NO 20)

[0144]

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE
EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE
GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

[0145] ELP80 (SEQ ID NO 21)

[0146]

gvpvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgv
gvpagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgv
gvpvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgg
gvpvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgv
gvpgggvpvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgg
gvpvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgg

[0147] 额外的 a3 (SEQ ID NO 22)

[0148]

eiirttlqsdqeeidyddtisvemkkedfdiydedenqspr

[0149] GHBP (SEQ ID NO 23)

[0150]

fsgseataaillerapwslqsvnpkltsskepkfkcrsperetfchwtdvhhgtnlgiqiflytrmtqewiqew
kecpdyvsagencyfnssftsiwipycikltssnggtvdekcfsvdeivqdpplalnwtllnvsltghadiqvnweapmadiqg
wnvleyelqykevnetkwmmdpilttvpvysikvdkeyevrvskqmsgnygefsevlvltlqmsq

[0151] FIX298-342 (SEQ ID NO 24)

[0152]

iflkfgsyvsgwarvfhkgrsalvlqylrvplvdratclrstkf

[0153] FIX47-125 (SEQ ID NO 25)

[0154]

Ddgdqcesnpcinggsckddinsyecwcpfgfegknceldvtcnikngrceqfcknsadnkvvcsctegyrlaen
qksce

[0155] vWF1-272 (SEQ ID NO 26)

[0156]

slscrppmvkivcpadniraeglectkicqnydlecmismgcvsgclcppgmvrhenrcvalercpcfhqgkeyap
getvkgicntcvcrdrkwnctdhvcdalcstigmahyltfdgkylfpgccqyvvlvqdyccgspgtrilvgnkgcshpsvkckkrvti
lveggeleifdgevnykrpmkdethfevvesgryilllgkalsvvdrlhsisvvlkqtyqekvcgicgnfdgiqnnndltssniqvee
dpvdfgnswkvssqcadtr

[0157] vWF1-1390 (SEQ ID NO 27)

[0158]

slscrppmvkivcpadniraeglectkicqnydlecmismgcvsgclcppgmvrhenrcvalercpcfhqgkeyap
getvkgicntcvcrdrkwnctdhvcdalcstigmahyltfdgkylfpgccqyvvlvqdyccgspgtrilvgnkgcshpsvkckkrvti
lveggeleifdgevnykrpmkdethfevvesgryilllgkalsvvdrlhsisvvlkqtyqekvcgicgnfdgiqnnndltssniqvee
dpvdfgnswkvssqcadtrkvpidsppatchnnimkqtmvdsccrltsdvfdcnklvdpepyldvcydtccsesigdcacfc
dtiaayahvcaqhgvvtwrtatlcpcqscceemlrengyecewrynsapacqvtcqhpeplacpvqcvegchahcpgpkild
ellqtcvdpedcpvcevagrmasgkktltnpsdpehcqichcdvvnltceacqepgglvvppldapvspttlyvediseppihdf

[0159]

ycsrldivflldgssrseaeafevikafovdmmerlrisqkwrvavveyhdgshayigikdrkpselmasqvkyagsqvastse
vikytlfqiiskidrpeasrialimasqepqrmismfryvvglikkkkvivipvgigphanlkqiriekqapenkafvissvdelegqr
deivsylvcdlapeappptlppdmaqvltvgpgllgvstlgokmsmvlvdvafviegskigeadfnrskfmeeviqmndvgqdsi
hvtvlqysymvtveypfseagskgdlqrveiryqggnrntglalrylsdhsflvsqgdreqapnlvymvtgnpasdeikrlpgdi
qvvpigvgpnanvqelerigwgnapiliqdfetlpreapdlvqrccsgegqiptlspapdcspqldvillldgsssfasyfdekmks
fakafiskanigprltqvsvlqygsittidvpwnvpekahlslvdvmqreggspqigdalgfavryltsemhgarpqgaskavvilt
dvsdsvdaadaarsnrvlvpigigdrydaaqirilagpagdsnvklqriedlptmytignsfhklcsgfvrmdedgnekrp
gdvwtlpdqchvtvcqpdgqtlkshrvnodrgrlpscpnsqspvkveetcgcrwtcpovctgssrhvtfddgnfkltgscsyvlfq
nkeqdllevilngacspgarqgcmksievkhsalsvelhsdmevtvngrlvsvpyvggnmevnyvgaimhevfnhghiftft
pqnnelfqlqispkftasktyglcgicdengandfmirdgtvttdwktlvqewtvqrpggtcqpilleeqclvpdsshcqvlllpfaech
kv

[0160] vWF497-716-R545A (SEQ ID NO 28)

[0161]

ediseppihdfycsrldivflldgssrseaeafevikafovdmmerlrisqkwrvavveyhdgshayigikdrkpsel
masqvkyagsqvastsevikytlfqiiskidrpeasrialimasqepqrmismfryvvglikkkkvivipvgigphanlkqiriekq
apenkafvissvdelegqrdeivsylvcdlapeappptlppdmaqvltvg

[0162] vWF 结合蛋白 (SEQ ID NO 29)

[0163]

npelkdfneeeqlkcdleinklenqilmigktfyqnryddveslyskldlimgykdeerankkavnkrmlenkkedletideffdid
ktrpnipvldekqeeknhknmaqlksdteaksdeskrskrslnqnhkpasqevseqqkaeydkraeerkarfldnq
kikktpvvsleydfekqridnendkkivvsaptkkptsptlytettqvpmpptverqtqqqiynapklaglngeshdftthqsptt
snhthnn

[0164] hCG C-端 (SEQ ID NO 30)

[0165]

sssskapppslpsrripgpsdtpilpq

[0166] F10AP (SEQ ID NO 31)

[0167] svaqatsssgaeapdsitwkpdaadldptenpfdlldfnqtqpergdnnl。

[0168] 实施例 3

[0169] FVIII 构架和融合蛋白的瞬时表达

[0170] 密度为 $0.9-1.1 \times 10^6$ 的 HKB11 细胞用质粒 0.7 mg/l 和转染剂 293Fectin (Invitrogen) 1.4 ml/l 的混合物转染。通过将质粒和转染剂分别稀释在 OPTIMEM (Invitrogen) 中,混合这两种溶液,并将混合物在室温下温育 20 分钟,来制备转染混合物。将混合物加入到细胞悬液中并将悬液在振荡器培养箱中在 36.5°C 和 5% CO₂ 中温育 5 天。将细胞培养收获物在 0.22 μm 膜滤器上过滤。按照实施例 5 所述,从细胞培养收获物中纯化 FVIII 构架和融合蛋白。

[0171] 实施例 4

[0172] 表达融合蛋白的稳定的细胞

[0173] 适应无血清的 CHO-DUKX-B11 细胞用编码 F8-500- 白蛋白-Δa3 融合蛋白的表达质粒转染。转染后的细胞用二氢叶酸还原酶系统选择并通过有限稀释而克隆。通过 ELISA 和显色活性测定来筛选产生 FVIII 的克隆。选择克隆 JsJH009 用于扩大规模 (upscaling)。将细胞移至生物反应器。按照实施例 5 所述,从细胞培养收获物中纯化 F8-500- 白蛋白-Δa3 融合物。

[0174] 实施例 5

[0175] FVIII 构架和融合蛋白的纯化

[0176] 给柱填装树脂 VIIISelect (GE Healthcare),其尺寸为:直径 1.6cm 和床高 4cm (8mL);并将柱用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80 (Tween80)+250mM NaCl, pH7.3 以 500cm/h 平衡。将按照实施例 3 所述制备的培养物滤液上柱,然后先用平衡缓冲液洗涤柱子,再用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+1.5M NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+2.5 M NaCl+6.5M 丙二醇, pH7.3, 以 90cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80, pH7.3 1:10 稀释,然后上样到填装有 F25-Sepharose 的柱上 (Thim 等, Haemophilia, 2009)。柱尺寸为直径 1.6cm 和床高 2cm,柱体积 4mL。使用前,柱子用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+150mM NaCl+1M 甘油, pH7.3, 以 180cm/h 平衡。上样后,先用平衡缓冲液洗涤柱子,再用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+650mM NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+2.5M NaCl+50%(v/v) 乙二醇, pH7.3, 以 30cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80, pH7.3 1:15 稀释,除了缺失 a3 结构域的 FVIII- 变体之外,其在相同缓冲液中 1:45 稀释。将稀释的合并液上样到填装有 Poros 50HQ (PerSeptive Biosystem) 的柱子上,柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm,柱体积 1mL。使用前,柱子用 20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+50mM NaCl+1M 甘油, pH7.3, 以 300cm/h 平衡。柱子用平衡缓冲液洗涤,然后用从平衡缓冲液至以下溶液的在 5 个柱体积内的线性梯度洗脱:20mM 咪唑+10mM CaCl₂+0.01% 吐温 80+1M NaCl+1M 甘油, pH7.3。合并含有 FVIII 的流分并将合并液贮存于 -80° 直至使用。典型纯化的收率表见表 11。

[0177] 基本上如上所述地纯化具有 HIS- 标签的 FVIII 变体,然而第二纯化步骤 (F25-sepharose) 替换为装有 2 个柱体积 1M NiSO₄ 的螯合 Sepharose FF (GE Healthcare)。

柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm,柱体积 1mL。使用之前,柱子用 30mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01%吐温 80 + 1.5M NaCl, pH7.3, 以 180cm/h 的流速平衡。上样后,柱子用 30 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤,然后用在 5 个柱体积内到 250mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01%吐温 80 + 1.5M NaCl, pH7.3 的线性梯度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01%吐温 80, pH7.3 1:30 稀释。最终的纯化步骤 (Poros 50HQ) 如上所述地进行。

[0178] 实施例 6

[0179] 通过显色测定而测量的细胞培养收获物中的 FVIII:C

[0180] 在显色 FVIII 测定中,使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 如下评价细胞培养收获物 (上清液部分) 中的 rFVIII 化合物的 FVIII 活性 (FVIII:C) :rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (Coagulation reference, Technoclone) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % BSA, pH 7.3, 含防腐剂) 中稀释。将 50 μl 样品、标准品和缓冲液阴性对照加入到 96 孔微量滴定板 (Spectraplates MB, Perkin Elmer)。所有样品都以 1:100、1:400、1:1600 和 1:6400 稀释再测定。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 按照 5:1:3 (体积比) 混合,并取 75 μl 加入到孔中。在室温下温育 15 min 之后,加入 50 μl 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下温育 5 min, 然后加入 25 μl 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Envision 微量滴定板读板器 (Perkin Elmer) 上,测定在 405 nm 处吸光度和在用作参考波长的 620 nm 处的吸光度。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。通过样品活性除以经 ELISA 测得的蛋白质浓度而计算比活。结果见表 1-10。

[0181] 实施例 7

[0182] FVIII 构架和融合蛋白的纯化

[0183] 融化溶于由以下成分组成的缓冲液的按照实施例 5 所述纯化的 F8-500- 白蛋白 - $\Delta\text{a}3$ (13 mg, 6.5 mg/ml) :含咪唑 (20 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %)、氯化钠 (500 mM) 和甘油 (1 M) 的水 (pH 7.3)。

[0184] 加入 9 微克来自产脲节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*) 的唾液酸酶 (1.9 U, 在 7 微升缓冲液中)、280 微克唾液酸转移酶 (在 112 微升中, His-ST3Gal-I, 2.5 mg/ml, EC 2.4.99.4, WO 2006102652) 和 59 毫克胞苷一磷酸 *N*-5'-PEG- 甘油 - 神经氨酸 (在 290 微升中, 参见 WO2007/056191), 并用 HCl (1M) 将 pH 调节到 6.9。终体积为 2.7 mL。然后让所得混合物在 22-25 摄氏度 (室温) 下静置 22 小时。

[0185] 糖聚乙二醇化 (glycopegylation) 之后,混合物用缓冲液 A (含 Tris (25 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %) 和甘油 (1 M) 的水, pH 7.5) 稀释至 50 ml。将稀释混合物上样到 Source30Q 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark, 柱体积 1.1 mL)。然后用缓冲液 A (4 倍柱体积) 洗涤固定化材料,再用 0-100 % 缓冲液 B (含 Tris (25 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %)、氯化钠 (0.7 M) 和甘油 (1 M) 的水, pH 7.5) 的梯度从柱中洗脱。梯度 :8 CV 5-10 % 缓冲液 B, 13.5 CV 10-100 % 缓冲液 B 和 3 CV 100% 缓冲液 B。

[0186] 将早期洗脱的 2.5 mL 峰流分与 1.2 毫克胞苷一磷酸 *N*-5' 乙酰基 - 神经氨酸 (在 12 微升中) 和 62 微克唾液酸转移酶 (在 52 微升中, MBP-SBD-ST3Gal-III, EC 2.4.99.6, 参见 WO 2006102652) 混合。

[0187] 让所得混合物在 22-25 摄氏度 (室温) 下静置 22 小时, 然后上样到 Superdex200pg 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark; 柱体积 120 ml)。然后用由以下成分组成的缓冲液洗脱产物: 含 L- 组氨酸 (1.5 g/L)、L- 甲硫氨酸 (55 mg/L)、氯化钙 (250 mg/L)、吐温 80 (0.1 g/L)、氯化钠 (18 g/L) 和蔗糖 (1.5 g/L) 的水, pH 6.9。分离合并最初的含产物的流分 (12 mL); 产物浓度为大约 0.06 mg/mL。

[0188] 最终, 通过在 Amicon Centriprep YM-50 (截止值: 50 kDa) 中离心而浓缩产物。浓缩后体积为 1.7 mL, 含有 0.35 mg/mL 糖聚乙二醇化的 F8-500- 白蛋白- Δ a3 (纯度 >90%)。该化合物在表 12 中称为 40K-PEG-0-F8-500- 白蛋白- Δ a3。

[0189] 实施例 8

[0190] 通过显色测定而测量的纯化样品中的 FVIII:C

[0191] 如下在显色 FVIII 测定中, 使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 评价纯化 rFVIII 化合物 (按照实施例 5 所公开的方法而分离) 的 FVIII 活性 (FVIII:C): rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如根据 NIBSC 的第 7 届国际 FVIII 标准品而标定的纯化野生型 rFVIII) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % BSA, pH 7.3, 含防腐剂) 中稀释。将 50 μ l 样品、标准品和缓冲液阴性对照一式两份加入到 96 孔微量滴定板 (Nunc) 中。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 按照 5:1:3 (体积比) 混合, 并取 75 μ l 加入到孔中。在室温下温育 15 min 之后, 加入 50 μ l 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下温育 10 min, 然后加入 25 μ l 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Spectramax 微量滴定板读板器 (Molecular Devices) 上, 测定在 415 nm 处吸光度和在用作参考波长的 620 nm 处的吸光度。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。通过样品活性除以经 HPLC 测得的蛋白质浓度而计算比活。对于 HPLC, 通过对在对应于轻链的色谱图中的峰下面积进行积分而求出样品浓度, 并与野生型 rFVIII 的平行分析中同样的峰的面积进行比较, 其中通过氨基酸分析测定浓度。结果见表 1-10。

[0192] 实施例 9

[0193] 通过一步法凝血测定而测量的纯化样品中的 FVIII:C

[0194] 如下在一步法 FVIII 凝血测定中进一步评价 rFVIII 化合物的 FVIII:C: rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如根据 NIBSC 的第 7 届国际 FVIII 标准品而标定的纯化野生型 rFVIII) 在 HBS/BSA 缓冲液 (20 mM hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4, 含 1 % BSA) 中稀释至大约 10 U/mL, 再在含 VWF 而缺乏 FVIII 的血浆 (Dade Behring) 中稀释 10 倍。样品随后在 HBS/BSA 缓冲液中稀释。在 ACL300R 或 ACL5000 仪器 (Instrumentation Laboratory) 上, 使用单因子程序, 测定 APTT 凝血时间 (clot time)。含 VWF 而缺乏 FVIII 的血浆 (Dade Behring) 用作测定血浆, 且 SynthASil, (HemosILTM, Instrumentation Laboratory) 用作 aPTT 试剂。在凝血仪器中, 在 37°C, 将稀释的样品或标准品与缺乏 FVIII 的血浆、aPTT 试剂混合。加入 (assess) 氯化钙并用浊度确定血块形成的时间。根据 FVIII 标准品稀释液的血块形成时间的标准曲线来计算样品中的 FVIII:C。结果见表 1-10。

[0195] 实施例 10

[0196] 在 FVIII 缺陷型和 VWF 缺陷型小鼠中 FVIII 构架和融合蛋白的药代动力学

[0197] 在 FVIII 缺陷型小鼠 (具有 C57Bl/6 背景的 FVIII 外显子 16 敲出 (KO) 小鼠, 在

Taconic M&B 繁育)或在 vWF 缺陷型小鼠(具有 C57Bl/6 背景的 vWF 外显子 4 + 5 KO 小鼠,在 Charles River, Germany 繁育)中评价 rFVIII 变体的药代动力学。vWF-KO 小鼠具有 13% 的正常 FVIII:C (参见实施例 6),而 FVIII-KO 小鼠没有可检测的 FVIII:C。使用近似体重为 25 克,年龄范围在 16-28 周龄的雄性和雌性的混合群体(大约 1:1)。小鼠在尾静脉接受 rFVIII (280 IU/kg) 的单次静脉注射。在给药后直到 64 小时的时间点,使用无包被毛细玻璃管,从眼窝丛处采血。每只小鼠采 3 份样品,每一时间点采 2-4 份样品。用柠檬酸钠立即稳定血液并在 4 倍体积 FVIII Coatest SP 缓冲液(参见实施例 6)中稀释,然后在 $4000 \times g$ 离心 5 分钟。将得自稀释血液的血浆在干冰上冷冻并保存于 -80°C 。按照实施例 6 所述,在显色测定中检测 FVIII:C。通过无房室(non-compartmental)法(NCA),使用 WinNonlin Pro 4.1 版软件,进行药代动力学分析。结果见表 12。用融合蛋白的半衰期除以无融合配偶体的 FVIII 构架的半衰期,求出融合蛋白的延长倍数。

[0198] 实施例 11

[0199] 与血小板结合的融合蛋白的分析

[0200] 可通过流式细胞术测定融合蛋白的血小板结合。可纯化外周血血小板,或可使用全血。血小板可被激活或静止。将血小板与融合蛋白温育 15-30 min。融合蛋白可直接用荧光团标记或用荧光标记的第二抗体检测。

[0201] 可加入不干扰融合蛋白结合的荧光标记的血小板特异性抗体,以评价与融合蛋白结合的颗粒是否真的是血小板。温育之后,洗涤细胞以除去融合蛋白,然后在流式细胞仪上分析样品。流式细胞仪检测未标记的细胞和与细胞结合的荧光标记的分子,并且因此可用于特异性地分析融合蛋白与血小板(或其它细胞)结合的程度。

[0202] 可例如通过加入过量的未标记抗体(当使用直接标记的融合蛋白时),评价结合特异性。可例如通过加入过量的膜联蛋白 V 或 FVIII,评价 FVIII 部分与血小板的结合。

[0203] 可如下评价通过静止血小板对融合蛋白的内在化:例如通过将血小板与直接标记的融合蛋白一起温育,再与抗体一起温育,所述抗体猝灭来自表面结合(即非内在化的)融合蛋白的信号。然后仅内在化的融合蛋白才可被流式细胞术检测到。可假定被激活的血小板将会在血块形成部位释放内在化融合蛋白。

[0204] 实施例 12

[0205] 在 GPIIIa 转基因小鼠中 GPIIIa 靶向的融合蛋白的药代动力学

[0206] GPIIIa 靶向的融合蛋白与血小板上的人 GPIIb/IIIa (整联蛋白 $\alpha 2\text{b}3$) 受体结合,但它不能识别鼠 GPIIb/IIIa,这防止使用野生型小鼠用于药代动力学分析。可在表达人 GPIIIa 的转基因小鼠中分析 GPIIIa 靶向的融合蛋白的药代动力学特性,所述人 GPIIIa 与鼠 GPIIb 关联,这使融合蛋白能够与该受体结合。将融合蛋白经静脉内注射到 GPIIIa 转基因小鼠,并在注射之后的不同时间点(例如 0.5、24、72、288 小时)采血。可通过 ELISA 的方式定量测定注射的融合蛋白(游离的和/或与血小板结合的),或可将融合蛋白放射性标记或荧光标记并检测。

[0207] 表 1. 可构成融合蛋白 FVIII 部分的 BDD FVIII 构架

[0208]

名称	FVIII 部分	融合 配偶体	融合配偶体 的位置	比活 (ml/ng)*
F8-500	F8-500	n. a.	n. a.	17.9/17.0
F8-500-Δa3	F8-500-Δa3	n. a.	n. a.	13.8/13.8
F8-500-His	F8-500-His	n. a.	n. a.	12.1/8.1
F8-500-Δa3-His	F8-500-Δa3-His	n. a.	n. a.	n. d./n. d.
F8-500-Y1680F	F8-500-Y1680F	n. a.	n. a.	16.6**/n. d.
F8-500-Y1680C	F8-500-Y1680C	n. a.	n. a.	19.7/n. d.

[0209] * 显色测定 / 凝血测定

[0210] ** 在细胞培养收获物中测定 (高值可代表 ELISA 检测不良)

[0211] 表 2. 与 FcRn相互作用的融合蛋白

[0212]

名称	FYIII 部分	融合 配偶体	融合配偶体 的位置	比活 ($\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)*
F8-500-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 B 结构域中	19.5**/n.d. 14.1**/n.d.
F8-500-hFc(IgG1)-His	F8-500-His	hFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-hFc(IgG1)	F8-500-Y1680F	hFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-hFc(IgG1)	F8-500-Y1680C	hFc	在 B 结构域中	
F8-500- hFc(IgG1)- $\Delta\alpha3$	F8-500- $\Delta\alpha3$	hFc	在 $\alpha3s$ 位置	6.0**/n.d. 28.5**/n.d.
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 IC 的 C 端	16.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的-GS-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 IC 的 C 端	14.4**/n.d.
F8-500-C2 连接的-hFc(IgG1) (F8-500-hFc-IC)	F8-500	hFc	在 IC 的 C 端	13.4**/n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -hFc(IgG1)(F8-500-Y1680F-hFc- IC)	F8-500-Y1680F	hFc	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -hFc(IgG1)(F8-500-Y1680C-hFc- IC)	F8-500-Y1680C	hFc	在 IC 的 C 端	
F8-500-mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 B 结构域中	18.5**/n.d. 13.5**/n.d.
F8-500-mFc(IgG2A)-His	F8-500-His	mFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680F	mFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680C	mFc	在 B 结构域中	
F8-500- mFc(IgG2A)- $\Delta\alpha3$	F8-500- $\Delta\alpha3$	mFc	在 $\alpha3s$ 位置	
F8-500-C2 连接的-(GGG)6- mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 IC 的 C 端	15.5**/n.d.
F8-500-C2 连接的-GS- mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 IC 的 C 端	15.2**/n.d.
F8-500-C2 连接的-mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 IC 的 C 端	12.9**/n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680F	mFc	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680C	mFc	在 IC 的 C 端	
F8-500-白蛋白	F8-500	HSA	在 B 结构域中	14.7/n.d.
F8-500-白蛋白-His	F8-500-His	HSA	在 B 结构域中	8.1/8.2
F8-500-白蛋白-S127P	F8-500	HSA	在 B 结构域中	12.3**/n.d.
F8-500-Y1680F-白蛋白	F8-500-Y1680F	HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-白蛋白	F8-500-Y1680C	HSA	在 B 结构域中	
F8-500-白蛋白- $\Delta\alpha3$	F8-500- $\Delta\alpha3$	HSA	在 $\alpha3s$ 位置	2.0/n.d.
F8-500-C2 连接的-(GGG)6-白蛋白	F8-500	HSA	在 IC 的 C 端	22.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的-GS-白蛋白	F8-500	HSA	在 IC 的 C 端	17.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的-白蛋白 (F8-500-白蛋白-IC)	F8-500	HSA	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的-白蛋白 (F8-500-Y1680F-白蛋白-IC)	F8-500-Y1680F	HSA	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的-白蛋白 (F8-500-Y1680C-白蛋白-IC)	F8-500-Y1680C	HSA	在 IC 的 C 端	
F8-500-转铁蛋白	F8-500	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-转铁蛋白-His	F8-500-His	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-转铁蛋白	F8-500-Y1680F	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-转铁蛋白	F8-500-Y1680C	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500- 转铁蛋白- $\Delta\alpha3$	F8-500- $\Delta\alpha3$	转铁蛋白	在 $\alpha3s$ 位置	
F8-500-C2 连接的-转铁蛋白 (F8-500-转铁蛋白-IC)	F8-500	转铁蛋白	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的-转铁蛋白 (F8-500-Y1680F-转铁蛋白-IC)	F8-500-Y1680F	转铁蛋白	在 IC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的-转铁蛋白 (F8-500-Y1680C-转铁蛋白-IC)	F8-500-Y1680C	转铁蛋白	在 IC 的 C 端	

[0213] * 显色测定 / 凝血测定

[0214] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0215] 表 3. 与免疫球蛋白相互作用的融合蛋白

[0216]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (mU/ug)*
F8-500-hFcγRI	F8-500	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	22.2/20.0
F8-500-hFcγRI-His	F8-500-His	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	11.6/4.9
F8-500-Y1680F- hFcγRI	F8-500-Y1680F	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C- hFcγRI	F8-500-Y1680C	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	
F8-500- hFcγRI-Δa3	F8-500-Δa3	hFcγRI (CD64)	在 a3s 位置	5.3/n.d.
F8-500-C2- 连接的 -hFcγRI (F8-500-hFcγRI-LC)	F8-500	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2- 连接的-hFcγRI (F8-Y1680F-500-hFc γRI-LC)	F8-500-Y1680F	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2- 连接的- hFcγRI (F8-500-Y1680C-hFc γRI-LC)	F8-500-Y1680C	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-FcRn	F8-500	FcRn	在 B 结构域中	27.2**/n.d.
F8-500-FcRn-H166K	F8-500	FcRn	在 B 结构域中	20.8**/n.d.

[0217] * 显色测定 / 凝血测定

[0218] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0219] 表 4. 具有降低与清除受体的相互作用的能力的融合蛋白

[0220]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (mU/ug)*
F8-500-LRP-CR5-6	F8-500	LRP CR5-6	在 B 结构域中	14.2/n.d.
F8-500-LRP-CR5-6-His	F8-500-His	LRP CR5-6	在 B 结构域中	
F8-500-LRP-CR6-7	F8-500	LRP CR6-7	在 B 结构域中	9.5**/n.d.
F8-500-LRP-CR6	F8-500	LRP CR6	在 B 结构域中	8.9**/n.d.

[0221] * 显色测定 / 凝血测定

[0222] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0223] 表 5. 与血小板结合的融合蛋白

[0224]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 ($\mu\text{Ci}/\text{ng}$) *
F8-500-抗 GPIIIa-1-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-1-IC-1C	在 B 结构域中	29.3** /n.d.
F8-500-接头-抗 GPIIIa-1-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-1-IC-1C	在 B 结构域中	40.3** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	22.5** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	-
F8-500-接头-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	45.9** /n.d.
F8-500-Aa3-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-Aa3-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	-
F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-Aa3	F8-500-Aa3	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 a3s 位置	28.2** /n.d.
F8-500-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 B 结构域中	28.3** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 B 结构域中	95.4** /n.d.
F8-500-接头-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 B 结构域中	47.5** /n.d.
F8-500-Aa3-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-His	F8-500-Aa3-His	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 B 结构域中	81.4** /n.d.
F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-Aa3	F8-500-Aa3	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4IC	在 a3s 位置	29.2** /n.d.
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC (F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-1C)	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	在 1C 的 C-端	22.4** /n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC (F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -GS-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC (F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4IC	在 1C 的 C-端	16.6** /n.d.

[0225] * 显色测定 / 凝血测定

[0226] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0227] 表 6. 与血清白蛋白相互作用的融合蛋白

[0228]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (μl/ng)*
F8-500-ABD035	F8-500	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-ABD035-His	F8-500-His	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	8.3/a.d.
F8-500-Y1680F-ABD035	F8-500-Y1680F	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-ABD035	F8-500-Y1680C	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-ABD035-Δa3	F8-500-Δa3	白蛋白结合肽 ABD035	在 a3s 位置	4.0/0.5
F8-500-C2-连接的-ABD035 (F8-500-ABD035-1C)	F8-500	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-ABD035 (F8-500-Y1680F-ABD035-1C)	F8-500-Y1680F	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-ABD035 (F8-500-Y1680C-ABD035-1C)	F8-500-Y1680C	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-4XABD035	F8-500	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	14.8/a.d.
F8-500-4XABD035-His	F8-500-His	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-4X ABD035	F8-500-Y1680F	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-4X ABD035	F8-500-Y1680C	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-4X ABD035-Δa3	F8-500-Δa3	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-4X ABD035-1C)	F8-500	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-Y1680F-4X ABD035-1C)	F8-500-Y1680F	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-Y1680C-4X ABD035-1C)	F8-500-Y1680C	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-SC 抗 HSA	F8-500	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 HSA-His	F8-500-His	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-SC 抗 HSA	F8-500-Y1680F	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 HSA	F8-500-Y1680C	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 HSA-Δa3	F8-500-Δa3	SC 抗 HSA	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-SC 抗 HSA-1C)	F8-500	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-Y1680F-SC 抗 HSA-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-Y1680C-SC 抗 HSA-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	

[0229] * 显色测定 / 凝血测定

[0230] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0231] 表 7. 保护分子避免清除受体的融合蛋白

[0232]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (ml/ng)*
F8-500-Seq A	F8-500	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Seq A-His	F8-500-His	序列 A	在 B 结构域中	19.2**/n.d.
F8-500-Y1680F-Seq A	F8-500-Y1680F	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-Seq A	F8-500-Y1680C	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Seq A- $\Delta a3$	F8-500- $\Delta a3$	序列 A	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-Seq A (F8-500-Seq A-IC)	F8-500	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的 Seq A (F8-500-Y1680F-Seq A-IC)	F8-500-Y1680F	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 Seq A (F8-500-Y1680C-Seq A-IC)	F8-500-Y1680C	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-ELP80	F8-500	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-ELP80-His	F8-500-His	ELP80	在 B 结构域中	13.6**/n.d.
F8-500-Y1680F-ELP80	F8-500-Y1680F	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-ELP80	F8-500-Y1680C	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-ELP80- $\Delta a3$	F8-500- $\Delta a3$	ELP80	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-ELP80	F8-500	ELP80	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的-ELP80	F8-500-Y1680F	ELP80	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的-ELP80	F8-500-Y1680C	ELP80	在 IC 的 C-端	

[0233] * 显色测定 / 凝血测定

[0234] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0235] 表 8. 具有经调节的 vWF 亲和力的融合蛋白

[0236]

名称	FVIII 部分	融合 配偶体	融合配偶体 的位置	比活 ($\mu\text{U}/\text{ng}$)*
F8-500-额外的 $\alpha 3$	F8-500	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	10.0**/n.d.
F8-500-额外的 $\alpha 3$ -His	F8-500-His	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	7.7**/n.d.
F8-500-Y1680F-额外的 $\alpha 3$	F8-500-Y1680F	$\alpha 3$	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-额外的 $\alpha 3$	F8-500-Y1680C	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	
F8-500- 额外的 $\alpha 3$ - $\Delta \alpha 3$	F8-500- $\Delta \alpha 3$	额外的 $\alpha 3$	在 $\alpha 3$ s 位置	
F8-500-C2 连接的-额外的 $\alpha 3$ (F8-500-额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2- 连接的-额外的 $\alpha 3$ (F8-500-Y1680F- 额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500-Y1680F	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 额外的 $\alpha 3$ (F8-500-Y1680C-额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500-Y1680C	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	

[0237] * 显色测定 / 凝血测定

[0238] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0239] 表 9. 其它融合蛋白

[0240]

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (ml/ng)*
F8-500-GHBP	F8-500	生长激素结合蛋白	在 B 结构域中	22.8**/n.d.
F8-GHBP-His	F8-500-His	生长激素结合蛋白	在 B 结构域中	7.6/4.5
F8-500-FIX298-342	F8-500	FIX 的 AS 298-342	在 B 结构域中	12.3**/n.d.
F8-500-FIX47-125	F8-500	FIX 的 AS 47-125	在 B 结构域中	18.0/n.d.
F8-500-FIX47-125-His	F8-500-His	FIX 的 AS 47-125	在 B 结构域中	14.4/13.3
F8-500-vWF1-272	F8-500	vWF 的 AS 1-272	在 B 结构域中	44.5**/n.d.
F8-500-vWF1-1390	F8-500	vWF 的 AS 1-1390	在 B 结构域中	16.0**/n.d.
F8-500-vWF497-716-R545A	F8-500	vWF 的 AS 497-716	在 B 结构域中	11.5/8.8
F8-500-vWF497-716-R545A-His	F8-500-His	vWF 的 AS 497-716	在 B 结构域中	236.9**/n.d.
F8-500-vWF 结合蛋白	F8-500	vWF 结合蛋白	在 B 结构域中	19.8**/n.d.
F8-500-hCG C-端-His	F8-500-His	hCG b-链的 28 个 C-端 AS	在 B 结构域中	11.4/n.d.
F8-500-hCG C-端- Δ a3	F8-500- Δ a3	hCG b-链的 28 个 C-端 AS	在 a3s 位置	18.2/n.d.
F8-500-F10AP	F8-500	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	22.5**/n.d.
F8-500-F10AP-His	F8-500-His	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	16.8/n.d.
F8-500-Y1680F-F10AP	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-F10AP	F8-500-Y1680C	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	
F8-500-F10AP- Δ a3	F8-500- Δ a3	hFX 的活化肽	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-F10AP (F8-500-F10AP-LC)	F8-500	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-F10AP (F8-500-Y1680F-F10AP-LC)	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-F10AP (F8-500-Y1680C-F10AP-LC)	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	

[0241] * 显色测定 / 凝血测定

[0242] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0243] 表 10. 具有经调节的脂质亲和力的融合蛋白

[0244]

名称	FVIII 部分	融合 配偶体	融合配 偶体的 位置	比活 ($\mu\text{U}/\text{ng}$)*
F8-500-额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-额外的 C2-His	F8-500-His	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-Y1680F-额外的 C2	F8-500-Y1680F	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-Y1680C-额外的 C2	F8-500-Y1680C	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500- 额外的 C2- Δa3	F8-500- Δa3	额外的 C2	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-(GGGS) ₆ - 额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 LC 的 C-端	8.3**/n. d.
F8-500-C2 连接的-GS- 额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 LC 的 C-端	7.7**/n. d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的- 额外的 C2	F8-500-Y1680F	额外的 C2	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的- 额外的 C2	F8-500-Y1680C	额外的 C2	在 LC 的 C-端	

[0245] * 显色测定 / 凝血测定

[0246] ** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

[0247] 表 11. 实施例 5 所述的纯化过程的典型收率

[0248]

样品	体积/ mL	活性/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	收率%	
			步骤	总计
培养物滤液	1650	17	100	100
步骤 1: 流出液(flow thru)	1650	3.5	21	~
步骤 1: 洗脱液合并液	14	1021	51	51
步骤 2: 流出液	133	19	17	~
步骤 2: 洗脱液合并液	8	820	45	23
步骤 3: 流出液	117	0.9	2	~
步骤 3: 洗脱液合并液	1.5	3000	69	16

[0249] 表 12. FVIII 构架和融合蛋白在 FVIII 缺陷型或 vWF 缺陷型小鼠中的体内半衰期

[0250]

名称	在 PV111 缺陷型小鼠中的半衰期(h)*	在 PV111 缺陷型小鼠中的延长倍数*	在 xW ^h 缺陷型小鼠中的半衰期(h)*	在 xW ^h 缺陷型小鼠中的延长倍数*
FR-500	4.5/0.3	n.d.	n.d./0.3	n.d.
FR-500-Δ ₂₃	0.3/0.3	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-His	n.d.	n.d.	0.1/0.1	n.d.
FR-500-Δ ₂₃ -His	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-Y168R	0.3/n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-Y168R ⁺	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-His-(125I)-Δ ₂₃	0.7/n.d.	2.3/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的 -(GGG)5'-at-(1gg23)	9.9/n.d.	2.2/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的 -(GGG)5'-at-(1gg23)	15.9/n.d.	3.5/n.d.	n.d./1.1	n.d/4
FR-500-112511	7.8/9.1	1.7/1.1	n.d.	n.d.
FR-500-112511-His	6.7/8.0	7/7	1.6/0.6	16/8
FR-500-112511-Δ ₂₃	1.4/n.d.	4.7/n.d.	n.d.	n.d.
40K-PEG-0- FR-500-112511-Δ ₂₃	12.0/n.d.	40/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的-(GGG)5'-112511	n.d/9.6	n.d./1.1	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的-(5'-112511)	8.0/n.d.	1.8/n.d.	n.d./0.8	n.d/3
FR-500-McyRI	9.2/9.7	2.0/1.1	n.d.	n.d.
FR-500-His-γ81-His	10/n.d.	2.2/n.d.	1.7/1.2	17/12
FR-500-McyRI-Δ ₂₃	0.2/n.d.	0.7/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-180-C86-6	8.2/8.3	1.4/0.7	n.d.	n.d.
FR-500-ABXN5-His	10.3/-	7/7	n.d./0.8	n.d/8
FR-600-His	n.d.	n.d.	0.1/0.2	1/2
FR-500-FIX47-125-His	5.3/5.3	7/7	n.d.	n.d.
FR-500-FIX47-His	n.d.	n.d.	1.0/0.8	10/8

[0251] * 显色测定 /ELISA。

[0001]

CPCHI261851P

序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 因子VIII融合蛋白

<130> 7920

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> 人类(homo sapiens)

<400> 1

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100 105 110

[0002]

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
305 310 315 320

[0003]

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
500 505 510

[0004]

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705 710 715 720

[0005]

Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
740 745 750

Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
755 760 765

Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
770 775 780

Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785 790 795 800

His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
805 810 815

Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
820 825 830

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
835 840 845

Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
850 855 860

Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865 870 875 880

Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
900 905 910

[0006]

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro		
915	920	925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp		
930	935	940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp		
945	950	955 960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys		
965	970	975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys		
980	985	990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala		
995	1000	1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu		
1010	1015	1020
Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu		
1025	1030	1035
Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp		
1040	1045	1050
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr		
1055	1060	1065
Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly		
1070	1075	1080
Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys		
1085	1090	1095
Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His		
1100	1105	1110

[0007]

Gly Lys	Asn Ser	Leu Asn	Ser	Gly Gln	Gly Pro	Ser	Pro Lys	Gln
1115			1120			1125		
Leu Val	Ser Leu	Gly Pro	Glu	Lys Ser	Val Glu	Gly	Gln Asn	Phe
1130			1135			1140		
Leu Ser	Glu Lys	Asn Lys	Val	Val Val	Gly Lys	Gly	Glu Phe	Thr
1145			1150			1155		
Lys Asp	Val Gly	Leu Lys	Glu	Met Val	Phe Pro	Ser	Ser Arg	Asn
1160			1165			1170		
Leu Phe	Leu Thr	Asn Leu	Asp	Asn Leu	His Glu	Asn	Asn Thr	His
1175			1180			1185		
Asn Gln	Glu Lys	Lys Ile	Gln	Glu Glu	Ile Glu	Lys	Lys Glu	Thr
1190			1195			1200		
Leu Ile	Gln Glu	Asn Val	Val	Leu Pro	Gln Ile	His	Thr Val	Thr
1205			1210			1215		
Gly Thr	Lys Asn	Phe Met	Lys	Asn Leu	Phe Leu	Leu	Ser Thr	Arg
1220			1225			1230		
Gln Asn	Val Glu	Gly Ser	Tyr	Asp Gly	Ala Tyr	Ala	Pro Val	Leu
1235			1240			1245		
Gln Asp	Phe Arg	Ser Leu	Asn	Asp Ser	Thr Asn	Arg	Thr Lys	Lys
1250			1255			1260		
His Thr	Ala His	Phe Ser	Lys	Lys Gly	Glu Glu	Glu	Asn Leu	Glu
1265			1270			1275		
Gly Leu	Gly Asn	Gln Thr	Lys	Gln Ile	Val Glu	Lys	Tyr Ala	Cys
1280			1285			1290		

[0008]

Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr		
1295	1300	1305
Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu		
1310	1315	1320
Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr		
1325	1330	1335
Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr		
1340	1345	1350
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser		
1355	1360	1365
Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala		
1370	1375	1380
Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser		
1385	1390	1395
Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser		
1400	1405	1410
Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val		
1415	1420	1425
Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu		
1430	1435	1440
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu		
1445	1450	1455
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys		
1460	1465	1470
Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr		
1475	1480	1485

[0009]

Ser Gly	Lys Val	Glu Leu	Leu	Pro Lys	Val His	Ile	Tyr Gln	Lys
1490			1495			1500		
Asp Leu	Phe Pro	Thr Glu	Thr	Ser Asn	Gly Ser	Pro	Gly His	Leu
1505			1510			1515		
Asp Leu	Val Glu	Gly Ser	Leu	Leu Gln	Gly Thr	Glu	Gly Ala	Ile
1520			1525			1530		
Lys Trp	Asn Glu	Ala Asn	Arg	Pro Gly	Lys Val	Pro	Phe Leu	Arg
1535			1540			1545		
Val Ala	Thr Glu	Ser Ser	Ala	Lys Thr	Pro Ser	Lys	Leu Leu	Asp
1550			1555			1560		
Pro Leu	Ala Trp	Asp Asn	His	Tyr Gly	Thr Gln	Ile	Pro Lys	Glu
1565			1570			1575		
Glu Trp	Lys Ser	Gln Glu	Lys	Ser Pro	Glu Lys	Thr	Ala Phe	Lys
1580			1585			1590		
Lys Lys	Asp Thr	Ile Leu	Ser	Leu Asn	Ala Cys	Glu	Ser Asn	His
1595			1600			1605		
Ala Ile	Ala Ala	Ile Asn	Glu	Gly Gln	Asn Lys	Pro	Glu Ile	Glu
1610			1615			1620		
Val Thr	Trp Ala	Lys Gln	Gly	Arg Thr	Glu Arg	Leu	Cys Ser	Gln
1625			1630			1635		
Asn Pro	Pro Val	Leu Lys	Arg	His Gln	Arg Glu	Ile	Thr Arg	Thr
1640			1645			1650		
Thr Leu	Gln Ser	Asp Gln	Glu	Glu Ile	Asp Tyr	Asp	Asp Thr	Ile
1655			1660			1665		

[0010]

Ser Val	Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr	Asp Glu Asp
1670	1675	1680
Glu Asn	Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr	Arg His Tyr
1685	1690	1695
Phe Ile	Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly	Met Ser Ser
1700	1705	1710
Ser Pro	His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly	Ser Val Pro
1715	1720	1725
Gln Phe	Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp	Gly Ser Phe
1730	1735	1740
Thr Gln	Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His	Leu Gly Leu
1745	1750	1755
Leu Gly	Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn	Ile Met Val
1760	1765	1770
Thr Phe	Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe	Tyr Ser Ser
1775	1780	1785
Leu Ile	Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala	Glu Pro Arg
1790	1795	1800
Lys Asn	Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr	Phe Trp Lys
1805	1810	1815
Val Gln	His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe	Asp Cys Lys
1820	1825	1830
Ala Trp	Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His
1835	1840	1845
Ser Gly	Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu
1850	1855	1860

[0011]

Asn Pro 1865	Ala His Gly Arg Gln 1870	Val Thr Val Gln Glu 1875	Phe Ala Leu
Phe Phe 1880	Thr Ile Phe Asp Glu 1885	Thr Lys Ser Trp Tyr 1890	Phe Thr Glu
Asn Met 1895	Glu Arg Asn Cys Arg 1900	Ala Pro Cys Asn Ile 1905	Gln Met Glu
Asp Pro 1910	Thr Phe Lys Glu Asn 1915	Tyr Arg Phe His Ala 1920	Ile Asn Gly
Tyr Ile 1925	Met Asp Thr Leu Pro 1930	Gly Leu Val Met Ala 1935	Gln Asp Gln
Arg Ile 1940	Arg Trp Tyr Leu Leu 1945	Ser Met Gly Ser Asn 1950	Glu Asn Ile
His Ser 1955	Ile His Phe Ser Gly 1960	His Val Phe Thr Val 1965	Arg Lys Lys
Glu Glu 1970	Tyr Lys Met Ala Leu 1975	Tyr Asn Leu Tyr Pro 1980	Gly Val Phe
Glu Thr 1985	Val Glu Met Leu Pro 1990	Ser Lys Ala Gly Ile 1995	Trp Arg Val
Glu Cys 2000	Leu Ile Gly Glu His 2005	Leu His Ala Gly Met 2010	Ser Thr Leu
Phe Leu 2015	Val Tyr Ser Asn Lys 2020	Cys Gln Thr Pro Leu 2025	Gly Met Ala
Ser Gly 2030	His Ile Arg Asp Phe 2035	Gln Ile Thr Ala Ser 2040	Gly Gln Tyr

[0012]

Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser		
2045	2050	2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val		
2060	2065	2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly		
2075	2080	2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile		
2090	2095	2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn		
2105	2110	2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser		
2120	2125	2130
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr		
2135	2140	2145
Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg		
2150	2155	2160
Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu		
2165	2170	2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser		
2180	2185	2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala		
2195	2200	2205
Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val		
2210	2215	2220
Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met		
2225	2230	2235

[0013]

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
2330

<210> 2
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 21个氨基酸的FVIII B结构域接头

<400> 2

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15

Lys Arg His Gln Arg
20

<210> 3
<211> 28

[0014]

<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> F8-500-His接头

<400> 3

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
20 25

<210> 4
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> F8-500- α a3 His接头

<400> 4

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
20 25

<210> 5
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> hFc

<400> 5

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Glu Pro Ser
1 5 10 15

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

[0015]

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
35 40 45

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
50 55 60

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
65 70 75 80

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
85 90 95

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
100 105 110

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
115 120 125

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
130 135 140

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
145 150 155 160

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
165 170 175

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
180 185 190

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
195 200 205

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215 220

[0016]

<210> 6
<211> 226
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> mFc

<400> 6

Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Ala Glu Gly Glu
1 5 10 15

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
20 25 30

Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
35 40 45

Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val Leu
50 55 60

Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Gln Ser Thr Leu Arg
65 70 75 80

Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
85 90 95

Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
100 105 110

Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
115 120 125

Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
130 135 140

Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
145 150 155 160

[0017]

Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
165 170 175

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
180 185 190

Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
195 200 205

Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
210 215 220

Gly Lys
225

<210> 7
<211> 585
<212> PRT
<213> 人类

<400> 7

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro
85 90 95

[0018]

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu		
100	105	110
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His		
115	120	125
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg		
130	135	140
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg		
145	150	155
		160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala		
165	170	175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser		
180	185	190
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu		
195	200	205
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro		
210	215	220
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys		
225	230	235
		240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp		
245	250	255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser		
260	265	270
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His		
275	280	285
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser		

[0019]

290	295	300
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala		
305	310	315 320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg		
325	330	335
Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr		
340	345	350
Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu		
355	360	365
Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro		
370	375	380
Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu		
385	390	395 400
Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro		
405	410	415
Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys		
420	425	430
Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys		
435	440	445
Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His		
450	455	460
Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser		
465	470	475 480
Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr		
485	490	495

[0020]

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val
565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu
580 585

<210> 8
<211> 678
<212> PRT
<213> 人类

<400> 8

Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
1 5 10 15

Thr Lys Cys Gln Ser Phe Arg Asp His Met Lys Ser Val Ile Pro Ser
20 25 30

Asp Gly Pro Ser Val Ala Cys Val Lys Lys Ala Ser Tyr Leu Asp Cys
35 40 45

Ile Arg Ala Ile Ala Ala Asn Glu Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ala
50 55 60

Gly Leu Val Tyr Asp Ala Tyr Leu Ala Pro Asn Asn Leu Lys Pro Val
65 70 75 80

[0021]

Val	Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr	Phe	Tyr	Ala
				85					90					95	
Val	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Gln	Met	Asn	Gln	Leu	Arg
			100					105					110		
Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Trp	Asn
			115				120					125			
Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg	Lys	Pro
	130					135					140				
Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly	Ser	Cys	Ala	Pro	Cys
145					150					155				160	
Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Cys	Pro	Gly	Cys
				165					170					175	
Gly	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ala	Phe	Lys
			180					185					190		
Cys	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Ser	Thr
		195					200					205			
Ile	Phe	Glu	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Arg	Asp	Gln	Tyr	Glu	Leu
	210					215					220				
Leu	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Lys	Asp	Cys
225					230					235				240	
His	Leu	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	His	Thr	Val	Val	Ala	Arg	Ser	Met	Gly
				245					250					255	
Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Glu	His
			260					265					270		

[0022]

Phe Gly Lys Asp Lys Ser Lys Glu Phe Gln Leu Phe Ser Ser Pro His
275 280 285

Gly Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala His Gly Phe Leu Lys Val
290 295 300

Pro Pro Arg Met Asp Ala Lys Met Tyr Leu Gly Tyr Glu Tyr Val Thr
305 310 315 320

Ala Ile Arg Asn Leu Arg Glu Gly Thr Cys Pro Glu Ala Pro Thr Asp
325 330 335

Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg Leu
340 345 350

Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys Val
355 360 365

Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu
370 375 380

Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly Lys
385 390 395 400

Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn
405 410 415

Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val Lys
420 425 430

Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser
435 440 445

Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly
450 455 460

Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser
465 470 475 480

[0023]

Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu
485 490 495

Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly
500 505 510

Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp
515 520 525

Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly Lys
530 535 540

Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Leu
545 550 555 560

Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn Cys
565 570 575

His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp Lys
580 585 590

Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe Gly
595 600 605

Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu
610 615 620

Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu
625 630 635 640

His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys
645 650 655

Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala
660 665 670

[0024]

Cys Thr Phe Arg Arg Pro
675

<210> 9
<211> 273
<212> PRT
<213> 人类

<400> 9

Gln Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val
1 5 10 15

Ser Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His
20 25 30

Leu Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr
35 40 45

Gln Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp
50 55 60

Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro
65 70 75 80

Ile Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser
85 90 95

Arg Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp
100 105 110

Lys Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala
115 120 125

Phe Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn
130 135 140

Ile Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg
145 150 155 160

[0025]

Tyr Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala
165 170 175

Pro Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu
180 185 190

Val Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu
195 200 205

Gln Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg
210 215 220

Asn Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser
225 230 235 240

Gly Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys
245 250 255

Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr
260 265 270

Pro

<210> 10
<211> 274
<212> PRT
<213> 人类

<400> 10

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
35 40 45

[0026]

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
85 90 95

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
100 105 110

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
210 215 220

Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240

[0027]

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
260 265 270

Ser Ser

<210> 11

<211> 274

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FcRn-H166K

<400> 11

Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
1 5 10 15

Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
20 25 30

Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
35 40 45

Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
50 55 60

Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
65 70 75 80

Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
85 90 95

Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
100 105 110

[0028]

Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
115 120 125

Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
130 135 140

Asp Lys Ala Ala Asn Lys Gln Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
145 150 155 160

His Arg Leu Arg Glu Lys Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
165 170 175

Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
180 185 190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
195 200 205

Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
210 215 220

Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
225 230 235 240

Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
245 250 255

Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
260 265 270

Ser Ser

<210> 12

<211> 79

<212> PRT

<213> 人工

<220>

[0029]

<223> LRP-CR5-6

<400> 12

Thr	Cys	Pro	Pro	Asn	Gln	Phe	Ser	Cys	Ala	Ser	Gly	Arg	Cys	Ile	Pro
1				5					10					15	

Ile	Ser	Trp	Thr	Cys	Asp	Leu	Asp	Asp	Asp	Cys	Gly	Asp	Arg	Ser	Asp
			20					25					30		

Glu	Ser	Ala	Ser	Cys	Ala	Tyr	Pro	Thr	Cys	Phe	Pro	Leu	Thr	Gln	Phe
		35					40					45			

Thr	Cys	Asn	Asn	Gly	Arg	Cys	Ile	Asn	Ile	Asn	Trp	Arg	Cys	Asp	Asn
	50					55					60				

Asp	Asn	Asp	Cys	Gly	Asp	Asn	Ser	Asp	Glu	Ala	Gly	Cys	Ser	His	
65					70					75					

<210> 13

<211> 83

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LRP-CR6-7

<400> 13

Thr	Cys	Phe	Pro	Leu	Thr	Gln	Phe	Thr	Cys	Asn	Asn	Gly	Arg	Cys	Ile
1				5						10				15	

Asn	Ile	Asn	Trp	Arg	Cys	Asp	Asn	Asp	Asn	Asp	Cys	Gly	Asp	Asn	Ser
			20					25					30		

Asp	Glu	Ala	Gly	Cys	Ser	His	Ser	Cys	Ser	Ser	Thr	Gln	Phe	Lys	Cys
		35					40					45			

Asn	Ser	Gly	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	His	Trp	Thr	Cys	Asp	Gly	Asp	Asn
	50					55					60				

[0030]

Asp Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Thr His Ala Asn Cys Thr Asn Gln
65 70 75 80

Ala Thr Arg

<210> 14

<211> 39

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LRP-CR6

<400> 14

Thr Cys Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile
1 5 10 15

Asn Ile Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser
20 25 30

Asp Glu Ala Gly Cys Ser His
35

<210> 15

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SC抗GP111a-1-HC-LC

<400> 15

Met Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
20 25 30

Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Met Gly Leu
35 40 45

[0031]

Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Asn	Leu	Val	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser
50						55					60				
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Asp
65						70				75					80
Ser	Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Val	Gln	Tyr	Ala	Gln	Leu	Pro
				85					90					95	
Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Lys	Leu	Gly	Gly	Gly	Gly
			100					105					110		
Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asn	Ser	Val	Gln	Leu
		115					120					125			
Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Leu
	130					135					140				
Ser	Cys	Thr	Ala	Ser	Gly	Phe	Asn	Ile	Lys	Asp	Thr	Tyr	Val	His	Trp
145					150					155					160
Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Glu	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Arg	Ile	Asp
				165					170					175	
Pro	Ala	Asn	Gly	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Asp	Pro	Lys	Phe	Gln	Gly	Lys	Ala
			180					185					190		
Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln	Leu	Ser
		195					200					205			
Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	Pro	Leu
	210					215					220				
Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr
225					230					235					240

[0032]

Val Ser Ser

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 接头-SC抗GPIIIa-1-HC-LC

<400> 16

Met Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
20 25 30

Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Met Gly Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Gly Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp
65 70 75 80

Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Leu Pro
85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Lys Leu Gly Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Gln Leu
115 120 125

Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
130 135 140

[0033]

Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Val His Trp
145 150 155 160

Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
165 170 175

Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala
180 185 190

Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser
195 200 205

Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Leu
210 215 220

Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
225 230 235 240

Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
245 250 255

Gly Ser

<210> 17
<211> 248
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> SC抗GPIIIa-2-HC-LC

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

[0034]

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
130 135 140

Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
145 150 155 160

Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe
165 170 175

Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser
180 185 190

Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
195 200 205

Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
210 215 220

Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser
225 230 235 240

[0035]

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
245

<210> 18

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SC抗GPIIIa-2-LC-HC

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
130 135 140

[0036]

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
145 150 155 160

Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
165 170 175

Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
180 185 190

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
195 200 205

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
210 215 220

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
245

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> ABD035

<400> 19

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1 5 10 15

Val Ser Asp Phe Tyr Lys Arg Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu
20 25 30

Gly Val Glu Ala Leu Lys Leu His Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35 40 45

[0037]

<210> 20
<211> 865
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 序列A

<400> 20

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
20 25 30

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
65 70 75 80

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
85 90 95

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala
100 105 110

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
115 120 125

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
130 135 140

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala
145 150 155 160

[0038]

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
165 170 175

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
180 185 190

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
195 200 205

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
210 215 220

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
225 230 235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
245 250 255

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
275 280 285

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu
290 295 300

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly
305 310 315 320

Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
325 330 335

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
340 345 350

[0039]

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu
355 360 365

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
370 375 380

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr
385 390 395 400

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
405 410 415

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
420 425 430

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
435 440 445

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
450 455 460

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
465 470 475 480

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
485 490 495

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
500 505 510

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
515 520 525

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala
530 535 540

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
545 550 555 560

[0040]

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
565 570 575

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro
580 585 590

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
595 600 605

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro
610 615 620

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr
625 630 635 640

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
645 650 655

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
660 665 670

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu
675 680 685

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
690 695 700

Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu
705 710 715 720

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu
725 730 735

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
740 745 750

[0041]

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro
755 760 765

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro
770 775 780

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr
785 790 795 800

Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
805 810 815

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro
820 825 830

Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro
835 840 845

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro
850 855 860

Gly
865

<210> 21
<211> 400
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> ELP80

<400> 21

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly
1 5 10 15

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
20 25 30

[0042]

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
85 90 95

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
115 120 125

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
130 135 140

Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly
165 170 175

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
180 185 190

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
195 200 205

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
210 215 220

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val
225 230 235 240

[0043]

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
245 250 255

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
260 265 270

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
275 280 285

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
290 295 300

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
305 310 315 320

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
325 330 335

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
340 345 350

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
355 360 365

Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
370 375 380

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala
385 390 395 400

<210> 22
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 额外的a3

[0044]

<400> 22

Glu	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1				5					10					15	

Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr
			20					25						30	

Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg
		35				40		

<210> 23

<211> 238

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GHBP

<400> 23

Phe	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Thr	Ala	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Ala	Pro	Trp
1				5					10					15	

Ser	Leu	Gln	Ser	Val	Asn	Pro	Gly	Leu	Lys	Thr	Asn	Ser	Ser	Lys	Glu
				20				25						30	

Pro	Lys	Phe	Thr	Lys	Cys	Arg	Ser	Pro	Glu	Arg	Glu	Thr	Phe	Ser	Cys
				35			40						45		

His	Trp	Thr	Asp	Glu	Val	His	His	Gly	Thr	Lys	Asn	Leu	Gly	Pro	Ile
	50						55				60				

Gln	Leu	Phe	Tyr	Thr	Arg	Arg	Asn	Thr	Gln	Glu	Trp	Thr	Gln	Glu	Trp
65					70				75					80	

Lys	Glu	Cys	Pro	Asp	Tyr	Val	Ser	Ala	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Tyr	Phe
				85					90					95	

Asn	Ser	Ser	Phe	Thr	Ser	Ile	Trp	Ile	Pro	Tyr	Cys	Ile	Lys	Leu	Thr
				100				105					110		

[0045]

Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile
115 120 125

Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val
130 135 140

Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro
145 150 155 160

Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu
165 170 175

Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile
180 185 190

Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr
195 200 205

Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu
210 215 220

Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln
225 230 235

<210> 24

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FIX298-342

<400> 24

Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val
1 5 10 15

Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro
20 25 30

[0046]

Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe
 35 40 45

<210> 25
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> FIX47-125

<400> 25

Asp Asp Gly Asp Gln Cys Glu Ser Asn Pro Cys Leu Asn Gly Gly Ser
 1 5 10 15

Cys Lys Asp Asp Ile Asn Ser Tyr Glu Cys Trp Cys Pro Phe Gly Phe
 20 25 30

Glu Gly Lys Asn Cys Glu Leu Asp Val Thr Cys Asn Ile Lys Asn Gly
 35 40 45

Arg Cys Glu Gln Phe Cys Lys Asn Ser Ala Asp Asn Lys Val Val Cys
 50 55 60

Ser Cys Thr Glu Gly Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu
 65 70 75 80

<210> 26
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> vWF1-272

<400> 26

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15

[0047]

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
180 185 190

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195 200 205

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210 215 220

[0048]

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225 230 235 240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245 250 255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260 265 270

<210> 27

<211> 1390

<212> PRT

<213> 人类

<400> 27

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr

[0049]

115	120	125
Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile		
130	135	140
Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys		
145	150	155 160
Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly		
	165	170 175
Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val		
	180	185 190
Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser		
	195	200 205
Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr		
	210	215 220
Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln		
225	230	235 240
Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val		
	245	250 255
Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg		
	260	265 270
Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met		
	275	280 285
Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val		
	290	295 300
Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val		
305	310	315 320

[0050]

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
465 470 475 480

Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
485 490 495

Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
500 505 510

Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala

[0051]

515	520	525
Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu 530	535	540
Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp 545	550	555 560
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu 565	570	575
Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala 580	585	590
Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys 595	600	605
Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser 610	615	620
Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly 625	630	635 640
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His 645	650	655
Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn 660	665	670
Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp 675	680	685
Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro 690	695	700
Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu 705	710	715 720

[0052]

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
725 730 735

Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
740 745 750

Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
755 760 765

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
770 775 780

Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
785 790 795 800

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
805 810 815

Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
820 825 830

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
835 840 845

Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
850 855 860

Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
865 870 875 880

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
885 890 895

Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Gln Gly Leu
900 905 910

Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp

[0053]

915	920	925
Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe 930	935	940
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile 945	950	955 960
Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr 965	970	975
Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu 980	985	990
Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly 995	1000	1005
Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His 1010	1015	1020
Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr 1025	1030	1035
Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg 1040	1045	1050
Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr 1055	1060	1065
Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser 1070	1075	1080
Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val 1085	1090	1095
Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val 1100	1105	1110

[0054]

Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp	Gly Asn Glu Lys Arg	Pro Gly Asp
1115	1120	1125
Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln	Cys His Thr Val Thr	Cys Gln Pro
1130	1135	1140
Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys	Ser His Arg Val Asn	Cys Asp Arg
1145	1150	1155
Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro	Asn Ser Gln Ser Pro	Val Lys Val
1160	1165	1170
Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg	Trp Thr Cys Pro Cys	Val Cys Thr
1175	1180	1185
Gly Ser Ser Thr Arg His Ile	Val Thr Phe Asp Gly	Gln Asn Phe
1190	1195	1200
Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser	Tyr Val Leu Phe Gln	Asn Lys Glu
1205	1210	1215
Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu	His Asn Gly Ala Cys	Ser Pro Gly
1220	1225	1230
Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys	Ser Ile Glu Val Lys	His Ser Ala
1235	1240	1245
Leu Ser Val Glu Leu His Ser	Asp Met Glu Val Thr	Val Asn Gly
1250	1255	1260
Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr	Val Gly Gly Asn Met	Glu Val Asn
1265	1270	1275
Val Tyr Gly Ala Ile Met His	Glu Val Arg Phe Asn	His Leu Gly
1280	1285	1290
His Ile Phe Thr Phe Thr Pro	Gln Asn Asn Glu Phe	Gln Leu Gln

[0055]

1295	1300	1305
Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly		
1310	1315	1320
Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly		
1325	1330	1335
Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val		
1340	1345	1350
Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys		
1355	1360	1365
Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu		
1370	1375	1380
Phe Ala Glu Cys His Lys Val		
1385	1390	
<210> 28		
<211> 220		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> vWF497-716-R545A		
<400> 28		
Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu		
1	5	10 15
Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala		
20	25	30
Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu		
35	40	45
Ala Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp		

[0056]

50	55	60
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu		
65	70	75 80
Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala		
85	90	95
Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys		
100	105	110
Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser		
115	120	125
Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly		
130	135	140
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His		
145	150	155 160
Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn		
165	170	175
Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp		
180	185	190
Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro		
195	200	205
Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly		
210	215	220
<210> 29		
<211> 269		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 29		

[0057]

Asn	Pro	Glu	Leu	Lys	Asp	Phe	Asn	Glu	Glu	Glu	Gln	Leu	Lys	Cys	Asp
1				5				10					15		
Leu	Glu	Leu	Asn	Lys	Leu	Glu	Asn	Gln	Ile	Leu	Met	Leu	Gly	Lys	Thr
			20					25					30		
Phe	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Arg	Asp	Asp	Val	Glu	Ser	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
		35				40						45			
Asp	Leu	Ile	Met	Gly	Tyr	Lys	Asp	Glu	Glu	Arg	Ala	Asn	Lys	Lys	Ala
	50					55				60					
Val	Asn	Lys	Arg	Met	Leu	Glu	Asn	Lys	Lys	Glu	Asp	Leu	Glu	Thr	Ile
65				70						75				80	
Ile	Asp	Glu	Phe	Phe	Ser	Asp	Ile	Asp	Lys	Thr	Arg	Pro	Asn	Asn	Ile
			85						90					95	
Pro	Val	Leu	Glu	Asp	Glu	Lys	Gln	Glu	Glu	Lys	Asn	His	Lys	Asn	Met
		100						105						110	
Ala	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	Thr	Glu	Ala	Ala	Lys	Ser	Asp	Glu	Ser	Lys
		115						120					125		
Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Lys	Arg	Ser	Leu	Asn	Thr	Gln	Asn	His	Lys	Pro
	130					135						140			
Ala	Ser	Gln	Glu	Val	Ser	Glu	Gln	Gln	Lys	Ala	Glu	Tyr	Asp	Lys	Arg
145				150						155				160	
Ala	Glu	Glu	Arg	Lys	Ala	Arg	Phe	Leu	Asp	Asn	Gln	Lys	Ile	Lys	Lys
			165					170					175		
Thr	Pro	Val	Val	Ser	Leu	Glu	Tyr	Asp	Phe	Glu	His	Lys	Gln	Arg	Ile
		180						185					190		
Asp	Asn	Glu	Asn	Asp	Lys	Lys	Leu	Val	Val	Ser	Ala	Pro	Thr	Lys	Lys
		195					200					205			

[0058]

Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met
210 215 220

Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro
225 230 235 240

Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr
245 250 255

His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn
260 265

<210> 30
<211> 28
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> hCG C-端

<400> 30

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> 31
<211> 50
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> F10AP

<400> 31

Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile
1 5 10 15

[0059]

Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro
20 25 30

Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn
35 40 45

Asn Leu
50