



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103739712 B

(45)授权公告日 2016.10.05

(21)申请号 201310596839.1

C12P 21/02(2006.01)

(22)申请日 2009.06.24

A61K 38/37(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61K 38/36(2006.01)

申请公布号 CN 103739712 A

A61K 47/48(2006.01)

(43)申请公布日 2014.04.23

A61K 48/00(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 7/04(2006.01)

08011429.1 2008.06.24 EP

C07K 1/107(2006.01)

(62)分案原申请数据

(56)对比文件

200980123818.X 2009.06.24

WO 0179271 A1,2001.10.25,

(73)专利权人 德国杰特贝林生物制品有限公司

PFISTERSHAMMER KATHARINA,ET

地址 德国马尔堡

AL..Recombinant factor VIII and factor VIII-von Willebrand factor complex do not present danger signals for human dendritic cells.《THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS》.2006,第96卷(第3期),第55-66页.

(72)发明人 T·魏默 S·舒尔特

H·米兹尼尔 U·克龙塞勒

H·林德 W·朗

E. L. SAENKO,et al..Strategies towards a longer acting factor VIII.《Haemophilia》.2006,第12卷(第3期),第42-51页.

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

审查员 高赞

(51)Int.Cl.

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

C12N 15/85(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

权利要求书4页 说明书24页

序列表48页 附图3页

(54)发明名称

具有延长的体内半衰期的因子VIII、冯·维勒布兰德因子或它们的复合物

组蛋白及它们的衍生物的方法。本发明还涉及用于人基因治疗的转移载体,其包括该修饰的核酸序列。

(57)摘要

本发明涉及:编码凝血因子VIII(FVIII)及冯·维勒布兰德因子(VWF)以及它们的复合物及它们的衍生物的修饰的核酸序列,含该核酸序列的重组表达载体,用该重组表达载体转化的宿主细胞,所述核酸序列编码的重组多肽及衍生物,所述重组多肽及衍生物具有生物活性,及相比未修饰的野生型蛋白具有延长的体内半衰期和/或提高的体内恢复。本发明还涉及导致提高的表达产率的相应FVIII序列。本发明还涉及制备该重

1. 复合物,其包括:因子FVIII(FVIII)及冯·维勒布兰德因子(VWF),或其独立多肽成分之一,其中所述复合物的至少一种多肽成分或其独立成分中的至少一种于野生型成熟FVIII的氨基酸2332处或于野生型成熟VWF的氨基酸2050处融合到加长半衰期的多肽的N-端部分,并且其中所述加长半衰期的多肽是白蛋白。

2. 修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

所述修饰的FVIII于野生型成熟FVIII的氨基酸2332处融合到加长半衰期的多肽的N-端部分,或

所述修饰的VWF于野生型成熟VWF的氨基酸2050处融合到加长半衰期的多肽的N-端部分;

并且其中所述加长半衰期的多肽是白蛋白。

3. 权利要求2的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

(a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的功能半衰期延长的功能半衰期,或

(b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的功能半衰期延长的功能半衰期,或

(c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期,或

(d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期,或

(e)所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期。

4. 权利要求3的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

所述修饰的FVIII/VWF具有相比相应野生型FVIII/VWF的功能半衰期增加至少25%的功能半衰期,或

包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的功能半衰期增加至少25%的功能半衰期。

5. 权利要求2的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中

(a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

(b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

(c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

(d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF

的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

(e)所述包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期。

6. 权利要求5的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

所述修饰的FVIII/VWF具有相比相应野生型FVIII/VWF的抗原半衰期增加至少25%的抗原半衰期,或

包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期增加至少25%的抗原半衰期。

7. 权利要求2的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中

(a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的体内恢复增加的体内恢复,或

(b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的体内恢复增加的体内恢复,或

(c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复,或

(d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复,或

(e)所述包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复。

8. 权利要求7的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

所述修饰的FVIII/VWF具有相比相应野生型FVIII/VWF的体内恢复增加至少10%的体内恢复,或

包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物增加至少10%的体内恢复。

9. 权利要求2的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中所述复合物的至少一种多肽成分于野生型成熟FVIII的氨基酸2332处或于野生型成熟VWF的氨基酸2050处融合到加长半衰期的多肽的N-端氨基酸。

10. 权利要求2的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

所述修饰的FVIII/VWF具有野生型FVIII/VWF的生物活性的至少10%,或

包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复

合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的生物活性的至少10%。

11. 权利要求2中定义的修饰的FVIII,其中所述修饰的FVIII以比野生型FVIII更高产率由哺乳动物细胞分泌。

12. 多核苷酸或多核苷酸组,其编码权利要求2~10中任一项的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物。

13. 包括权利要求12的多核苷酸的载体或者包括权利要求12的多核苷酸组的载体组。

14. 权利要求13的载体或者载体组,所述载体是表达载体。

15. 权利要求13的载体或载体组,其为用于人基因治疗的转移载体。

16. 包括权利要求12的多核苷酸的质粒或者包括权利要求12的多核苷酸组的质粒组。

17. 权利要求16的质粒或者质粒组,所述质粒是表达载体。

18. 宿主细胞,其包括:

权利要求12的多核苷酸或多核苷酸组,或者

权利要求13~15中任一项的载体或者载体组,或者

权利要求16或17的质粒或者质粒组。

19. 产生修饰的VWF的方法,包括:

(a) 在所述修饰的VWF表达的条件下培养权利要求18的宿主细胞;及

(b) 任选从宿主细胞或从培养基回收所述修饰的VWF。

20. 药物组合物,其包括:

权利要求2~10中任一项的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,

权利要求13~15中任一项的载体或者载体组,或者

权利要求16或17的质粒或者质粒组。

21. 下列用于制备治疗血凝集障碍的药物的用途:

权利要求2~10中任一项的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,

权利要求13~15中任一项的载体或者载体组,

权利要求16或17的质粒或者质粒组,

或者

权利要求18的宿主细胞,

其中所述血凝集障碍选自血友病A或冯·维勒布兰德病。

22. 权利要求21的用途,其中所述血凝集障碍是血友病A。

23. 权利要求21的用途,其中所述血凝集障碍是冯·维勒布兰德病。

24. 权利要求21~23中任一项的用途,其中所述治疗包括人基因治疗。

25. 制备具有增加的功能半衰期的修饰的FVIII或修饰的VWF的方法,包括将加长半衰期的多肽的N-端部分融合到野生型成熟FVIII的氨基酸2332处或融合到野生型成熟VWF的

氨基酸2050处,其中所述加长半衰期的多肽是白蛋白。

26. 制备下列复合物的方法:

包括修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,或者

包括非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者

包括修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,

如下制备:

混合通过权利要求25的方法制备的修饰的FVIII与野生型VWF,或

混合野生型FVIII与通过权利要求25的方法制备的修饰的VWF,或

混合通过权利要求25的方法制备的修饰的FVIII与修饰的VWF。

27. 下列物质用于制备同时、分开或依次用于治疗出血障碍的联合药物制剂的用途:

(a)通过权利要求25的方法制备的修饰的FVIII及野生型VWF,或

(b)野生型FVIII及通过权利要求25的方法制备的修饰的VWF,或

(c)通过权利要求25的方法制备的修饰的FVIII及通过权利要求25的方法制备的修饰的VWF,

其中所述出血障碍选自血友病A和冯·维勒布兰德病。

具有延长的体内半衰期的因子VIII、冯·维勒布兰德因子或它们的复合物

[0001] 本申请是申请日为2009年6月24日、申请号为200980123818.X、发明名称为“具有延长的体内半衰期的因子VIII、冯·维勒布兰德因子或它们的复合物”的中国发明专利申请的分案申请。

【技术领域】

[0002] 本发明涉及编码凝血因子VIII(FVIII)及冯·维勒布兰德因子(VWF)以及它们的复合物及它们的衍生物的修饰的核酸序列,含该核酸序列的重组表达载体,用该重组表达载体转化的宿主细胞,所述核酸序列编码的重组多肽及衍生物,所述重组多肽及衍生物具有生物活性,及相比未修饰的野生型蛋白具有延长的体内半衰期和/或提高的体内恢复。本发明还涉及导致提高的表达产率的相应FVIII序列。本发明还涉及制备该重组蛋白及它们的衍生物的方法。本发明还涉及用于人基因治疗的转移载体,其包括该修饰的核酸序列。

【背景技术】

[0003] 有各种出血障碍凝血因子缺陷引发。最常见的障碍是血友病A及B,分别由凝血因子VIII及IX缺陷所致。另一已知的出血障碍是冯·维勒布兰德病。

[0004] 在血浆中,FVIII大多以与VWF的非共价复合物形式存在,及其促凝剂功能加速因子X到Xa的因子IXa依赖的转变。由于FVIII与VWF的复合物形成,长时间认为,FVIII与VWF功能是一分子的2个功能。到了七十年代才得知FVIII与VWF是在生理条件下形成复合物的独立的分子。到了八十年代测定出约0.2nmol/L的解离常数(Leyte et al.,Biochem J1989,257:679-683),及研究了2种分子的DNA序列。

[0005] 经典的血友病或血友病A是遗传的出血障碍。其由凝血因子FVIII的染色体X-连锁的缺陷所致,及以每10,000个人介于1个和2个个体之间的发病率几乎仅影响男性。X-染色体缺陷可被本身不是血友病患者的女性携带者传递。血友病A的临床表现是增加的出血趋势。用FVIII浓缩物治疗之前,患严重的血友病的人的平均寿命少于20年。自血浆的FVIII浓缩物的使用显著改善了血友病A患者的状况,大大增加了平均寿命,假设他们中的大部分活大致正常寿命的可能性。但是,已有某些有关源于血浆的浓缩物及它们的使用的问题,其中最严重的问题是病毒传播。迄今,导致乙型肝炎,非甲非乙型肝炎及AIDS的病毒已经严重危害人群。从此以后,已新开发了不同的病毒灭活方法及新的高度纯化的FVIII浓缩物,它们也对于血浆来源的FVIII建立了非常高的安全标准。

[0006] FVIII的cDNA的克隆(Wood et al.1984.Nature312:330-336;Vehar et al.1984.Nature312:337-342)使重组表达FVIII成为可能,导致开发了几种重组FVIII产物,它们已在1992和2003之间被有关机关批准。位于氨基酸Arg-740和Glu-1649之间的FVIII多肽链的中央B结构域对于全生物活性似乎不是必需的事实也导致开发了删除了B结构域的FVIII。

[0007] 成熟的FVIII分子由2332个氨基酸构成,其可分为3个同源A结构域,2个同源C结构

域及1个B结构域,它们以下列顺序排列:A1-A2-B-A3-C1-C2。成熟的人FVIII的完整氨基酸序列示于SEQ ID NO:15。在其分泌到血浆的过程中,FVIII被细胞内加工为一系列金属-离子连接的异源二聚体作为单链FVIII,其在B-A3边界及在B-结构域内的不同位点被切割。此加工产生由A1,A2及B-结构域的不同部分构成的异源重链分子,其具有90kD~200kDa的分子大小。此重链经金属离子结合到轻链,所述轻链由A3,C1及C2结构域构成(Saenko et al. 2002. Vox Sang. 83:89-96)。在血浆中,此异源二聚体FVIII以高亲和性结合冯·维勒布兰德因子(VWF),其保护其免于成熟前分解代谢。在血浆中非活化的FVIII结合VWF的半衰期为约12小时。

[0008] 通过由FXa及凝血酶在重链内的氨基酸Arg372及Arg740,及在轻链中的Arg1689蛋白水解切割活化凝血因子FVIII,导致冯·维勒布兰德因子释放及产生活化的FVIII异源二聚体,其会在磷脂表面上与FIXa及FX形成tenase复合物,前提是Ca²⁺存在。异源二聚体由A1结构域(50kDa片段),A2结构域(43kDa片段)及轻链(A3-C1-C2)(73kDa片段)构成。因此,活化形式的FVIII(FVIIIa)由通过二价金属离子连接物与经凝血酶切割的A3-C1-C2轻链连接的A1-亚基及与A1及A3结构域相对松散连接的游离A2亚基构成。

[0009] 为避免过量凝集,FVIIIa必需在活化之后很快灭活。经活化的蛋白C(APC)通过在Arg336及Arg562切割的FVIIIa灭活不被认为是主要的限速步骤。反倒是非共价附着的A2亚基从异源二聚体解离是凝血酶活化之后FVIIIa灭活中的限速步骤(Fay et al. 1991. J. Biol. Chem. 266:8957, Fay & Smudzin 1992. J. Biol. Chem. 267:13246-50)。这是很快的过程,其解释血浆中FVIIIa的短半衰期,其仅2.1分钟(Saenko et al. 2002. Vox Sang. 83:89-96)。

[0010] 由于FVIII的约12~14小时的短血浆半衰期,严重的血友病A患者经历预防性治疗FVIII必需每周静脉内(i.v.)施用约3次。每次静脉内施用都麻烦,伴随疼痛及承担感染的风险,尤其是被诊断为血友病A的患者自己或儿童的父母在家进行时。

[0011] 因此非常需要制造出允许制备含FVIII的药物组合物的具有增加的功能半衰期的FVIII,其必需低频率施用。

[0012] 已做了几种尝试,即通过如下手段延长非活化的FVIII的半衰期:减少其与细胞受体的相互作用(W003/093313A2,W002/060951A2),将聚合物共价附着到FVIII(W094/15625,W097/11957及US4970300),包裹FVIII(W099/55306),导入新的金属结合位点(W097/03193),通过肽键(W097/40145及W003/087355)或二硫键(W002/103024A2)将A2结构域共价附着到A3结构域,或将A1结构域共价附着到A2结构域(W02006/108590)。

[0013] 增加FVIII或VWF的功能半衰期的其他方法是FVIII的PEG化(W02007/126808,W02006/053299,W02004/075923)或VWF的PEG化(W02006/071801),具有增加的半衰期的PEG化的VWF还会间接增加血浆中存在的FVIII的半衰期。

[0014] 由于以上所列方法中尚未有一种方法得到获得批准的FVIII药物,且由于向FVIII野生型序列导入突变或导入化学修饰至少要承担产生免疫原性FVIII变体的理论风险,因此仍需要开发呈现延长的半衰期的修饰的凝血因子VIII分子。

[0015] 鉴于潜在的血栓形成风险,相比延长FVIIIa的半衰期,更期望延长非活化形式的FVIII的半衰期。

[0016] 有缺失,功能上有缺陷或仅以减少的量在不同形式的冯·维勒布兰德病(VWD)中

可用的VWF是哺乳动物血浆中存在的多聚体粘着糖蛋白,其有多种生理功能。初次止血期间,VWF发挥血小板表面上的特异受体与细胞外基质成分(例如胶原)之间的介质的作用。而且,VWF发挥促凝剂FVIII的载质及稳定蛋白的作用。VWF在内皮细胞及巨核细胞中合成为2813个氨基酸的前体分子。野生型VWF的氨基酸序列及cDNA序列公开于Collins et al.1987,Proc Natl.Acad.Sci.USA84:4393-4397。前体多肽,前原VWF,由见于成熟的血浆VWF的22个残基的信号肽,741个残基的原肽及2050个残基的多肽构成(Fischer et al.,FEBS Lett.351:345-348,1994)。在内质网切割信号肽之后,在2个VWF单体之间形成C-端二硫桥。在转运通过分泌通路期间添加12个N联的及10个O联的碳水化合物侧链。更重要的是,VWF二聚体经N-端二硫桥多聚化,及在晚期高尔基体中用酶PACE/弗林蛋白酶切割下741个氨基酸长度的原肽。VWF(VWF-HMWM)的原肽以及高分子量多聚体储存在内皮细胞的魏伯尔-帕拉德小体内或血小板的 α -颗粒内。

[0017] 一旦分泌到血浆中,蛋白酶ADAMTS13在VWF的A1结构域内切割VWF。血浆VWF因此由整个范围的多聚体构成,所述范围从500kDa的单个二聚体到由分子量超过10,000kDa的达多于20个二聚体构成的多聚体。VWF-HMWM因此具有最强的止血剂活性,其可以利托菌素辅因子活性(VWF:RCO)测量。VWF:RCO/VWF抗原比越高,高分子量多聚体的相对量越高。

[0018] VWF中的缺陷引发冯·维勒布兰德病(VWD),其特征在于多少显著的出血表型。3型VWD是最严重形式,其中VWF完全缺失,1型VWD涉及定量丧失VWF,且其表型可非常微小。2型VWD涉及VWF的定性缺陷,且可严重如3型VWD。2型VWD有许多亚型,其中一些关联于高分子量多聚体的缺失或减少。2a型Von WWD的特征在于缺失中等的及大的多聚体。2B型VWD的特征在于缺失最高分子量的多聚体。VWD是人最常见的遗传出血障碍,且可通过用含质粒或重组来源的VWF的浓缩物的取代疗法治疗。VWF可从人血浆中制备,例如描述于EP05503991。EP0784632描述了分离重组VWF的方法。

[0019] 血浆中FVIII以高亲和性结合von VWF,其保护其免于成熟前分解代谢,及因此除了其初次止血中的作用之外,还在调节血浆FVIII水平中起关键作用,结果还是控制二次止血的中心因子。血浆中非活化的FVIII束缚于VWF的半衰期为约12~14小时。3型冯·维勒布兰德病中,无或几乎不存在VWF,FVIII的半衰期仅为约6小时,由于FVIII的降低的浓度,该患者中导致微小到温和的血友病A的症状。VWF对FVIII的稳定作用还用于辅助CHO细胞中FVIII的重组表达(Kaufman et al.1989,Mol Cell Biol)。

[0020] 而今,血友病A及VWD的标准治疗涉及频频静脉输注FVIII制剂及VWF浓缩物或包括源于人供者血浆的FVIII及VWF的复合物的浓缩物,或在FVIII的情况中,基于重组FVIII的药物制剂。同时这些取代疗法一般有效,例如在经历预防性治疗的严重的血友病A患者中,由于约12小时的FVIII的短血浆半衰期,FVIII必需每周静脉内(i.v.)施用约3次。非血友病患者中上述1%的FVIII活性水平,例如通过升高0.01U/ml的FVIII水平,将严重的血友病A转变为温和的血友病A。在预防性治疗中,剂量方案设计为FVIII活性的低谷水平不降到非血友病患者中FVIII活性的2~3%水平以下。每次静脉内施用都麻烦,伴随疼痛及承担感染的风险,尤其是常在由被诊断为患血友病A的患者自身或儿童的父母进行的家中治疗中。此外,频频静脉内注射不可避免地导致瘢痕形成,干扰将来的输注。由于严重的血友病的预防性治疗开始于生命的早期,儿童常常小于2岁,这更难以每周注射FVIII3次到那么小的患者的静脉内。对于受限的时期,端口系统的植入常为替代性方法。尽管重复的感染可发生,

且端口可导致身体运动期间的不便,然而他们通常认为相比静脉内注射有利。

[0021] 人循环中人VWF的体内半衰期为约12~20小时。在VWD(例如3型)的预防性治疗中还高度希望发现延长VWF的功能半衰期的方法。另一加长VWF的功能半衰期的方法是PEG化(W02006/071801),PEG化的VWF有增加的半衰期,其还间接加长血浆中存在的FVIII的半衰期。

[0022] 但是,PEG或其他分子与治疗性蛋白的化学缀合总是要承担如下风险,由于与其他蛋白的重要相互作用位点被罩住,特异活性降低,化学缀合在制备该蛋白中增加了额外的步骤,降低了最终产率及加大的制备的成本。对人健康的长效影响也不清楚,因为目前已知的PEG化的治疗性蛋白不是如在冯·维勒布兰德病的预防中施用的VWF或在血友病A中施用的FVIII的情况中一样需要终生施用。

[0023] 高度需要得到未被化学修饰的长寿的VWF。

[0024] 现有技术中已描述了凝血因子与作为加长半衰期的多肽的白蛋白(W001/79271), α -甲胎蛋白(W02005/024044)及免疫球蛋白(W02004/101740)的融合。这些被连接到相应治疗性蛋白部分的羧基-或氨基-端或者两端,有时通过肽接头连接,优选通过由甘氨酸及丝氨酸构成的接头连接。

[0025] Ballance等人(W001/79271)描述了多个不同治疗性多肽融合到人血清白蛋白的N-或C-端融合多肽。其描述了潜在的融合偶体的长列表,但就是否相应白蛋白融合蛋白实际上保持生物活性及具有提高的特性,未公开几乎任何这些多肽的实验数据。所述治疗性多肽列表中也提到了FVIII及VWF。

[0026] 本领域技术人员不会认真考虑C-端融合,因为在FVIII的氨基酸2303与2332之间的FVIII的基C-端部分的FVIII的C2结构域包括血小板膜结合位点,其必要于FVIII功能。这也是为什么这区域已知有许多导致血友病A的氨基酸突变。因此惊讶地发现,相对大的异源多肽(如白蛋白)可融合到FVIII的C-端部分,而不通过阻止血小板结合阻止FVIII功能。此外,C2结构域还含VWF的结合位点。这位点及氨基酸序列1649~1689负责FVIII与VWF的高亲和性结合。因此,本领域技术人员还不预期有C-端白蛋白融合的FVIII会保持其与VWF结合。

[0027] 惊讶地发现,相对于Ballance等人的预测,白蛋白融合到FVIII的N-端不分泌到培养基。因此及因为如上详述的理由,更惊讶地发现,于其C-端部分融合到白蛋白的FVIII分泌到培养基,及保持其包括结合活化的血小板膜及结合VWF在内的生物功能。

[0028] 还惊讶地发现,本发明的修饰的FVIII显示相比野生型FVIII约20%增加的体内恢复。

[0029] 本领域技术人员还未想到将人白蛋白融合到VWF的N-或C-端。在N-端融合中,白蛋白部分会在原肽加工期间被切割下。或如果略去原肽,多聚化不会发生。如上所述,VWF的C-端必要于初始二聚化及必要于分泌,如Schneppenheim等人(Schneppenheim R. et al.1996.Defective dimerization of VWF subunits due to a Cys to Arg mutation in VWD type IID.Proc Natl Acad Sci USA93:3581-3586;Schneppenheim R. et al.2001.Expression and characterization of VWF dimerization defects in different types of VWD.Blood97:2059-2066.),Baronciani等人(Baronciani L. et al.2000.Molecular characterization of a multiethnic group of 21 patients with VWD type 3.Thromb.Haemost84:536-540),Enayat等人(Enayat MS et al.2001.Aberrant

dimerization of VWF as the result of mutations in the carboxy-terminal region: identification of 3 mutations in members of 3 different families with type 2A (phenotype IID) VWD. Blood 98:674-680) 及 Tjernberg 等人 (Tjernberg et al. 2006. Homozygous C2362F VWF induces intracellular retention of mutant VWF resulting in autosomal recessive severe VWD. Br J Haematol. 133:409-418) 所示。因此, 本领域技术人员不会想到大蛋白(如人白蛋白)与 VWF 的 C-或 N-端的融合, 如其预期 VWF 的正常二聚化或多聚化一样, 会被损坏。随着 VWF 的更高多聚体在初次止血中最活跃, 本领域技术人员会考虑其他方法延长 VWF 的功能半衰期。

[0030] 现令人惊讶的发现, 异源多肽(例如白蛋白)与 VWF 的 C-端部分融合, 不仅使得 VWF 嵌合蛋白从哺乳动物细胞表达及分泌, 还得到保持显著的 VWF 活性及形成高分子量多聚体的修饰的 VWF 分子。此外, 该修饰的 VWF 分子呈现延长的体内半衰期和/或提高的体内恢复。

[0031] 【发明概述】

[0032] 本发明旨在提供具有加长的体内半衰期的修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物。

[0033] 本发明中术语“修饰的 FVIII”或“修饰的 VWF”是指融合到加长半衰期的多肽的 FVIII 或 VWF 多肽, 还含盖 FVIII 或 VWF 的天然等位体, 变体, 删除及插入。

[0034] 本发明还旨在提供具有提高的体内恢复的修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物。

[0035] 本发明另一目的在于, 这修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物可由哺乳动物细胞表达, 及保持它们相应的生物活性。

[0036] 总之, 本发明的所述修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物意料之外地保持生物活性, 具有增加的体内半衰期及体内恢复。

[0037] 本发明的 FVIII 被修饰且活化之后 A2 结构域仅保持非共价连接到 A3 结构域的那些实施方式的潜在益处是仅非活化形式的 FVIII 的半衰期增加, 而活化形式的 FVIII 的半衰期基本上保持相同, 其相比导致活化形式的 FVIII 稳定的 FVIII 变体, 可导致降低的血栓形成风险。

[0038] 本发明的修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 分子的复合物可通过加长半衰期的蛋白(HLEP)部分与 FVIII 的 C-端部分或与 VWF 的 C-端部分融合产生。

[0039] 本发明中的 HLEP 选自: 白蛋白家族成员, 其包括: 白蛋白, afamin, α -甲胎蛋白及维生素 D 结合蛋白, 以及免疫球蛋白恒定区部分及能在生理条件下结合白蛋白家族成员以及结合免疫球蛋白恒定区部分的多肽。最优的 HLEP 是人白蛋白。

[0040] 本发明因此涉及于所述修饰的 FVIII 和/或 VWF C-端部分融合到 HLEP 的修饰的 FVIII, 或者修饰的 VWF, 以及修饰的 FVIII 与非修饰的 VWF 的复合物, 非修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 以及修饰的 FVIII 与修饰的 VWF 的复合物, 特征在于: 所述修饰的 FVIII, 或

者修饰的VWF,以及修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII、或野生型VWF、或者野生型VWF与野生型FVIII的复合物的功能半衰期延长的功能半衰期。

[0041] 本发明还涉及C-端融合到多于一个HLEP,其中所述HLEP(其融合几次)可为相同的HLEP或可为不同HLEP的组合。

[0042] 本发明还涉及于C-端部分融合到HLEP的修饰的FVIII,特征在于,所述修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII、或野生型VWF、或者野生型VWF与野生型FVIII的复合物的体内恢复提高的体内恢复。

[0043] 本发明的另一实施方式是于C-端部分融合到HLEP的修饰的FVIII多肽,特征在于,所述修饰的FVIII以比野生型FVIII更高的产率分泌到发酵培养基。

[0044] 本发明另一方面是编码所述修饰的FVIII和/或所述修饰的VWF的多核苷酸或多核苷酸的组合。

[0045] 本发明还涉及包括本文所述的多核苷酸的质粒或载体,涉及包括本文所述的多核苷酸或质粒或载体的宿主细胞。

[0046] 本发明另一方面是产生修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物的方法,包括:

[0047] (a)在所述修饰的凝血因子表达的条件下培养本发明的宿主细胞;及

[0048] (b)任选从宿主细胞或从培养基回收所述修饰的凝血因子。

[0049] 本发明还涉及包括修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,或者非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,多核苷酸,或本文所述的质粒或载体的药物组合物。

[0050] 本发明另一方面是本发明的修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,或者非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,一种或多种多核苷酸,或一种或多种质粒或载体,或宿主细胞用于制备治疗或预防血凝集障碍的药物的用途。

[0051] 【发明详述】

[0052] 本发明涉及复合物,其包括:FVIII及von WWF,或其独立多肽成分之一,其中所述复合物的至少一种多肽成分于其主要翻译产物的C-端部分融合到加长半衰期的多肽(HLEP)的N-端部分。

[0053] 本发明还涉及修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中所述修饰的FVIII于FVIII的主要翻译多肽的C-端部分融合到HLEP的N-端部分,或所述修饰的VWF于VWF的主要翻译多肽的C-端部分融合到HLEP的N-端部分。

[0054] 本发明的优选实施方式涉及修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

[0055] (a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的功能半衰期延长的功能半衰期,或

[0056] (b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的功能半衰期延长的功能半衰期,或

[0057] (c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期,或

[0058] (d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期,或

[0059] (e)所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物具有相比包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的功能半衰期延长的功能半衰期。

[0060] 本发明的优选实施方式是如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述修饰的多肽具有相比相应野生型多肽的功能半衰期增加至少25%的功能半衰期,或所述包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的功能半衰期增加至少25%的功能半衰期。

[0061] 本发明的另一实施方式是:修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的 FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

[0062] (a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

[0063] (b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

[0064] (c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

[0065] (d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期,或

[0066] (e)所述包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期延长的抗原半衰期。

[0067] 本发明的优选实施方式是如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述修饰的多肽具有相比相应野生型多肽的抗原半衰期增加至少25%的抗原半衰期,或所述包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的抗原半衰期增加至少25%的抗原半衰期。

[0068] 本发明的再一实施方式是修饰的FVIII,或者修饰的VWF,或者包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,其中,

[0069] (a)所述修饰的FVIII具有相比野生型FVIII的体内恢复增加的体内恢复,或

[0070] (b)所述修饰的VWF具有相比野生型VWF的体内恢复增加的体内恢复,或

[0071] (c)所述包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复,或

[0072] (d)所述包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复,或

[0073] (e)所述包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物具有相比所述包括野生型FVIII及野生型VWF的相应复合物的体内恢复增加的体内恢复。

[0074] 本发明的另一优选的实施方式是如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述修饰的多肽具有相比相应野生型多肽的体内恢复增加至少10%的体内恢复,或所述包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物具有相比野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物增加至少10%的体内恢复。

[0075] 本发明的另一优选的实施方式是:

[0076] (a)如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述复合物的至少一种多肽成分于其主要翻译产物的C-端氨基酸融合到HLEP的N-端部分,或

[0077] (b)如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述复合物的至少一种多肽成分于其主要翻译产物的C-端部分融合到HLEP的N-端氨基酸,或

[0078] (c)如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述复合物的至少一种多肽成分于其主要翻译产物的C-端氨基酸融合到HLEP的N-端氨基酸。

[0079] 本发明的另一优选的实施方式是如上所述的修饰的多肽,或者包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物,其中所述修饰的多肽具有野生型多肽的生物活性的至少10%,或所述包括所述修饰的多肽的复合物或包括多种所述修饰的多肽的复合物具有野生型FVIII与野生型VWF的相应复合物的生物活性的至少10%。

[0080] 本发明还包括制备具有增加的功能半衰期的修饰的FVIII或修饰的VWF的方法,包括将加长半衰期的多肽的N-端部分融合到FVIII的主要翻译多肽的C-端部分或融合到VWF的主要翻译多肽的C-端部分;以及制备包括修饰的FVIII及非修饰的VWF的复合物,或者包括非修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物,或者包括修饰的FVIII及修饰的VWF的复合物的方法,通过混合上述方法制备的修饰的FVIII与野生型VWF,或通过混合野生型FVIII与上述方法制备的修饰的VWF,或通过混合上述方法制备的修饰的FVIII与修饰的VWF。

[0081] 本发明还包括下列物质用于制备同时、分开或依次用于治疗出血障碍,优选用于治疗血友病A和/或冯·维勒布兰德病的联合药物制剂的用途:

[0082] (a)上述方法制备的修饰的FVIII及野生型VWF,或

[0083] (b)野生型FVIII及上述方法制备的修饰的VWF,或

[0084] (c)上述方法制备的修饰的FVIII及上述方法制备的修饰的VWF。

[0085] 本发明中的“功能半衰期”是所述修饰的FVIII或所述修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物或非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物一旦施用给哺乳动物的生物活性半衰期,及可在所述修饰的FVIII或所述修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,或者非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或者所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物已施用之后,从所述哺乳动物以不同的时间间隔取得的血样品中体外测量。

[0086] 词“融合”或“融合的”是指将氨基酸添加到FVIII的C-端部分和/或VWF的C-端部分。当本文说道“融合到FVIII的C-端氨基酸”或“融合到VWF的C-端氨基酸”,时,是指于成熟的野生型FVIII的氨基酸2332的cDNA序列精确融合到FVIII的C-端氨基酸,或于野生型成

熟的VWF的氨基酸2050精确融合到VWF的C-端氨基酸。成熟的FVIII或成熟的VWF是指原肽切割之后的相应多肽。但是,本发明还含盖本发明中的“融合到FVIII的C-端部分”或“融合到VWF的C-端部分”,其还可包括分别融合到FVIII和/或VWF分子,其中一个或多个氨基酸位置,直到n个氨基酸从FVIII和/或VWF的C-端氨基酸被删除。n是不应大于FVIII和/或VWF的氨基酸总数的5%,优选不大于1%的整数。通常,n是20,优选15,更优选10,再更优选5或更小(例如1,2,3,4或5)。

[0087] 在一实施方式中,所述修饰的FVIII具有以下结构:

[0088] N-FVIII-C-L1-H,[式1]

[0089] 其中,

[0090] N是FVIII的N-端部分,

[0091] L1是化学键或接头序列,

[0092] H是HLEP,及

[0093] C是FVIII的C-端部分。

[0094] 另一实施方式中所述修饰的VWF具有以下结构:

[0095] N-VWF-C-L1-H,[式2]

[0096] 其中,

[0097] N是VWF的N-端部分,

[0098] L1是化学键或接头序列,

[0099] H是HLEP,及

[0100] C是VWF的C-端部分。

[0101] L1可为由一个或多个氨基酸构成的化学键或接头序列,例如1~20,1~15,1~10,1~5或1~3(例如1,2或3)个氨基酸,及其可彼此相同或不同。通常,接头序列不存在于野生型凝血因子的相应位置。存在于L1中的适宜氨基酸的例包括Gly及Ser。

[0102] 优选的HLEP序列如下所述。本发明还包括到相应HLEP的精确“N-端氨基酸”的融合体,或到相应HLEP的“N-端部分”的融合体,其包括:N-端删除HLEP的一个或多个氨基酸。

[0103] 本发明的所述修饰的FVIII或所述修饰的VWF或所述修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,非修饰的FVIII与所述修饰的VWF的复合物或所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物可包括多于一个HLEP序列,例如2或3个HLEP序列。这些多个HLEP序列可串联融合到FVIII的C-端部分和/或VWF的C-端部分,例如作为连续重复子。

[0104] FVIII可在各阶段经蛋白水解加工。例如,如上所述,在其分泌到血浆期间,单链FVIII在细胞内在B-A3边界及在B-结构域内的不同位点被切割。重链经金属离子束缚到具有结构域结构A3-C1-C2的轻链。FVIII经在重链内的氨基酸Arg372及Arg740及在轻链内的Arg1689蛋白水解切割而活化产生活化的由A1结构域,A2结构域,及轻链(A3-C1-C2)构成的FVIII异源二聚体,73kDa片段。因此,活跃形式的FVIII(FVIIIa)构成由通过二价金属离子连接物与凝血酶切割的A3-C1-C2轻链连接的A1-亚基及与A1及A3结构域相对松散连接的游离A2亚基。

[0105] 因此,本发明还含盖不存在为单链多肽,但由经非共价键彼此连接的几个多肽(例如1个或2个或3个)构成的修饰的FVIII。

[0106] 优选N-FVIII-C包括FVIII的全长序列。只要保持FVIII的生物活性,还包括FVIII

的N-端,C-端或内部缺失。如果具有缺失的FVIII保持至少10%,优选至少25%,更优选至少50%,最有选至少75%的野生型FVIII的生物活性,则在本发明中认为保持生物活性。FVIII的生物活性可如下所述由本领域技术人员测定。

[0107] 测定FVIII的生物活性的适宜测试例如一步或两步凝集试验(Rizza et al.1982.Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed.The Hemophilias.NY Churchchill Livingston1992)或显色底物FVIII:C试验(S.Rosen,1984.Scand J Haematol33:139-145,suppl.)。将这些参考文献的内容通过引用并入本文。成熟的野生型的人凝血因子FVIII的cDNA序列及氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:14及 SEQ ID NO:15。说道特定序列的氨基酸位置,是指所述氨基酸在FVIII野生型蛋白中的位置,及不排除突变的存在,所述突变例如在所述序列中的其他位置的缺失,插入和/或置换。例如,SEQ ID NO:15的"Glu2004"中的突变不排除在修饰的同源体中,在SEQ ID NO:15的位置1~2332的一个或多个氨基酸缺失。

[0108] 术语“凝血因子VIII”,“因子VIII”及“FVIII”在本文互换使用。“凝血因子VIII”包括:野生型凝血因子FVIII,以及具有野生型凝血因子FVIII的促凝剂活性的野生型凝血因子FVIII的衍生物。衍生物可相比野生型FVIII的氨基酸序列有缺失,插入和/或添加。术语FVIII包括:蛋白水解加工形式的FVIII,例如活化之前的形式,包括重链及轻链。

[0109] 术语“FVIII”包括具有野生型因子VIII的生物活性的至少25%,更优选至少50%,最有选至少75%的任何FVIII变体或突变体。

[0110] 作为非限制性实施例,FVIII分子包括:阻止或减少APC切割的FVIII突变体(Amano1998.Thromb.Haemost.79:557-563),进一步稳定A2结构域的FVIII突变体(W097/40145),导致增加的表达的FVIII突变体(Swaroop et al.1997.JBC272:24121-24124),降低其免疫原性的FVIII突变体(Lollar1999.Thromb.Haemost.82:505-508),由差异表的重链及轻链重构的FVIII(Oh et al.1999.Exp.Mol.Med.31:95-100),降低与受体结合导致FVIII如HSPG(硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)和/或LRP(低密度脂蛋白受体关联蛋白)分解代谢的FVIII突变体(Ananyeva et al.2001.TCM,11:251-257),二硫键-稳定的FVIII变体(Gale et al.,2006.J.Thromb.Hemost.4:1315-1322),具有提高的分泌特性的FVIII突变体(Miao et al.,2004.Blood103:3412-3419),具有增加的辅因子特异活性的FVIII突变体(Wakabayashi et al.,2005.Biochemistry44:10298-304),具有提高的生物合成及分泌,将少的ER伴侣蛋白相互作用,提高的ER-Golgi转运,增加的活化或针对灭活的抗性及提高的半衰期的FVIII突变体(总结于Pipe2004.Sem.Thromb.Hemost.30:227-237)。所有这些FVIII突变体及变体通过引用整体并入本文。

[0111] VWF可在各阶段经蛋白水解加工。例如,如上所述,蛋白酶ADAMTS13在VWF的A2结构域内切割VWF。因此,本发明还含盖已被蛋白水解切割(例如被ADAMTS13)的修饰的VWF。所述切割会产生在它们的末端包括至少1个或最多2个已被ADAMTS13切割的VWF单体的VWF多聚体链。

[0112] 优选N-VWF-C包括VWF的全长序列。只要保持VWF的生物活性,还包括VWF的N-端,C-端或内部缺失。如果具有缺失的VWF保持至少10%,优选至少25%,更优选至少50%,最有选至少75%的野生型VWF的生物活性,则在本发明中认为保持生物活性。野生型VWF的生物活性可由本领域技术人员使用利托菌素辅因子活性(Federici AB et

al.2004.Haematologica89:77-85),VWF与血小板糖蛋白复合物Ib-V-IX的GP Ib α 的结合(Sucker et al.2006.Clin Appl Thromb Hemost.12:305-310),或胶原结合试验(Kallas&Talpsep.2001.Annals of Hematology80:466-471)的方法来测定。

[0113] 在上述定义内“FVIII”和/或“VWF”还包括可在个体之间存在及出现的天然等位变异。在上述定义内“FVIII”和/或“VWF”还包括FVIII及或VWF的变体。该变体与野生型序列相差一个或多个氨基酸残基。该差异的例可包括保守氨基酸置换,即具有类似特性的氨基酸组内置换,例如(1)小氨基酸,(2)酸性氨基酸,(3)极性氨基酸,(4)碱性氨基酸,(5)疏水性氨基酸,及(6)芳族氨基酸。所述保守置换的例显示于下表。

[0114] 表1

[0115]

(1)	丙氨酸	甘氨酸		
(2)	天冬氨酸	谷氨酸		
(3)	天冬酰胺	谷氨酰胺	丝氨酸	苏氨酸
(4)	精氨酸	组氨酸	赖氨酸	
(5)	异亮氨酸	亮氨酸	甲硫氨酸	缬氨酸
(6)	苯丙氨酸	酪氨酸	色氨酸	

[0116] 一个或多个HLEP可融合到FVIII的C-端部分,优选不干扰FVIII 例如与VWF,血小板或FIX的结合能力。

[0117] 一个或多个HLEP可融合到VWF的C-端部分,优选不干扰VWF例如与FVIII,血小板,肝素或胶原的结合能力。

[0118] 体内凝集期间一旦FVIII内源性地活化,其可不再期望保持现活化的FVIII的增加的功能半衰期,因为这可导致血栓发生,其已经是野生型活化的凝血因子(如FVIIa)的例子(Aledort2004.J Thromb Haemost2:1700-1708),及如果活化的因子会具有增加的功能半衰期,什么会可更相关。因此本发明还旨在提供长寿的FVIII分子,其内源性体内活化之后或辅因子的可用性具有与未修饰的FVIII比肩的功能半衰期之后。这可通过导入例如FVIII的C-端部分与HLEP之间的凝血因子的切割位点的非限制性实施例实现。用所述FVIII-HLEP连接序列,本发明的FVIII嵌合蛋白的活化会导致FVIIa从HLEP部分并发的完全分离。因此,在一实施方式中,内源性地活化的修饰的FVIII的功能半衰期与活化的野生型FVIII基本上相同(例如 $\pm 15\%$,优选 $\pm 10\%$)。

[0119] 但是,在本发明的又一实施方式中,突变或缺失了一个或多个蛋白水解切割位点,优选Arg740和/或Arg372处的凝血酶切割位点,以阻止切割,及产生了插入蛋白,其呈现提高的特性(如加长的功能半衰期),甚至如活化的分子。

[0120] 本发明的另一实施方式中,本发明的FVIII蛋白可作为2个分开的链表达(见下)。

[0121] 本发明的修饰的FVIII可为单链多肽,或其由于蛋白水解加工,可包括2个或3个经非共价键连接的多肽链。

[0122] 本发明的另一实施方式中,突变或缺失在或接近PACE/弗林蛋白酶切割位点(Arg1648)的氨基酸,以阻止被PACE/弗林蛋白酶切割。这被认为产生具有提高的半衰期的一条链FVIII/HLEP融合分子。

[0123] 在本发明的一实施方式中,本发明的修饰的FVIII相比不含整合的HLEP的相应

FVIII形式和/或相比野生型FVIII呈现增加的功能半衰期。功能半衰期例如可在血友病A动物模型(如FVIII敲除小鼠)中体内测定,其中可预期相比野生型FVIII更持久的止血效果。止血效果可例如通过测定剪尾之后出血停止的时间来测试。

[0124] 在本发明的一实施方式中,功能半衰期是FVIII是一旦施用到哺乳动物后及体外测量的生物活性半衰期。如在相同的物种中测试,本发明的修饰的FVIII的功能半衰期大于缺乏修饰的FVIII的功能半衰期。相比野生型FVIII,功能半衰期优选增加至少10%,优选25%,更优选至少50%,及甚至更优选增加至少100%。

[0125] 包括HLEP修饰的经修饰的FVIII的功能半衰期可通过将相应修饰的FVIII(及相比野生型FVIII)静脉内或经皮下施用给大鼠,兔或其他实验动物物种,然后分别消除应用之后以适当间隔取得的血样品中所述修饰的或非修饰的凝血因子的生物活性来测定。适宜测试方法是本文所述的活性测试。

[0126] 本发明的另一实施方式的功能半衰期是施用给哺乳动物之后及测量体外的VWF的生物功能半衰期。本发明的修饰的VWF的功能半衰期大于缺乏修饰的VWF的功能半衰期,如在相同物种的所测试。功能半衰期相比缺少修饰的VWF和/或相比野生型VWF增加至少10%,优选增加至少25%,更优选至少50%,及甚至更优选至少100%。

[0127] 包括HLEP修饰的经修饰的VWF的功能半衰期,可通过将相应修饰的VWF(及相比非修饰的VWF的)经静脉内或经皮下施用给大鼠,兔或其他实验动物物种,然后分别消除应用之后以适当间隔取得的血样品中所述修饰的或非修饰的VWF的生物活性来测定。适宜测试方法是本文所述的活性测试。

[0128] 可测量生物活性的半衰期的替代标记物,以及分别所述修饰的或野生型FVIII的抗原水平,或分别所述修饰的或野生型VWF的抗原水平。因此,本发明还包括于FVIII和/或VWF的C-端部分融合到HLEP的修饰的FVIII和/或VWF分子,特征在于,所述修饰的FVIII或所述修饰的VWF或所述修饰的VWF,或者修饰的FVIII与非修饰的VWF的复合物,或非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物或所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物相比缺乏所述插入的FVIII 和/或VWF抗原的半衰期,具有延长的FVIII和/或VWF抗原的半衰期。本发明中的“FVIII抗原的半衰期”是施用给哺乳动物之后及体外测量的FVIII抗原半衰期。本发明中的“VWF抗原半衰期”是施用给哺乳动物之后及体外测量的VWF抗原半衰期。基于特定抗体的以酶免疫测定形式的抗原测试方法本领域技术人员已知,及可商购(例如Dade Behring, Instrumentation Laboratory, Abbott Laboratories, Diagnostica Stago)。可使用消除的β期时间点根据式 $t_{1/2} = \ln 2 / k$ (而k是回归线的斜率)计算功能性及抗原半衰期。

[0129] 另一实施方式中,内源地活化的修饰的FVIII的功能半衰期相比活化的野生型FVIII延长。增加可多于15%,例如至少20%或至少50%。还有,所述功能半衰期值可如上对于功能半衰期所述测量及计算。内源地活化的修饰的FVIII分子的增加的半衰期可在仅非常低水平的FVIII可用(因此不形成血栓)的情况中有益。该情况可在例如基因治疗后出现,其中常仅可达到低表达速率。因此,该稳定的FVIII分子可在例如基因治疗中有益,尽管血栓形成风险关联于该FVIII分子,如果蛋白以高或生理剂量施用。

[0130] 本发明的另一实施方式中,本发明的修饰的FVIII相比野生型FVIII呈现提高的体内恢复,及本发明的修饰的VWF相比野生型VWF呈现提高的体内恢复。体内恢复可例如在正常动物或血友病A动物模型(如FVIII敲除小鼠)中,或在VWD模型(如VWF敲除小鼠)中体内测

定,其中可预期相比相应野生型FVIII或野生型VWF,本发明的修饰的FVIII或VWF的增加的百分率在静脉内施用之后很快(5~10分钟)被抗原或活性试验在循环中发现。

[0131] 体内恢复相比野生型FVIII或野生型VWF,优选增加至少10%,更优选至少20%,及甚至更优选至少40%。

[0132] 本发明的又一实施方式中,将免疫球蛋白恒定区或其部分用作HLEPs。优选Fc区包括CH2及CH3结构域及IgG的铰链区,更优选使用IgG1或其片段或变体,包括增强结合新生儿Fc受体(FcRn)的突变的变体。

[0133] 本发明还旨在提供长寿的FVIII分子,其在体内蛋白水解加工之后具有比肩于未修饰的FVIII的功能半衰期。这可通过保留所述修饰的FVIII中的某些切割位点实现,导致蛋白水解切割,例如当与活化的凝血因子接触时,其将FVIII从HLEP分开。因此,在一实施方式中,蛋白水解加工的修饰的FVIII的功能半衰期与缺乏修饰的非修饰的VWF的功能半衰期基本上相同,和/或与野生型VWF的功能半衰期基本上相同(例如 $\pm 15\%$,优选 $\pm 10\%$)。

[0134] 本发明的再一实施方式是修饰的FVIII多肽,其于FVIII分子的C-端部分融合到HLEP(例如白蛋白),其具有与VWF减少的结合,或根本不结合VWF。

[0135] 本发明还旨在提供长寿的VWF分子,其在体内蛋白水解加工之后具有比肩于未修饰的VWF的功能特性。这可通过在所述修饰的VWF内保留或插入某些切割位点来实现(见下),导致蛋白水解切割,例如当与活化的凝血因子接触时,其将VWF从HLEP分开。因此,在一实施方式中,蛋白水解加工的修饰的VWF的功能半衰期与缺乏修饰的非修饰的VWF的功能半衰期基本上相同,和/或与野生型VWF的功能半衰期基本上相同(例如 $\pm 15\%$,优选 $\pm 10\%$)。

[0136] 本发明的另一优选的实施方式是共表达野生型VWF与本发明的修饰的VWF,产生包括非修饰的以及修饰的VWF单体的VWF多聚体。

[0137] **【接头序列】**

[0138] 根据本发明,治疗性多肽部分可通过肽接头偶联于HLEP部分。接头应是非免疫原性的,且可为不可切割的或可切割的接头。

[0139] 不可切割的接头可包括交替的甘氨酸及丝氨酸残基,如例示于W02007/090584。

[0140] 本发明的另一实施方式中,FVIII和/或VWF部分与白蛋白部分之间的肽接头由肽序列构成,其作为人蛋白中的天然的结构域间接头。优选该肽序列在它们的天然环境中位置接近于蛋白表面,且可入手免疫系统,从而可假定针对这序列的天然耐受。例子在W02007/090584 中给出。

[0141] 可切割的接头应足够柔韧以使被蛋白酶切割。在优选的实施方式中,如果融合蛋白是修饰的FVIII,接头的切割进行得与融合蛋白内FVIII的活化可比较地快。

[0142] 可切割的接头优选包括源于下列的序列:

[0143] (a)如果含治疗性多肽活化期间蛋白水解切割的蛋白水解切割位点,则待施用的治疗性多肽本身,

[0144] (b)被治疗性多肽的参与而活化或形成的蛋白酶切割的底物多肽,

[0145] (c)参与凝集或纤维蛋白溶解的多肽。

[0146] 更优选的实施方式中的接头区包括FVIII和/或VWF的序列,其应导致表达的融合蛋白的新抗原特性的降低的风险。还在治疗性蛋白是需要被蛋白水解活化的FVIII的情况下,肽接头切割的动力学将更接近反映酶原的凝集相关的活化动力学。

[0147] 优选实施方式中,治疗性多肽是FVIII酶原及HLEP是白蛋白。此情况中,接头序列或是源于FVIII的活化区序列,源于FIX(如FX或FVII)的任何底物的切割区,或源于任何被活化涉及FIXa的蛋白酶切割的底物多肽的切割区。

[0148] 在高度优选的实施方式中,接头肽源于FVIII本身,及包括分别在SEQ ID NO:15的氨基酸位置372,740及1689处含凝血酶切割位点的序列。另一优选的实施方式中,接头肽源于FX, FIX, FVII或FXI。

[0149] 接头肽优选可被凝血系统蛋白酶(例如FIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa及FVIIa)切割。

[0150] 所述接头序列还可用于本发明的修饰的VWF。

[0151] 治疗性多肽,可切割的接头及HLEP的例示组合包括W02007/090584(例如表2及图4中)及W02007/144173(例如表3a及3b中)中列出的构建体,但不限于这些。

[0152] **【加长半衰期的多肽(HLEPs)】**

[0153] 本文中的“加长半衰期的多肽”选自:白蛋白,白蛋白-家族成员,免疫球蛋白G的恒定区及它们的片段区,及能在生理条件下结合白蛋白,白蛋白家族成员以及免疫球蛋白恒定区部分的多肽。其可为本文所述的全长加长半衰期的蛋白(例如白蛋白,白蛋白-家族成员或免疫球蛋白G恒定区)或它们的能稳定或延长凝血因子的治疗活性或生物活性的一种或多种片段。所述片段可为10或更多氨基酸长,或可包括自HLEP序列的至少约15,至少约20,至少约25,至少约30,至少约50,至少约100,或更多连续的氨基酸,或可包括相应HLEP的特定结构域的部分或全部,只要HLEP片段提供相比野生型FVIII或野生型VWF延长至少25%的功能半衰期。

[0154] 本发明的提议的凝血因子插入构建体的HLEP部分可为正常HLEP的变体。术语“变体”包括:保守或非保守的插入,缺失及置换,其中所述变化基本上不改变赋予所述修饰的FVIII,或者修饰的VWF的生物活性的活性位点或活性结构域。

[0155] 尤其是,本发明提议的FVIII HLEP或VWF HLEP融合构建体可包括HLEPs及HLEPs片段的天然存在的多态性变体。HLEP可源于任何脊椎动物,尤其是任何哺乳动物,例如人,猴,牛,羊,或猪。非哺乳动物HLEPs包括,但不限于,鸡及鲑鱼。

[0156] **【白蛋白作为HLEP】**

[0157] 术语“人血清白蛋白”(HSA)及“人白蛋白”(HA)及“白蛋白”(ALB)在本申请中互换使用。术语“白蛋白”及“血清白蛋白”更宽,及包括人血清白蛋白(及它们的片段及变体)以及自其他物种的白蛋白(及它们的片段及变体)。

[0158] 本文中的“白蛋白”共同指白蛋白多肽或氨基酸序列,或白蛋白片段或变体,具有白蛋白的一种或多种功能活性(例如,生物活性)。尤其是,“白蛋白”是指人白蛋白或它们的片段,尤其是本文中SEQ ID NO:16所示的成熟形式的人白蛋白,或自其他脊椎动物的白蛋白或它们的片段,或这些分子的类似物或变体,或它们的片段。

[0159] 尤其是,本发明提议的FVIII融合和/或VWF融合构建体可包括 人白蛋白及人白蛋白片段的天然存在的多态性变体。一般而言,白蛋白片段或变体将至少10,优选至少40,最有选多于70个氨基酸长。白蛋白变体可优选由至少一个白蛋白全结构域或所述结构域的片段构成,或替代性地包括至少一个白蛋白全结构域或所述结构域的片段,例如结构域1(SEQ ID NO:16的氨基酸1~194),2(SEQ ID NO:16的氨基酸195~387),3(SEQ ID NO:16的氨基

酸388~585),1+2(SEQ ID NO:16的1~387),2+3(SEQ ID NO:16的195~585)或1+3(SEQ ID NO:16的氨基酸1~194+SEQ ID NO:16的氨基酸388~585)。各结构域本身也由2个同源亚结构域构成,即1~105,120~194,195~291,316~387,388~491及512~585,具有包括残基Lys106到Glu119,Glu292到Val315及Glu492到Ala511的柔韧的亚结构域间接头区。

[0160] 本发明提议的FVIII融合和/或VWF融合构建体的白蛋白部分可包括至少一个HA亚结构域或结构域,或其保守修饰。

[0161] 【Afamin, α -甲胎蛋白及维生素D结合蛋白作为HLEPs】

[0162] 除了白蛋白之外, α -甲胎蛋白(另一白蛋白家族成员)已被要求保护,以体内加长连接的治疗性多肽的半衰期(WO2005/024044)。白蛋白家族,进化上相关的血清转运蛋白,由白蛋白, α -甲胎蛋白(AFP;Beattie&Dugaiczky1982.Gene20:415-422),afamin(AFM;Lichenstein et al.1994.J.Biol.Chem.269:18149-18154)及维生素D结合蛋白(DBP;Cooke&David1985.J.Clin.Invest.76:2420-2424)构成。它们的基因代表用结构及功能相似性定位到人,小鼠及大鼠的相同的染色体区域的多基因簇。白蛋白家族成员的结构相似性提示它们作为HLEPs的可用性。因此,本发明还旨在使用所述白蛋白家族成员,它们的片段及变体作为HLEPs。术语“变体”包括保守或非保守的插入,缺失及置换,只要仍存在期望功能。

[0163] 白蛋白家族成员可包括相应蛋白AFP,AFM及DBP的全长,或可包括它们的能稳定或延长治疗性活性的一种或多种片段。所述片段可为10个或更多氨基酸长,或可包括相应蛋白序列的约15,20,25,30,50,或更多连续的氨基酸,或可包括相应蛋白的特定结构域的部分或全部,只要HLEP片段提供半衰期延长至少25%。本发明的插入蛋白的白蛋白家族成员可包括AFP,AFM及DBP的天然存在的多态性变体。

[0164] 【免疫球蛋白作为HLEPs】

[0165] 现有技术中已知免疫球蛋白G(IgG)恒定区(Fc)增加治疗性蛋白的半衰期(Dumont JA et al.2006.BioDrugs20:151-160)。IgG重链恒定区由3个结构域(CH1-CH3)及铰链区构成。免疫球蛋白序列可源于任何哺乳动物,或分别源于IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚类。无抗原-结合结构域的IgG及IgG片段也可用作HLEPs。治疗性多肽部分优选经抗体铰链区或肽接头与IgG或IgG片段连接,其可甚至是可切割的。几个专利及专利申请描述治疗性蛋白与免疫球蛋白恒定区的融合,以加长治疗性蛋白的体内半衰期。US2004/0087778及WO2005/001025描述了Fc结构域或免疫球蛋白恒定区的至少部分与增加肽半衰期的生物学活跃的肽的融合蛋白,其还会快速从体内消除。Fc-IFN- β 融合蛋白被描述实现增加的生物活性,延长的循环半衰期及更大的溶解度(WO2006/000448)。公开了具有延长的血清半衰期及增加的体内效能的Fc-EPO蛋白(WO2005/063808)以及与G-CSF(WO2003/076567),高血糖素样肽-1(WO2005/000892),凝固因子(WO2004/101740)及白细胞介素-10(US6,403,077)的Fc融合体,全有半衰期加长特性。

[0166] 【多核苷酸】

[0167] 本发明还涉及多核苷酸,其编码本申请所述的修饰的凝血因子的,优选修饰的FVIII和/或修饰的VWF变体。术语“多核苷酸”一般是指可为未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA的任何多聚核糖核苷酸或多聚脱氧核糖核苷酸。多核苷酸可为单链或双链DNA,单链或双链RNA。本文中的术语“多核苷酸”还包括:包括一个或多个修饰的碱基和/或稀有碱基

(例如肌苷)的DNA或RNA。需知,可对DNA及RNA进行用于许多目的的本领域技术人员已知的多种修饰。本文 中的术语“多核苷酸”包括化学,酶学或代谢修饰的形式多核苷酸,以及化学形式的病毒及细胞(包括例如,简单及复杂细胞)特征的DNA及RNA。

[0168] 本领域技术人员明白,由于遗传密码简并,给定多肽可被不同多核苷酸编码。这些“变体”包括在本发明范围内。

[0169] 本发明的多核苷酸优选为分离的多核苷酸。术语“分离的”多核苷酸是指基本上游离于其他核酸序列的多核苷酸,例如但不限于其他染色体及染色体外DNA及RNA。分离的多核苷酸可纯化自宿主细胞。可用本领域技术人员已知的常规核酸纯化方法得到分离的多核苷酸。该术语还包括:重组多核苷酸及化学合成的多核苷酸。

[0170] 本发明还涉及多核苷酸组,其一起编码本发明的修饰的FVIII和/或修饰的VWF。所述组中的第一多核苷酸可编码所述修饰的FVIII和/或所述修饰的VWF的N-端部分,及第二多核苷酸可编码所述修饰的FVIII和/或所述修饰的VWF的C-端部分。

[0171] 本发明另一方面是包括本发明的多核苷酸的质粒或载体。质粒或载体优选为表达载体。特定实施方式中,载体是用于人基因治疗的转移载体。

[0172] 本发明还涉及包括上述多核苷酸组的质粒或载体组。第一质粒或载体可含所述第一多核苷酸,及第二质粒或载体可含所述第二多核苷酸。例如,及对于凝血因子VIII而言,可将信号肽,A1及A2结构域,B结构域序列其余及HLEP的编码序列克隆进第一表达载体,及可将A3,C1及C2的编码序列以及适当信号肽序列克隆进第二表达载体。两种表达载体共转染进适宜宿主细胞,其会导致本发明的FVIII分子的轻链及重链的表达,及功能蛋白的形成。

[0173] 或者,将FVIII信号肽,A1及A2结构域的编码序列克隆进第一表达载体,及将HLEP,FVIII A3,C1及C2的编码序列与适当信号肽序列克隆进第二表达载体。两种表达载体共转染进适宜宿主细胞,其会导致本发明的FVIII分子的轻链及重链的表达,及形成功能蛋白。

[0174] 或者,使用2个独立的启动子序列或1个启动子及内部核糖体进入位点(IRES)元件将两种编码序列克隆进一个表达载体,以直接表达两条FVIII链。

[0175] 本发明另一方面是宿主细胞,其包括本发明的多核苷酸,质粒或载体,或本文所述的多核苷酸组或质粒或载体组。

[0176] 本发明的宿主细胞可用于产生修饰的凝血因子,优选修饰的FVIII分子的方法,其为本发明一部分。所述方法包括:

[0177] (a)在期望的插入蛋白表达的条件下培养本发明的宿主细胞;及

[0178] (b)任选从宿主细胞或从培养基回收期望的插入蛋白。

[0179] 优选纯化本发明的修饰的FVIII和/或修饰的VWF至 $\geq 80\%$ 纯度,更优选 $\geq 95\%$ 纯度,及尤其优选为相对污染的大分子(尤其是其他蛋白及核酸)大于99.9%纯度的药学纯状态,及无感染剂及致热剂。分离的或纯化的本发明的修饰的FVIII和/或修饰的VWF优选基本上无其他,非相关多肽。

[0180] 本发明的各种产物可用作药物。因此,本发明涉及药物组合物,其包括本文所述的修饰的FVIII和/或所述修饰的VWF,本发明多核苷酸,或本发明的质粒或载体。

[0181] 本发明还涉及治疗患血凝集障碍(例如血友病A或B)的个体的方法。方法包括给所述个体施用有效量的本文所述的FVIII和/或修饰的VWF或所述修饰的VWF,或者修饰的

FVIII与非修饰的VWF的复合物,或非修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物,或所述修饰的FVIII与修饰的VWF的复合物。另一实施方式中,方法包括给个体施用有效量的本发明的多核苷酸或本发明的质粒或载体。或者,方法可包括给个体施用有效量的本文所述的本发明的宿主细胞。

[0182] 【提议的突变体的表达】

[0183] 在适宜宿主细胞中以高水平产生重组突变体蛋白需要根据本领域技术人员已知的方法将上述修饰的cDNA与重组表达载体中的适宜调控元件一起装配进可在各种表达系统中繁殖的有效的转录单元。有效的转录调控元件可源于有动物细胞作为它们的天然宿主的病毒,或源于动物细胞的染色体DNA。可优选使用:源于猴肾病毒40,腺病毒, BK多瘤病毒,人巨细胞病毒,或劳斯肉瘤病毒的长末端重复序列的启动子-增强子组合,或包括动物细胞中的强组成型转录的基因(如 β -肌动蛋白或GRP78)的启动子-增强子组合。为了达到转录自cDNA的mRNA的稳定的高水平,转录单元应在其3'-近端部分含编码转录终止-多聚腺苷酸序列的DNA区。这序列优选源于猴肾病毒40早期转录区,兔 β -珠蛋白基因,或人组织纤溶酶原激活子基因。

[0184] 然后将cDNA整合进用于表达所述修饰的FVIII和/或VWF蛋白适宜宿主细胞系的基因组中。此细胞系应优选为脊椎动物来源的动物细胞系,以确保正确的折叠,二硫键形成,天冬酰胺-连接的糖基化及其他翻译后修饰以及分泌进培养基。其他翻译后修饰的例为酪氨酸O-硫酸化及新生多肽链的蛋白水解加工。细胞系的例可使用猴COS-细胞,小鼠L-细胞,小鼠C127-细胞,仓鼠BHK-21细胞,人胚胎肾293细胞,及仓鼠CHO-细胞。

[0185] 可以几种不同方法将编码相应cDNA的重组表达载体导入动物细胞系。例如,可从基于不同动物病毒的载体创建重组表达载体。这些的例为基于杆状病毒,痘苗病毒,腺病毒,及优选牛乳头状瘤病毒的载体。

[0186] 还可将编码相应DNA的转录单元与可在这些细胞中起到主要的可选择标记物的作用的另一重组基因一起导入动物细胞,以辅助分离基因组中整合了重组DNA的特定细胞克隆。这类型的主要可选择标记物基因的例为:赋予对遗传霉素(G418)的抗性的Tn5氨基糖苷磷酸转移酶,赋予对潮霉素的抗性的潮霉素磷酸转移酶,及赋予对嘌呤霉素抗性的嘌呤霉素乙酰基转移酶。编码所述可选择标记物的重组表达载体可位于与编码期望蛋白的cDNA的载体相同的载体,或其可在同时导入及整合到宿主细胞基因组中的分开的载体编码,常导致不同转录单元之间紧密的物理连接。

[0187] 可与期望蛋白的cDNA一起使用的其他类型的可选择标记物基因基于各种编码二氢叶酸还原酶(dhfr)的转录单元。将这类型的基因导入缺乏内源性dhfr-活性的细胞(优选CHO-细胞(DUKX-B11, DG-44))之后,其使得这些细胞能在缺乏核苷的培养基中生长。所述培养基的一例为无次黄嘌呤,胸腺嘧啶,及甘氨酸的Ham's F12。可将这些dhfr-基因与FVIII cDNA转录单元一起(连接在相同载体或不同载体)导入上述类型的CHO-细胞,从而创建了产生重组蛋白的dhfr-阳性细胞系。

[0188] 如果上述细胞系在细胞毒性dhfr-抑制剂甲氨喋呤的存在下生长,出现抗甲氨喋呤的新细胞系。这些细胞系由于增大数的连接的dhfr及期望的蛋白的转录单元,可以增加的速率产生重组蛋白。当在递增浓度的甲氨喋呤(1~10000nM)中繁殖这些细胞系时,可得到以极高速率产生期望的蛋白的新细胞系。

[0189] 产生期望的蛋白的上述细胞系可大规模生长,在悬浮培养中或各种固体支持物上。这些支持物的例是:基于葡聚糖或胶原基质的微载质,或中空纤维或各种陶瓷材料形式的固体支持物。当在细胞悬浮培养物中或微载质上生长时,上述细胞系的上述培养可以溶培养进行或可以用连续的条件培养基产物灌注培养进行加长的时期。因此,根据本发明,上述细胞系良好适合于产生期望重组突变蛋白的工业加工的开发。

[0190] 【纯化及制备】

[0191] 可通过各种生物化学方法及层析方法将在上述类型的分泌细胞的培养基中蓄积的重组的修饰的FVIII和/或重组的修饰的VWF蛋白浓缩及纯化,包括利用期望的蛋白与细胞培养基中的其他物质之间的尺寸,电荷,疏水性,可溶性,特异亲和性等差异的方法。

[0192] 所述纯化的例为重组突变蛋白吸附到针对例如HLEP(优选人白蛋白)或针对相应凝血因子的固定于固体支持物的单克隆抗体。所述修饰的FVIII和/或修饰的VWF吸附到支持物上之后,洗涤及去吸附,蛋白还可通过基于上述特性的各种层析技术纯化。例如根据步骤的容量及选择性,支持物的稳定性或其他方面选择纯化步骤的顺序。优选的纯化步骤例如但不限于,离子交换层析步骤,免疫亲和层析步骤,亲和层析步骤,疏水相互作用层析步骤,染料层析步骤,羟基磷灰石层析步骤,多元层析步骤,及尺寸排阻层析步骤。

[0193] 为了最小化病毒污染的理论风险,方法中可包括额外的使得有效灭活或消除病毒的步骤。所述步骤例如以液体或固体状态加热处理,用溶剂和/或去污剂处理,可见光或UV光谱辐射, γ -辐射或纳米过滤。

[0194] 本发明的修饰的多核苷酸(例如DNA)还可整合进用于人基因治疗的转移载体。

[0195] 本文所述的各实施方式可与其他实施方式组合。本发明还将在下列实施例中更详细描述。会结合附图详述本发明的特定实施方式。

[0196] 本文描述的本发明的修饰的FVIII和/或修饰的VWF可配成用于治疗性用途的药物制剂。纯化的蛋白可溶解在常规的生理相容缓冲水溶液中,其中还可任选添加药物赋形剂来提供药物制剂。

[0197] 本领域熟知所述药物载质及赋形剂以及适宜药物制剂(见例如“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”,Frokjaer et al.,Taylor& Francis(2000)或“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,3rd edition,Kibbe et al.,Pharmaceutical Press(2000))。尤其是,可将包括本发明的多肽变体的药物组合物制成冻干剂或稳定的液体形式。多肽变体可通过本领域已知的方法冻干。冻干制剂在使用前通过添加一种或多种药学可接收稀释剂(例如注射用无菌水或无菌生理盐水溶液)来复原。

[0198] 将组合物制剂通过任何药学适宜施用手段递送到个体。已知各种递送系统及可用于通过任何常规途径施用组合物。本发明的组合物优选全身施用。就全身使用而言,本发明的插入蛋白根据常规方法制成用于经肠外(例如静脉内,皮下、肌内,腹膜内,脑内,肺内,鼻内或经皮)或经肠道(例如,口服,经阴道或经直肠)递送。最有选的施用途径是静脉内及皮下施用。制剂可通过输液或通过团注连续施用。一些制剂包括缓释系统。

[0199] 本发明的插入蛋白以治疗有效剂量施用给患者,这是指足以产生期望效果,阻止或减轻治疗中的疾病或适应症的严重性或传播,而不达到产生不可耐受的不利副作用的剂量的剂量。精确剂量依赖于许多因素,例如适应症,制剂,施用模式,及需在对各相应适应症的临床前及临床试验中测定。

[0200] 本发明的药物组合物可单独施用,或与其他治疗剂结合施用。这些制剂可作为同一药物的一部分掺入。所述制剂的一例是修饰的FVIII与非修饰的VWF的组合或非修饰的FVIII与修饰的VWF的组合或修饰的FVIII与修饰的VWF的组合。

[0201] 【附图说明】

[0202] 图1:野生型FVIII(457)及FVIII-C-端白蛋白融合多肽(1434)的抗原及活性水平。

[0203] 图2:静脉内注射100U(FVIII:Ag)/kg FVIII野生型和FVIII-FP1656VWF之后VWF ko小鼠中人FVIII:Ag药代动力学的比较(平均值;n=4/时间点)。

[0204] 图3:含有wt rVWF(1570/797)、含C-端连接的白蛋白的rVWF-FP(1572/797)的细胞培养上清,或含以5:1的比例转染的wtrVWF(1570/797)与rVWF-FP(1572/797)的混合物的混合表达细胞培养物的VWF:RCO/VWF:Ag比例。每种情况中得到约0.8的值,其接近于1,这是根据单位定义的NHP的理论比。

[0205] 图4:在HEK细胞中表达的野生型rVWF(1570/797)(B)及在HEK细胞中表达的rVWF-FP(1572/797)(A)的SDS-琼脂糖凝胶电泳。使用针对VWF或白蛋白(HSA)的抗体检测条带。

[0206] 图5:基于VWF:Ag测定的大鼠中rVWF野生型和rVWF-FP的PK分析,显示了静脉内注射100IU VWF:Ag之后的大鼠中的人rVWF野生型和rVWF-FP药代动力学的比较(平均值,n=2~3/时间点)。

[0207] 【实施例】

[0208] 【实施例1】用于有C-端白蛋白融合的FVIII分子的表达载体的产生

[0209] 将基于pIRESpuro3(BD Biosciences)的多克隆位点中含全长FVIII cDNA序列的表达质粒(pF8-FL)首次用于创建缺失B结构域的FVIII。就此,根据标准流程(QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit,Stratagene,La Jolla,CA,USA)使用pF8-FL作为模板将寡核苷酸F8-1及F8-2(SEQ ID NO:1及2)用于定点诱变实验来缺失B结构域。第二步中,导入编码氨基酸序列RRGR的序列以将A2结构域的R740与a3结构域的R1648连接。这通过另一轮的定点诱变使用引物F8-3及F8-4(SEQ ID NO:3及4)进行。产生的质粒称为pF8-457。

[0210] 逐步产生FVIII白蛋白融合构建体。首先,将PinAI切割位点于FVIII3'端导入。为此,使用pF8-457作为模板,使用PCR引物We2827及We2828(SEQ ID NO:5及6)产生PCR片段,随后将其凝胶-纯化,用限制性内切酶BspE1及NotI切割,及连接到用BspE1及NotI预先消化的pF8-457。产生的质粒然后用酶PinAI及NotI切割(pF8-1433),及插入在含人白蛋白cDNA的质粒上,使用引物We2829及We2830(SEQ ID NO:7及8)通过PCR,及随后用酶PinAI及NotI消化得到的片段。产生的表达质粒(pF8-1434)含缺失B结构域的FVIII的编码序列,之后是插入接头的PinAI位点(编码氨基酸序列ThrGly)及人白蛋白的编码序列。pF8-1434编码的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:9。

[0211] 分开FVIII与白蛋白部分的接头序列可容易插入上述新创建的PinAI位点。以下描述2个接头序列的插入。此外,基于pF8-1434,TG接头可完全缺失,及甚至可使用定点诱变进行FVIII的C-端或白蛋白的N-端的缺失。

[0212] 源于FVIII凝血酶切割位点的可切割的接头的插入:首先,使用引物We2979及We2980(SEQ ID NO:10及11)及用pF8-457作为模板,通过PCR产生在位置372含编码凝血酶切割位点的序列的PCR片段。纯化这片段,用PinAI消化,及连接到经PinAI消化的pF8-1434。测序确证了片段以正确方向插入,产生的质粒称为pF8-1563。

[0213] 插入柔性甘氨酸/丝氨酸接头:通过PCR从描述于W02007/090584的pFVII-937使用引物We2991及We2992(SEQ ID NO:12及13)扩增含31个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸接头的编码序列的PCR片段。该片段然后纯化,用限制性内切酶PinAI消化,及连接到经PinAI消化的pF8-1434。测序确证了片段以正确方向插入,产生的质粒称为pF8-1568。

[0214] 使用如上所述的流程及质粒,及通过应用本领域技术人员已知的分子生物学技术(及例如描述于Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel FM et al.(eds.) John Wiley&Sons,Inc.;<http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>),本领域技术人员可制备其他构建体以用另一HLEP代替白蛋白,或将任何其他接头插入到所述PinAI位点。将FVIII/白蛋白cDNA转移到适宜载体(如pIRESneo3(Invitrogen)及pEE12.4(Lonza))使得表达及筛选在CHO细胞中表达相应FVIII白蛋白融合蛋白的克隆。

[0215] 【实施例2】FVIII及VWF蛋白的转染及表达

[0216] 在大肠杆菌TOP10(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)中生长表达质粒,及使用标准流程(Qiagen,Hilden,Germany)纯化。使用脂质体2000试剂(Invitrogen)转染HEK-293(Invitrogen)细胞,及在无血清培养基(Invitrogen293表达)中,在4μg/ml嘌呤霉素及任选0.5IU/ml VWF的存在下生长。CHO细胞(CHO-S,Invitrogen;CHOK1SV,Lonza)使用脂质体2000试剂(Invitrogen)转染,及在无血清培养基(Invitrogen CD CHO,对于CHO-S,6mM谷氨酰胺;及对于CHOK1SV,CD-CHO)中,在500~1000μg/ml遗传霉素(仅CHO-S)存在下生长。为FVIII表达,任选添加0.5IU/ml VWF。为vWF表达,共转染描述于W02007/144173的编码PACE/弗林蛋白酶的表达质粒(pFu-797)。另一实验中,编码野生型VWF及于C-端融合到白蛋白的VWF的2种质粒与pFu-797共转染,产生与野生型VWF单体和白蛋白-融合的VWF单体的VWF多聚体(见图3)。转染的细胞群通过T-瓶散布到滚瓶或小规模发酵罐中,从中收获上清用于纯化。

[0217] 表2列出描述于实施例1的构建体的HEK-293表达数据。

[0218] 表2

[0219]

构建体	活性[U/mL]
-----	----------

[0220]

pF8-457	1.54
pF8-457+0.5U/ml VWF	1.66
pF8-1434	1.59
pF8-1434+0.5U/ml VWF	1.82
pF8-1563+0.5U/ml VWF	2.04
pF8-1568+0.5U/ml VWF	1.21

[0221] 【实施例3】FVIII白蛋白融合蛋白的增加的表达速率

[0222] 图1总结了无血清细胞培养中FVIII白蛋白融合蛋白的表达研究的结果。HEK-293细胞分别用pF8-1434(FVIII C-端白蛋白融合)及pF8-457(FVIII野生型)一式三份转染,用相等细胞数量接种于T80瓶,及在无稳定的VWF下生长。在96,120及144小时之后收获培养上清,及测试FVIII活性。

[0223] 结果显示当作为FVIII分子的完整部分存在时,细胞培养中白蛋白部分的表达增

强效果。结果,相比野生型FVIII,融合蛋白的情况产率明显提高(图1)。

[0224] 【实施例4】FVIII蛋白的纯化

[0225] 向含FVIII分子的表达上清添加足够量的免疫亲和树脂,以几乎完全结合FVIII活性。通过将适当的抗-FVIII MAb与用作支持物的Sephacryl S1000树脂共价结合来制备免疫亲和树脂。洗涤树脂之后,将其填充到层析柱中及再次洗涤。使用含250mM CaCl₂及50%1,2-乙二醇的缓冲液进行洗脱。

[0226] 合并含FVIII:C活性的免疫亲和层析(IAC)级分,相对制剂缓冲液(赋形剂:氯化钠,蔗糖,组氨酸,氯化钙,及Tween80)透析,及浓缩。样品冷冻保存或使用适当的冷冻干燥循环冷冻干燥。

[0227] 或者,将含FVIII的细胞培养上清通过第一次离子交换层析浓缩/纯化,然后使用免疫亲和层析(IAC)进一步纯化。此情况中,将离子交换层析的吸脱液使用上述树脂装进IAC柱。

[0228] 【实施例5】FVIII活性及抗原分析

[0229] 为FVIII:C体外活性确定,使用了凝血试验(例如Pathromtin SL试剂及Dade Behring提供的FVIII缺陷的血浆,Germany)或显色试验(例如Haemochrom提供的Coamatic FVIII:C试验)。根据生产商说明书进行试验。

[0230] 通过ELISA(本领域技术人员知道其表现)测定FVIII抗原(FVIII:Ag)。简言之,微平板用100μL/孔的捕获抗体(羊抗-人FVIII IgG,Cedarlane CL20035K-C,用缓冲液A[SIGMA C3041]以1:200稀释)于环境温度温育2小时。用缓冲液B(SIGMA P3563)洗涤板3次之后,在样品稀释缓冲液(Cedarlane)中测试样品的连续稀释液,以及样品稀释缓冲液中(体积/孔:100μL)FVIII制剂(CSLBehring;200~2μ/mL)的连续稀释液于环境温度温育2小时。用缓冲液B的3个洗涤步骤之后,将缺失抗体(羊抗-人FVIII IgG,Cedarlane CL20035K-D,过氧化物酶标记的)的用缓冲液B的100μL的1:2稀释液添加到各孔,及再于环境温度温育一小时。用缓冲液B的3个洗涤步骤之后,向每孔添加100μL的底物溶液(1:10(v/v)TMB OUVF:TMB缓冲液OUVG,Dade Behring),及于环境温度避光温育30分钟。添加100μL停止溶液(Dade Behring,OSFA),用适宜酶标仪在450nm波长处读取制得的样品。使用标准曲线,用FVIII制剂作为参照计算测试样品的浓度。

[0231] 【实施例6】单次静脉内注射后VWF ko小鼠中FVIII-FP的药代动力学的评估

[0232] 为了比较FVIII野生型(DNA457)与C-端FVIII-FP(DNA1656)的药代动力学,将两种FVIII变体静脉内施用给小鼠。选择VWF ko小鼠株(Denis C. et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1998,Vol95,9524-9529),因为,众多功能中,VWF作为FVIII的载体及稳定蛋白,因此保护FVIII免于成熟前降解,例如被蛋白酶,及免于成熟前从循环中消除。对于未修饰的FVIII而言,不中断的与VWF的相互作用是必要的,如由C端区突变引发的血友病A的病例中例示,导致与VWF的结合降低。但在修饰的FVIII的情况中,所述结合可甚至更不情愿,以检查或达到提高的药代动力学。因此,将两种产物以100U(FVIII:Ag)/kg的剂量作为推注静脉内注射给2组小鼠(表3)。始于测试物质应用之后5分钟及到24小时以适当间隔眼眶后采血样。取得一个血样品/小鼠,加工成血浆,及于-20℃冷冻保存待分析。分别使用特异于人FVIII的ELISA或通过特异于人白蛋白及FVIII的混合ELISA试验定量人FVIII:Ag浓度。使用各时间点合并的样品的平均血浆浓度计算药代动力学参数。使用根据

式 $t_{1/2}=\ln 2/k$ (其中 k 是回归线的斜率)的消除的 β 期的时间点计算半衰期。结果显示于图2。意料之外地,FVIII-FP1656($t_{1/2}=3,06$ 小时,5与960分钟之间)相比FVIII野生型($t_{1/2}=0,8$ 小时,5与240分钟之间)具有约3~4倍更长的末端半衰期。此外,FVIII-FP1656的恢复相比野生型FVIII增加约20%(表4)。

[0233] 表3:用于比较VWF ko小鼠中FVIII的药代动力学的处理组

[0234]

处理	剂量 (FVIII:C) /体积/日程表/途径	N
FVIII 野生型	100U (FVIII:Ag) /kg /0.2mL/20g b.w. /t=0 h /i.v..	24
FVIII-FP 1656	100U (FVIII:Ag) /kg /0.2mL/20g b.w. /t=0 h /i.v..	24

[0235] 表4:在给VWF ko小鼠静脉内注射后FVIII野生型和修饰的FVIII,FVIII-FP1656的生物利用度(%)

[0236]

处理	生物利用度(%)
FVIII野生型	100
FVIII-FP1656	120,4

[0237] 【实施例7】用于VWF野生型和VWF白蛋白融合蛋白的表达载体的产生

[0238] 首先产生在多克隆位点含全长VWFcDNA列的表达质粒。为此,通过聚合酶链式反应(PCR),使用引物组VWF+及VWF-(SEQ ID NO:17及18),在本领域技术人员已知的标准条件(及如描述于Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel FM et al.(eds.)John Wiley&Sons,Inc.;<http://www.current流程.com/WileyCDA/>)下,从含VWF cDNA的质粒(如可商购,例如自ATCC,No.67122的pMT2-VWF)扩增VWF的编码序列。产生的PCR片段用限制性内切酶EcoRI消化,及连接到已用过EcoRI线性化的表达载体pIRESpuro3(BD Biosciences, Franklin Lakes,NJ,USA)。产生的在CMV启动子下游含野生型VWF的cDNA的表达质粒称为pVWF-1570。

[0239] 从描述于W02007/090584的pFVII-937,使用引物We2994及We1335(SEQ ID NO:19及20)扩增含31个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸接头的编码序列及人白蛋白cDNA的PCR片段。这PCR片段再用限制性内切酶NotI消化,及连接到经NotI消化的pVWF-1570。产生的含VWF wt,接头序列及人白蛋白的编码序列的质称为pVWF-1574。

[0240] 为了实现融合蛋白的表达,需删除VWF与接头序列之间的几个碱基。这通过定点诱变,根据标准流程(QuickChange XL定点诱变试剂盒,Stratagene,La Jolla,CA,USA),使用寡核苷酸We2995及We2996(SEQ ID NO:21及22)进行。产生的表达质粒称为pVWF-1572,其含VWF及同框内的31个氨基酸的甘氨酸/丝氨酸接头及人白蛋白的编码序列。表达的rVWF-FP的氨基酸序列示于SEQ ID NO:25。人VWF前原蛋白的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:24。

[0241] 使用如上所述的流程及质粒,及通过应用本领域技术人员已知的分子生物学技术(及如描述于Current Protocols in Molecular Biology,ibid)本领域技术人员也可制备其他构建体,以用另外的HLEP序列替代白蛋白序列,或用另外的接头序列替代目前的接头序列。

[0242] 【实施例8】VWF及VWF白蛋白融合蛋白的纯化

[0243] 将含VWF野生型(rVWF wt)或VWF白蛋白融合蛋白(rVWF-FP)的细胞培养上清通过0.2μm过滤器无菌过滤,及相对平衡缓冲液(EB;10mM Tris-HCl,10mM CaCl₂,pH7.0)透析。此物质然后施加到用EB平衡的肝素Fractogel柱。柱用EB洗涤,及VWF蛋白用EB中的500mM NaCl洗脱。浓缩洗脱峰,及相对FB缓冲液(3g/L氯化钠,20g/L甘氨酸,5.5g/L柠檬酸三钠二水合物,pH7.0)洗脱。最终的物质经无菌过滤,及等分冷冻。如果需要,应用进一步纯化步骤,包括阴离子和/或阳离子交换层析,HIC及SEC。

[0244] 【实施例9】VWF活性及抗原的分析

[0245] 如生产商所述通过VWF:Ag(OPAB03,Siemens Healthcare Diagnostics,Marburg,Germany)的免疫浊度分析确定,及胶原结合(Technozym VWF:CBA ELISA,Ref.5450301with calibrator set 5450310and control set5450312,Technoclone,Vienna,Austria)来分析样品。

[0246] 使用Siemens Healthcare Diagnostics,Marburg,Germany的BC VWF试剂,根据生产商的说明书进行VWF:RCo测试。用国际浓缩物标准作为主要标准制剂以定标每日用的自用标准制剂。

[0247] 计算VWF:RCo及VWF:Ag比例试验,以比较所测不同构建体的此参数。如图3所示,VWF:RCo/VWF:Ag比与wt rVWF及C-端rVWF-白蛋白融合蛋白可比。

[0248] 为药代动力学分析,测定通过本领域技术人员已知其表现的ELISA测定VWF抗原。简言之,微平板用100μL/孔的捕获抗体(兔抗人VWF-IgG,Dako A0082[Dako,Hamburg,Germany],用缓冲液A[SIGMA C3041,SIGMA-Aldrich,Munich,Germany]以1:2000稀释)于环境温度温育过夜。用缓冲液B(SIGMA P3563)洗涤板3次之后,各孔用200μL缓冲液C(SIGMA P3688)于环境温度温育1.5小时(封闭)。用缓冲液B再来3个洗涤步骤之后,将测试样品在缓冲液B中的连续稀释液以及标准人血浆(ORKL21;20~0.2μ/mL;Siemens Healthcare Diagnostics,Marburg,Germany)在缓冲液B中的连续稀释液(体积/孔:100μL)于环境温度温育1.5小时。用缓冲液B再来3个洗涤步骤之后,将100μL缺失抗体(兔抗人VWF-IgG,Dako P0226,过氧化物酶标记的)的在缓冲液中的1:16000稀释液添加到各孔,及于环境温度温育1小时。用缓冲液B再来3个洗涤步骤之后,向每孔添加100μL底物溶液(OUVF,Siemens Healthcare Diagnostics),及于环境温度避光温育30分钟。添加100μL未稀释的停止稀释液(OSFA,Siemens Healthcare Diagnostics),用适宜酶标仪在450nm波长处读取制得的样品。然后使用标准曲线,用标准人血浆作为参照计算测试样品浓度。

[0249] 【实施例10】VWF及VWF白蛋白融合蛋白的多聚体分析

[0250] VWF多聚体分析如最近所述通过含最少修饰的SDS-琼脂糖凝胶电泳进行(Tatewaki et al.,Thromb.Res.52:23-32(1988),and Metzner et al.,Haemophilia4(Suppl.3):25-32(1998))。简言之,用即用的电泳缓冲液平衡之后,用1%的琼脂糖迷你胶(BioRad)来尽可能稳定方法。使可比较量的VWF抗原经历SDS-琼脂糖凝胶电泳。蛋白印迹之后,使用抗-VWF(DAKO,prod.No.0854)或抗-白蛋白抗体,然后碱性磷酸酶标记的抗-IgG抗体(SIGMA,prod.No.1305)及通过光密度测定法定量的颜色反应检测VWF蛋白条带。

[0251] 使用野生型rVWF(1570/797)及rVWF-FP(1572/797),可通过蛋白印迹显示,及使用抗-白蛋白或抗VWF抗体检测,通过抗-白蛋白及抗-VWF抗体检测到rVWF-FP形成规则的多聚体分布(图4)。这证实,尽管多聚体VWF的每个亚基含白蛋白,但形成规则的VWF多聚体模式。

白蛋白部分明显既不抑制N-端二聚化,也不抑制VWF分子的C-端多聚化。

[0252] 【实施例11】评估单次静脉内注射后大鼠中的VWF及VWF白蛋白融合蛋白的药代动力学

[0253] 静脉内施用rVWF-FP及rVWF wt至每个大鼠4CD。剂量是100U(VWF:Ag)/kg体重,以4mL/kg的注射体积。

[0254] 始于应用测试物质之后5分钟使用交替采样方案以适当间隔眼眶后采集血样品,从2个动物/时间点产生样品(对于亚组Nr, t=0, 5, 30, 90分钟, 4小时, 1天。对于亚组Nr. 2, 1及0.15分钟, 1, 2, 8小时及2天)。方案设计为最小化血采样对待定量的血浆浓度的潜在的影响。将血加工成血浆, 及深度冷冻保存待分析。随后通过描述于实施例9中的ELISA定量血浆中VWF:Ag水平。用平均血浆浓度计算药代动力学参数。使用消除的β期时间点, 根据式 $t_{1/2} = \ln 2/k$ (其中k是回归线的斜率)计算半衰期。

[0255] 结果显示于图5(n=2/时间点; 平均值)。末端半衰期计算为: 对于rVWF-FP是32.4分钟; 及对于rVWF wt是2.6分钟。rVWF-FP的恢复也提高, 相比rVWF wt的16.1%, 所述rVWF-FP的为42.1%。

序列表

	<110> CSL BEHRING GMBH CSL BEHRING GMBH	
	<120> 具有延长的体内半衰期的因子VIII，冯·维勒布兰德因子或它们的复合物	
	<130> 2008 M004 A145	
	<150> EP 08011429.1	
	<151> 2008-06-24	
	<160> 25	
	<170> PatentIn version 3.3	
	<210> 1	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 1 caatgccatt gaaccaagac gagaaataac tcgtac	36
	<210> 2	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
[0001]	<400> 2 gtacgagtta ttctcgtct tgggtcaatg gcattg	36
	<210> 3	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 3 caatgccatt gaaccaagac gtcgtggtcg acgagaaata actcgtac	48
	<210> 4	
	<211> 48	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 4 gtacgagtta ttctcgtcg accacgacgt ctiggttcaa tggcattg	48
	<210> 5	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 5 cattattccg gatcaatcaa tgc	23

[0002]	<210>	6	
	<211>	38	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	6	
		acgcggccgc ggtaccggtg tagaggtcct gtgcctcg	38
	<210>	7	
	<211>	31	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	7	
		gtgaccggtg atgcacacaa gagtggagggt g	31
	<210>	8	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工的	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	8	
		cacgcggccg cctataagcc taaggcagct tg	32
	<210>	9	
	<211>	2016	
	<212>	PRT	
	<213>	智人 (Homo sapiens)	
	<400>	9	
		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	
		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		
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		

[0003]

	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	
	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	
[0004]	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
	Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser	Lys Asn Asn Ala			
		725	730	735	
	Ile Glu Pro Arg Arg Arg Gly Arg Arg Glu Ile Thr	Arg Thr Thr Leu			

	740		745		750
Gln Ser Asp	Gln Glu Glu Ile	Asp Tyr Asp Asp Thr	Ile Ser Val Glu		
755		760	765		
Met Lys Lys	Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu	Asp Glu Asn Gln Ser			
770	775	780			
Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe	Ile Ala Ala Val			
785	790	795	800		
Glu Arg Leu	Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser	Pro His Val Leu Arg			
	805	810	815		
Asn Arg Ala	Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys	Val Val Phe			
	820	825	830		
Gln Glu Phe	Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu				
	835	840	845		
Leu Asn Glu	His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val				
	850	855	860		
Glu Asp Asn	Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr				
865	870	875	880		
Ser Phe Tyr	Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly				
	885	890	895		
Ala Glu Pro	Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr				
	900	905	910		
Phe Trp Lys	Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp				
	915	920	925		
Cys Lys Ala	Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val				
	930	935	940		
His Ser Gly	Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu				
945	950	955	960		
Asn Pro Ala	His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe				
	965	970	975		
Phe Thr Ile	Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met				
	980	985	990		
Glu Arg Asn	Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr				
	995	1000	1005		
Phe Lys Glu	Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met				
	1010	1015	1020		
Asp Thr Leu	Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg				
	1025	1030	1035		
Trp Tyr Leu	Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile				

[0005]

[0006]

1040	1045	1050
His Phe Ser Gly His Val	Phe Thr Val Arg Lys	Lys Glu Glu Tyr
1055	1060	1065
Lys Met Ala Leu Tyr Asn	Leu Tyr Pro Gly Val	Phe Glu Thr Val
1070	1075	1080
Glu Met Leu Pro Ser Lys	Ala Gly Ile Trp Arg	Val Glu Cys Leu
1085	1090	1095
Ile Gly Glu His Leu His	Ala Gly Met Ser Thr	Leu Phe Leu Val
1100	1105	1110
Tyr Ser Asn Lys Cys Gln	Thr Pro Leu Gly Met	Ala Ser Gly His
1115	1120	1125
Ile Arg Asp Phe Gln Ile	Thr Ala Ser Gly Gln	Tyr Gly Gln Trp
1130	1135	1140
Ala Pro Lys Leu Ala Arg	Leu His Tyr Ser Gly	Ser Ile Asn Ala
1145	1150	1155
Trp Ser Thr Lys Glu Pro	Phe Ser Trp Ile Lys	Val Asp Leu Leu
1160	1165	1170
Ala Pro Met Ile Ile His	Gly Ile Lys Thr Gln	Gly Ala Arg Gln
1175	1180	1185
Lys Phe Ser Ser Leu Tyr	Ile Ser Gln Phe Ile	Ile Met Tyr Ser
1190	1195	1200
Leu Asp Gly Lys Lys Trp	Gln Thr Tyr Arg Gly	Asn Ser Thr Gly
1205	1210	1215
Thr Leu Met Val Phe Phe	Gly Asn Val Asp Ser	Ser Gly Ile Lys
1220	1225	1230
His Asn Ile Phe Asn Pro	Pro Ile Ile Ala Arg	Tyr Ile Arg Leu
1235	1240	1245
His Pro Thr His Tyr Ser	Ile Arg Ser Thr Leu	Arg Met Glu Leu
1250	1255	1260
Met Gly Cys Asp Leu Asn	Ser Cys Ser Met Pro	Leu Gly Met Glu
1265	1270	1275
Ser Lys Ala Ile Ser Asp	Ala Gln Ile Thr Ala	Ser Ser Tyr Phe
1280	1285	1290
Thr Asn Met Phe Ala Thr	Trp Ser Pro Ser Lys	Ala Arg Leu His
1295	1300	1305
Leu Gln Gly Arg Ser Asn	Ala Trp Arg Pro Gln	Val Asn Asn Pro
1310	1315	1320
Lys Glu Trp Leu Gln Val	Asp Phe Gln Lys Thr	Met Lys Val Thr

[0007]

1325	1330	1335
Gly Val Thr Thr Gln Gly	Val Lys Ser Leu Leu Thr	Ser Met Tyr
1340	1345	1350
Val Lys Glu Phe Leu Ile	Ser Ser Ser Gln Asp Gly	His Gln Trp
1355	1360	1365
Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly	Lys Val Lys Val Phe	Gln Gly Asn
1370	1375	1380
Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val	Val Asn Ser Leu Asp	Pro Pro Leu
1385	1390	1395
Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile	His Pro Gln Ser Trp	Val His Gln
1400	1405	1410
Ile Ala Leu Arg Met Glu Val	Leu Gly Cys Glu Ala	Gln Asp Leu
1415	1420	1425
Tyr Thr Gly Asp Ala His Lys	Ser Glu Val Ala His	Arg Phe Lys
1430	1435	1440
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe	Lys Ala Leu Val Leu	Ile Ala Phe
1445	1450	1455
Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys	Pro Phe Glu Asp His	Val Lys Leu
1460	1465	1470
Val Asn Glu Val Thr Glu Phe	Ala Lys Thr Cys Val	Ala Asp Glu
1475	1480	1485
Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys	Ser Leu His Thr Leu	Phe Gly Asp
1490	1495	1500
Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr	Leu Arg Glu Thr Tyr	Gly Glu Met
1505	1510	1515
Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln	Glu Pro Glu Arg Asn	Glu Cys Phe
1520	1525	1530
Leu Gln His Lys Asp Asp Asn	Pro Asn Leu Pro Arg	Leu Val Arg
1535	1540	1545
Pro Glu Val Asp Val Met Cys	Thr Ala Phe His Asp	Asn Glu Glu
1550	1555	1560
Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu	Tyr Glu Ile Ala Arg	Arg His Pro
1565	1570	1575
Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu	Leu Phe Phe Ala Lys	Arg Tyr Lys
1580	1585	1590
Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys	Gln Ala Ala Asp Lys	Ala Ala Cys
1595	1600	1605
Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu	Leu Arg Asp Glu Gly	Lys Ala Ser

[0008]

1610	1615	1620
Ser Ala Lys Gln Arg Leu	Lys Cys Ala Ser Leu	Gln Lys Phe Gly
1625	1630	1635
Glu Arg Ala Phe Lys Ala	Trp Ala Val Ala Arg Leu	Ser Gln Arg
1640	1645	1650
Phe Pro Lys Ala Glu Phe	Ala Glu Val Ser Lys Leu	Val Thr Asp
1655	1660	1665
Leu Thr Lys Val His Thr	Glu Cys Cys His Gly Asp	Leu Leu Glu
1670	1675	1680
Cys Ala Asp Asp Arg Ala	Asp Leu Ala Lys Tyr Ile	Cys Glu Asn
1685	1690	1695
Gln Asp Ser Ile Ser Ser	Lys Leu Lys Glu Cys Cys	Glu Lys Pro
1700	1705	1710
Leu Leu Glu Lys Ser His	Cys Ile Ala Glu Val Glu	Asn Asp Glu
1715	1720	1725
Met Pro Ala Asp Leu Pro	Ser Leu Ala Ala Asp Phe	Val Glu Ser
1730	1735	1740
Lys Asp Val Cys Lys Asn	Tyr Ala Glu Ala Lys Asp	Val Phe Leu
1745	1750	1755
Gly Met Phe Leu Tyr Glu	Tyr Ala Arg Arg His Pro	Asp Tyr Ser
1760	1765	1770
Val Val Leu Leu Leu Arg	Leu Ala Lys Thr Tyr Glu	Thr Thr Leu
1775	1780	1785
Glu Lys Cys Cys Ala Ala	Ala Asp Pro His Glu Cys	Tyr Ala Lys
1790	1795	1800
Val Phe Asp Glu Phe Lys	Pro Leu Val Glu Glu Pro	Gln Asn Leu
1805	1810	1815
Ile Lys Gln Asn Cys Glu	Leu Phe Glu Gln Leu Gly	Glu Tyr Lys
1820	1825	1830
Phe Gln Asn Ala Leu Leu	Val Arg Tyr Thr Lys Lys	Val Pro Gln
1835	1840	1845
Val Ser Thr Pro Thr Leu	Val Glu Val Ser Arg Asn	Leu Gly Lys
1850	1855	1860
Val Gly Ser Lys Cys Cys	Lys His Pro Glu Ala Lys	Arg Met Pro
1865	1870	1875
Cys Ala Glu Asp Tyr Leu	Ser Val Val Leu Asn Gln	Leu Cys Val
1880	1885	1890
Leu His Glu Lys Thr Pro	Val Ser Asp Arg Val Thr	Lys Cys Cys

	1895	1900	1905
	Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu		
	1910	1915	1920
	Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe		
	1925	1930	1935
	Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln		
	1940	1945	1950
	Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro		
	1955	1960	1965
	Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala		
	1970	1975	1980
	Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys		
	1985	1990	1995
	Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala		
	2000	2005	2010
	Leu Gly Leu		
	2015		
[0009]	<210> 10		
	<211> 31		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物		
	<400> 10		
	gcgaccggtg atgacaactc tecttcttt a		31
	<210> 11		
	<211> 31		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物		
	<400> 11		
	gcgaccggtc caagtcttag gatgcttctt g		31
	<210> 12		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		
	<220>		
	<223> 引物		
	<400> 12		
	gcgaccggtt cgagcggggg atctggc		27
	<210> 13		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> 人工的		

<220>		
<223>	引物	
<400>	13	
gcgaccggtg gatccccgacc ctccagag		28
<210>	14	
<211>	7020	
<212>	DNA	
<213>	智人	
<400>	14	
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgecttt tgcgattctg ctttagtgcc	60	
accagaagat actacciggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120	
ggtagctgc ctgtggacgc aagattlccf cctagagigc caaaatcttt tccattcaac	180	
acctcagtcg tgtacaaaaa gaetctgttt gtagaattca cggatcaect ttccaacatc	240	
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccagc tgaggtttat	300	
galacagigg tcaflacact laagaacalg gcllccalc ctgtcagcti tcaigcigl	360	
gggtatcet actggaaaage ttctgagga gctgaatatg atgateagac cagtcaaagg	420	
gagaaagaag atgataaagt ctccctgggt ggaagccata catatgtctg gcaggicctg	480	
aaagagaatg glccaalggc ctctgaccea ctgtgctlla cctactcala tctttctcal	540	
gtggacctgg taaaagacit gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600	
gggagctcgg ccaaggaaaa gacacagacc itgcacaaaf ttatactact ttttctgt	660	
tttgatgaag ggaaaagtgg gcaactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720	
gtgcatctg ctccggcctg gcctnaaatg cacacagtca atggttatgt aacaggtct	780	
ctgccaggtc tgatiggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaaatggc	840	
accactectg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900	
cgccaggcgt ccttggnaat ctccccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960	
gaccttggac agtttctact gttttgctat atctcttccc accaactatga tggcatggaa	1020	
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080	
gaagcgaag actatgatga tgatcttact gattctgaan tggatgttgt caggtttgat	1140	
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgtcagttg ccaagaagca tcttaaaact	1200	
tgggtacatt acattgtgc tgaagaggag gactgggact atgtccctt agtctctgac	1260	
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gatttgtagg	1320	
aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tegtgaaget	1380	
attcagcatg aatcaggaat ctggggacct ttactttatg gggaggttg agacacactg	1440	
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctacctca cggaaatcact	1500	
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggt taaaacattt gaaggatttt	1560	
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620	
actaaatcag atctctgggt cctgaccege tattactcta gtttctgtaa tatggagaga	1680	
gactatagct caggacicat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgiatgacaa	1740	
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgtttctgt attigatgag	1800	
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tcccaatcc agctggagtg	1860	
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagatcaa tggctatgtt	1920	

[0010]

[0011]

```

tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggttg catacttgta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggctctatg aagacacact caccctattc ccatttcicag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggctctatg gattctgggg tgcacaaact cagactttcg gaacagagge 2160
atgaccgctt tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
agttaigaag atatttcagc atacttgcgt agtaaaaaa atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga attcaagaca ccttagcact aggcacaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgacctt tggtttgcac acagaacacc tatgcctaaa 2400
atacaaaatg tctctctctag tgatttgttg atgctcttgc gacagagtec tactccacat 2460
gggctatctt tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520
cctggagcna tagacagtaa taacagcctg tctgaantga cacacttcag gccacagctc 2580
catcacagtg gggacatggt attfacectt gagicaggcc tccaattaag attaaatgag 2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700
tcaaaataac tgaattcaac aatccatca gacaatttgg cagcagglae tgataataca 2760
agtteettag gacccccaa g tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820
tttgcaaaaa agtcacttcc cttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880
aataatgatt caaagttgtt agaattcaggt ttaatgaata gccaaagaa ttcatgggga 2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaa ggaagagagc tcatggacct 3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagtttagc tctctttgtt aaagacaaac 3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta 3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa 3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgcit aiggacaaaa atgctacagc ttigaggcta 3240
aatcataatg caaataaaa tactticatca aaaaacatgg aaatggteca acagaaaaaa 3300
gagggecccc ttcaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttta gatgetattc 3360
ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaaag actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420
caaggccccg gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag 3480
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggtg gtaggaagg gtgaatttac aaaggacgta 3540
ggactcaaa gagaatgttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat 3600
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaaatc aggaagaaat agaaaagaag 3660
gaaacattaa tccaagagaa ttagttttg cctcagatac atacagtgac tggcactaag 3720
aatttcata gaacaccttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcataigac 3780
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaa ggggaggaag aaaacttggg aggcttggga 3900
aatcaaaeca agcanattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatate tectaataca 3960
agccagcaga attttgcac gcaacgtagt aagagagctt tgaacaatt cagactacca 4020
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggtcc 4080
aaaaacatga aacatttgac cccagcacc ctccacaga tagactacaa tgagaaggag 4140
aaaggggcca ttactcagtc tccctatca gatigccta cgaggagtea tagcatecct 4200

```

[0012]

caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catticcatc tattagacct 4260
 atatattctga ccagggiect attccaagac aactcttctc atcttccage agcatcttat 4320
 agaaagaaag attctgggtt ccaagaaage agtcatttct tacaaggage caaaaaaaat 4380
 aaacctttctt tagccattct aaccttggag atgactgggt atcaaagaga ggttggctcc 4440
 ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg 4500
 aaaccagact igcccaaaac atctggcaaa gtigaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560
 cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctctgt 4620
 gaaggagacc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680
 ggaaaagtgc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740
 ttgatctctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800
 tcccaagaga agtcaccaga aaaaacagct tttaagaaaa aggataccat ttgtccctg 4860
 aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa 4920
 atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaagge tgtgctctca aaaccacca 4980
 gtcttgaac gccatcaacg ggaataaact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040
 attgaetatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat 5100
 gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cagcacacia ttttattgct 5160
 gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cecatgttct aagaaacagg 5220
 gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagtgtttt tccaggaaatt tactgatggc 5280
 tectttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca 5340
 tatataagag cagaagtiga agataaatc atggtaactt tcagaaatca ggccctcctg 5400
 cectattcct tetattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460
 cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttggaa agtgcaacat 5520
 catatggcac ccaactaaaga tgagtttgac tgcaaaagcc gggtctattt ctctgatgtt 5580
 gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640
 acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgcctt gtitttcacc 5700
 atctttgatg agaccaaaag ctggtacttc actgaaata tggaaagaaa ctgcagggt 5760
 cccgtcaata tccagatgga agatcccact tttaagaga attatcgctt ccaigcaatc 5820
 aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggaticga 5880
 tggatatctg tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
 gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000
 gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa ttggcgggt ggaatgcctt 6060
 attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acacttttct tgggtgacag caataagtgt 6120
 cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
 caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggate aatcaatgcc 6240
 tggagacca aggagccctt ttcttggate aaggctggate tgttggeacc aatgattatt 6300
 cagggcatca agaccagggt tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
 atcatcatgt atagtctiga tgggaagaag tggcagactt atcaggaaa ttccactgga 6420
 accttaatgg tcttcttttg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480

```

cctccaattt ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tgcagcact 6540
cttcgcattg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaaaggag 6600
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcactct acttiaccaat tatgtttgce 6660
acctggctct cttcaaaaagc tgcacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
caggatgaata atccaaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
ggagtaacta ctcagggagt aaaaatctctg cttaccagca tgtaigtgaa ggagttcctc 6840
aactccagea gtcaagatgg ccacagtggt actctctttt tticagaatgg caaagtaaag 6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtgtgta actctctaga cccaccgtta 6960
ctgactcgct accttcgaat tcaccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020

```

<210> 15
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

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

[0013]

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

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

[0014]

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
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
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
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 Arg 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			

[0015]

[0016]

	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
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
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
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			

[0017]

1100	1105	1110
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
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 Glu 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

[0018]

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
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
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu	Asp Phe Asp Ile Tyr	Asp Glu Asp

[0019]

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 Asa 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
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu 1865	1870	1875
Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu 1880	1885	1890
Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu 1895	1900	1905
Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly 1910	1915	1920
Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1925	1930	1935
Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1940	1945	1950
His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys		

[0020]

1955	1960	1965
Glu Glu Tyr Lys Met Ala	Leu Tyr Asn Leu Tyr	Pro Gly Val Phe
1970	1975	1980
Glu Thr Val Glu Met Leu	Pro Ser Lys Ala Gly	Ile Trp Arg Val
1985	1990	1995
Glu Cys Leu Ile Gly Glu	His Leu His Ala Gly	Met Ser Thr Leu
2000	2005	2010
Phe Leu Val Tyr Ser Asn	Lys Cys Gln Thr Pro	Leu Gly Met Ala
2015	2020	2025
Ser Gly His Ile Arg Asp	Phe Gln Ile Thr Ala	Ser Gly Gln Tyr
2030	2035	2040
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
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> 16		
<211> 585		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 16		
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
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

[0021]

[0022]

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
 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	
	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> 17 <211> 30 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
[0023]	<400> 17 ttcgaattcc cgcagccctc atttgcaggg	30
	<210> 18 <211> 31 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 18 tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c	31
	<210> 19 <211> 25 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 19 gcggcggccg cgagcccat ttcce	25
	<210> 20 <211> 18 <212> DNA <213> 人工的	
	<220> <223> 引物	
	<400> 20 gagaggagt actcaccc	18

	<210> 21	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 21	
	ggaagtgcag caagtcgagc ggggat	27
	<210> 22	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工的	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 22	
	atccccgcgt cgacttgcg cacttcc	27
	<210> 23	
	<211> 585	
	<212> PRT	
	<213> 智人	
	<400> 23	
	Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu	
	1 5 10 15	
[0024]	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	
	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	

[0025]

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	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	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
 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> 24
 <211> 2813
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 24
 [0026] Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30
 Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45
 Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60
 Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95
 Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110
 Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125
 Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140
 Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160

	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	Ile	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Phe	Met	Thr	Gln	
				165						170						175	
	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala	
				180					185						190		
	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	Trp	Cys	Glu	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	
			195					200						205			
	Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln	
		210					215					220					
	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu	
	225					230					235					240	
	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu	
					245					250					255		
	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	
				260					265					270			
	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Asp	His	
			275					280					285				
	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys	
		290					295					300					
[0027]	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Asn	Glu	Met	
	305					310					315				320		
	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu	
					325					330					335		
	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	Pro	Cys	Val	His	
				340					345					350			
	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Cys	Asn	
			355					360					365				
	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	Asn	Glu	Glu	Cys	
		370					375					380					
	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	Lys	Ser	Phe	Asp	
	385					390					395					400	
	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	Leu	Leu	Ala	Arg	
					405					410					415		
	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu	Thr	Val	Gln	Cys	
				420					425					430			
	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Val	Arg	Leu	
			435					440					445				
	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His	Gly	Ala	Gly	Val	
		450					455					460					

	Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu	465	470	475	480
	Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu	485	490	495	
	Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu	500	505	510	
	Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn	515	520	525	
	Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro	530	535	540	
	Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln	545	550	555	560
	Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met	565	570	575	
	Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe	580	585	590	
	Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys	595	600	605	
[0028]	Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly	610	615	620	
	Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val	625	630	635	640
	Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln	645	650	655	
	Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu	660	665	670	
	Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe	675	680	685	
	Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys	690	695	700	
	Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp	705	710	715	720
	Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met	725	730	735	
	His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val	740	745	750	
	Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg	755	760	765	

[0029]

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
 770 775 780
 Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
 785 790 795 800
 Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
 805 810 815
 His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
 820 825 830
 Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr
 835 840 845
 Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp
 850 855 860
 Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly
 865 870 875 880
 Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp
 885 890 895
 Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys
 900 905 910
 Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu
 915 920 925
 Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940
 Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960
 Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg
 965 970 975
 His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val
 980 985 990
 Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr
 995 1000 1005
 Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn
 1010 1015 1020
 Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
 1025 1030 1035
 Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
 1040 1045 1050
 Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
 1055 1060 1065

	Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val	
	1070 1075 1080	
	Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala	
	1085 1090 1095	
	Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln	
	1100 1105 1110	
	His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln	
	1115 1120 1125	
	Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu	
	1130 1135 1140	
	Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln	
	1145 1150 1155	
	His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys	
	1160 1165 1170	
	His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln	
	1175 1180 1185	
	Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly	
	1190 1195 1200	
[0030]	Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp	
	1205 1210 1215	
	Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr	
	1220 1225 1230	
	Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr	
	1235 1240 1245	
	Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser	
	1250 1255 1260	
	Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu	
	1265 1270 1275	
	Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe	
	1280 1285 1290	
	Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg	
	1295 1300 1305	
	Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp	
	1310 1315 1320	
	Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser	
	1325 1330 1335	
	Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln	
	1340 1345 1350	

	Val	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile
	1355						1360					1365			
	Phe	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Thr	Leu	Leu
	1370						1375					1380			
	Leu	Met	Ala	Ser	Gln	Glu	Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val
	1385						1390					1395			
	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro
	1400						1405					1410			
	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His	Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile
	1415						1420					1425			
	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu	Asn	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val
	1430						1435					1440			
	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Arg	Asp	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys
	1445						1450					1455			
	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro	Thr	Leu	Pro	Pro	Asp	Met
	1460						1465					1470			
	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu	Gly	Val	Ser	Thr	Leu
	1475						1480					1485			
[0031]	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Leu
	1490						1495					1500			
	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn	Arg	Ser	Lys
	1505						1510					1515			
	Glu	Phe	Met	Glu	Glu	Val	Ile	Gln	Arg	Met	Asp	Val	Gly	Gln	Asp
	1520						1525					1530			
	Ser	Ile	His	Val	Thr	Val	Leu	Gln	Tyr	Ser	Tyr	Met	Val	Thr	Val
	1535						1540					1545			
	Glu	Tyr	Pro	Phe	Ser	Glu	Ala	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Leu	Gln
	1550						1555					1560			
	Arg	Val	Arg	Glu	Ile	Arg	Tyr	Gln	Gly	Gly	Asn	Arg	Thr	Asn	Thr
	1565						1570					1575			
	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Tyr	Leu	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Leu	Val	Ser
	1580						1585					1590			
	Gln	Gly	Asp	Arg	Glu	Gln	Ala	Pro	Asn	Leu	Val	Tyr	Met	Val	Thr
	1595						1600					1605			
	Gly	Asn	Pro	Ala	Ser	Asp	Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile
	1610						1615					1620			
	Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly	Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu
	1625						1630					1635			

	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp	Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp
	1640						1645					1650			
	Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg	Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg
	1655						1660					1665			
	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly	Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala
	1670						1675					1680			
	Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro	Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly
	1685						1690					1695			
	Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala	Ser	Tyr	Phe	Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe
	1700						1705					1710			
	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser	Lys	Ala	Asn	Ile	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr
	1715						1720					1725			
	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Asp	Val
	1730						1735					1740			
	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Val
	1745						1750					1755			
	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala
	1760						1765					1770			
[0032]	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	Gly	Ala
	1775						1780					1785			
	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Val
	1790						1795					1800			
	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Asn
	1805						1810					1815			
	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ala
	1820						1825					1830			
	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	Asn	Val
	1835						1840					1845			
	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Thr	Leu
	1850						1855					1860			
	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Ile
	1865						1870					1875			
	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	Val	Trp
	1880						1885					1890			
	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly
	1895						1900					1905			
	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	Gly	Leu
	1910						1915					1920			

	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu
	1925						1930					1935			
	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser
	1940						1945					1950			
	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu
	1955						1960					1965			
	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp
	1970						1975					1980			
	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg
	1985						1990					1995			
	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser
	2000						2005					2010			
	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu
	2015						2020					2025			
	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr
	2030						2035					2040			
	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile
	2045						2050					2055			
[0033]	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser
	2060						2065					2070			
	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys
	2075						2080					2085			
	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val
	2090						2095					2100			
	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg
	2105						2110					2115			
	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val
	2120						2125					2130			
	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala
	2135						2140					2145			
	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys
	2150						2155					2160			
	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala
	2165						2170					2175			
	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp
	2180						2185					2190			
	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val
	2195						2200					2205			

	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn
	2210						2215					2220			
	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro
	2225						2230					2235			
	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala
	2240						2245					2250			
	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu
	2255						2260					2265			
	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys
	2270						2275					2280			
	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr
	2285						2290					2295			
	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg
	2300						2305					2310			
	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp
	2315						2320					2325			
	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly
	2330						2335					2340			
[0034]	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe
	2345						2350					2355			
	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro
	2360						2365					2370			
	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys
	2375						2380					2385			
	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val
	2390						2395					2400			
	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys
	2405						2410					2415			
	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys	Val	His
	2420						2425					2430			
	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys
	2435						2440					2445			
	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu
	2450						2455					2460			
	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg
	2465						2470					2475			
	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg
	2480						2485					2490			

	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	
	2495						2500					2505				
	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser	
	2510						2515					2520				
	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu	
	2525						2530					2535				
	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu	
	2540						2545					2550				
	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	
	2555						2560					2565				
	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Cys	Met	
	2570						2575					2580				
	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met	Ile	Asp	
	2585						2590					2595				
	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Glu	Val	Gly	Val	Ile	Ser	
	2600						2605					2610				
	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro	Cys	Pro	
	2615						2620					2625				
[0035]	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	
	2630						2635					2640				
	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly	Gln	Ile	
	2645						2650					2655				
	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys	Asp	Thr	
	2660						2665					2670				
	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp	Glu	Lys	
	2675						2680					2685				
	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys	Leu	Ala	
	2690						2695					2700				
	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys	Asp	Thr	
	2705						2710					2715				
	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu	Gln	Tyr	
	2720						2725					2730				
	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val	Asp	Ile	His	
	2735						2740					2745				
	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser	Ile	Asp	
	2750						2755					2760				
	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro	Thr	Arg	
	2765						2770					2775				

Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
2780 2785 2790

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys
2810

<210> 25

<211> 3429

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人VWF白蛋白融合前原蛋白的氨基酸序列

<400> 25

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
20 25 30

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

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
50 55 60

[0036]

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln
210 215 220

	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu
	225					230					235					240
	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu
					245					250					255	
	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala
				260					265					270		
	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Asp	His
			275					280					285			
	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys
		290					295					300				
	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Asn	Glu	Met
	305					310					315				320	
	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu
					325					330					335	
	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	Pro	Cys	Val	His
				340					345					350		
	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Cys	Asn
			355					360					365			
[0037]	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	Asn	Glu	Glu	Cys
	370					375						380				
	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	Lys	Ser	Phe	Asp
	385					390					395					400
	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	Leu	Leu	Ala	Arg
					405				410						415	
	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu	Thr	Val	Gln	Cys
			420						425					430		
	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Val	Arg	Leu
			435					440					445			
	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His	Gly	Ala	Gly	Val
		450					455					460				
	Ala	Met	Asp	Gly	Gln	Asp	Ile	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu
	465					470					475					480
	Arg	Ile	Gln	His	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Tyr	Gly	Glu
					485				490						495	
	Asp	Leu	Gln	Met	Asp	Trp	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Lys	Leu
				500					505					510		
	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Tyr	Asn
			515					520					525			

[0038]

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540
 Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555 560
 Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575
 Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590
 Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605
 Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620
 Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640
 Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655
 Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670
 Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe
 675 680 685
 Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys
 690 695 700
 Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp
 705 710 715 720
 Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met
 725 730 735
 His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val
 740 745 750
 Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg
 755 760 765
 Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu
 770 775 780
 Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met
 785 790 795 800
 Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg
 805 810 815
 His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln
 820 825 830

	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	
	835							840					845				
	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp	
	850						855					860					
	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	
	865					870					875					880	
	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp	
					885						890				895		
	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	
				900					905					910			
	Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu	
			915					920					925				
	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys	
		930					935					940					
	Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg	
	945					950					955					960	
	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg	
				965						970					975		
[0039]	His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	
			980						985					990			
	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	
		995						1000					1005				
	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn		
		1010					1015					1020					
	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro		
		1025					1030					1035					
	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln		
		1040					1045					1050					
	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe		
		1055					1060					1065					
	Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val		
		1070					1075					1080					
	Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala		
		1085					1090					1095					
	Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln		
		1100					1105					1110					
	His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln		
		1115					1120					1125					

	Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu 1130 1135 1140
	Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln 1145 1150 1155
	His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys 1160 1165 1170
	His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln 1175 1180 1185
	Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly 1190 1195 1200
	Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp 1205 1210 1215
	Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr 1220 1225 1230
	Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr 1235 1240 1245
	Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser 1250 1255 1260
[0040]	Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu 1265 1270 1275
	Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe 1280 1285 1290
	Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg 1295 1300 1305
	Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp 1310 1315 1320
	Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser 1325 1330 1335
	Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln 1340 1345 1350
	Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile 1355 1360 1365
	Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu 1370 1375 1380
	Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val 1385 1390 1395
	Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro 1400 1405 1410

	Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile 1415 1420 1425
	Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val 1430 1435 1440
	Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys 1445 1450 1455
	Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met 1460 1465 1470
	Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu 1475 1480 1485
	Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu 1490 1495 1500
	Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys 1505 1510 1515
	Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp 1520 1525 1530
	Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val 1535 1540 1545
[0041]	Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln 1550 1555 1560
	Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr 1565 1570 1575
	Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser 1580 1585 1590
	Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr 1595 1600 1605
	Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile 1610 1615 1620
	Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu 1625 1630 1635
	Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp 1640 1645 1650
	Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg 1655 1660 1665
	Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala 1670 1675 1680
	Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly 1685 1690 1695

	Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe 1700 1705 1710
	Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr 1715 1720 1725
	Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val 1730 1735 1740
	Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val 1745 1750 1755
	Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala 1760 1765 1770
	Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala 1775 1780 1785
	Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val 1790 1795 1800
	Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn 1805 1810 1815
	Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala 1820 1825 1830
[0042]	Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val 1835 1840 1845
	Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu 1850 1855 1860
	Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile 1865 1870 1875
	Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp 1880 1885 1890
	Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly 1895 1900 1905
	Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu 1910 1915 1920
	Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu 1925 1930 1935
	Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser 1940 1945 1950
	Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu 1955 1960 1965
	Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp 1970 1975 1980

	Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	
	1985						1990					1995				
	Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser	
	2000						2005					2010				
	Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu	
	2015						2020					2025				
	Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr	
	2030						2035					2040				
	Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile	
	2045						2050					2055				
	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	
	2060						2065					2070				
	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	
	2075						2080					2085				
	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	
	2090						2095					2100				
	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	
	2105						2110					2115				
[0043]	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	
	2120						2125					2130				
	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	
	2135						2140					2145				
	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	
	2150						2155					2160				
	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	
	2165						2170					2175				
	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	
	2180						2185					2190				
	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	
	2195						2200					2205				
	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	
	2210						2215					2220				
	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	
	2225						2230					2235				
	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	
	2240						2245					2250				
	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	
	2255						2260					2265				

	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	
	2270						2275					2280				
	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	
	2285						2290					2295				
	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	
	2300						2305					2310				
	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	
	2315						2320					2325				
	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	
	2330						2335					2340				
	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	
	2345						2350					2355				
	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	
	2360						2365					2370				
	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	
	2375						2380					2385				
	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val	
	2390						2395					2400				
[0044]	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	
	2405						2410					2415				
	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys	Val	His	
	2420						2425					2430				
	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys	
	2435						2440					2445				
	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu	
	2450						2455					2460				
	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	
	2465						2470					2475				
	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	
	2480						2485					2490				
	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	
	2495						2500					2505				
	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser	
	2510						2515					2520				
	Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu	
	2525						2530					2535				
	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu	
	2540						2545					2550				

	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser
	2555						2560					2565			
	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Cys	Met
	2570						2575					2580			
	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met	Ile	Asp
	2585						2590					2595			
	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly	Val	Ile	Ser
	2600						2605					2610			
	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro	Cys	Pro
	2615						2620					2625			
	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg
	2630						2635					2640			
	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly	Gln	Ile
	2645						2650					2655			
	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys	Asp	Thr
	2660						2665					2670			
	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp	Glu	Lys
	2675						2680					2685			
[0045]	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys	Leu	Ala
	2690						2695					2700			
	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys	Asp	Thr
	2705						2710					2715			
	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu	Gln	Tyr
	2720						2725					2730			
	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val	Asp	Ile	His
	2735						2740					2745			
	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser	Ile	Asp
	2750						2755					2760			
	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro	Thr	Arg
	2765						2770					2775			
	Thr	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Leu	His	Cys	Thr	Asn	Gly	Ser	Val
	2780						2785					2790			
	Val	Tyr	His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Lys	Cys	Ser	Pro
	2795						2800					2805			
	Arg	Lys	Cys	Ser	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	2810						2815					2820			
	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
	2825						2830					2835			

	Ser Gly Gly Ser Gly Ser	Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His
	2840	2845 2850
	Arg Phe Lys Asp Leu Gly	Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu
	2855	2860 2865
	Ile Ala Phe Ala Gln Tyr	Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His
	2870	2875 2880
	Val Lys Leu Val Asn Glu	Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val
	2885	2890 2895
	Ala Asp Glu Ser Ala Glu	Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu
	2900	2905 2910
	Phe Gly Asp Lys Leu Cys	Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr
	2915	2920 2925
	Gly Glu Met Ala Asp Cys	Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn
	2930	2935 2940
	Glu Cys Phe Leu Gln His	Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg
	2945	2950 2955
	Leu Val Arg Pro Glu Val	Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp
	2960	2965 2970
[0046]	Asn Glu Glu Thr Phe Leu	Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg
	2975	2980 2985
	Arg His Pro Tyr Phe Tyr	Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys
	2990	2995 3000
	Arg Tyr Lys Ala Ala Phe	Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys
	3005	3010 3015
	Ala Ala Cys Leu Leu Pro	Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly
	3020	3025 3030
	Lys Ala Ser Ser Ala Lys	Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln
	3035	3040 3045
	Lys Phe Gly Glu Arg Ala	Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu
	3050	3055 3060
	Ser Gln Arg Phe Pro Lys	Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu
	3065	3070 3075
	Val Thr Asp Leu Thr Lys	Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp
	3080	3085 3090
	Leu Leu Glu Cys Ala Asp	Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile
	3095	3100 3105
	Cys Glu Asn Gln Asp Ser	Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys
	3110	3115 3120

	Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu 3125 3130 3135
	Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe 3140 3145 3150
	Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp 3155 3160 3165
	Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro 3170 3175 3180
	Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu 3185 3190 3195
	Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys 3200 3205 3210
	Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro 3215 3220 3225
	Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly 3230 3235 3240
	Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys 3245 3250 3255
[0047]	Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn 3260 3265 3270
	Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys 3275 3280 3285
	Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Glu 3290 3295 3300
	Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr 3305 3310 3315
	Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser 3320 3325 3330
	Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala 3335 3340 3345
	Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys 3350 3355 3360
	Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys 3365 3370 3375
	His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp 3380 3385 3390
	Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys 3395 3400 3405

Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser
3410 3415 3420

[0048]

Gln Ala Ala Leu Gly Leu
3425

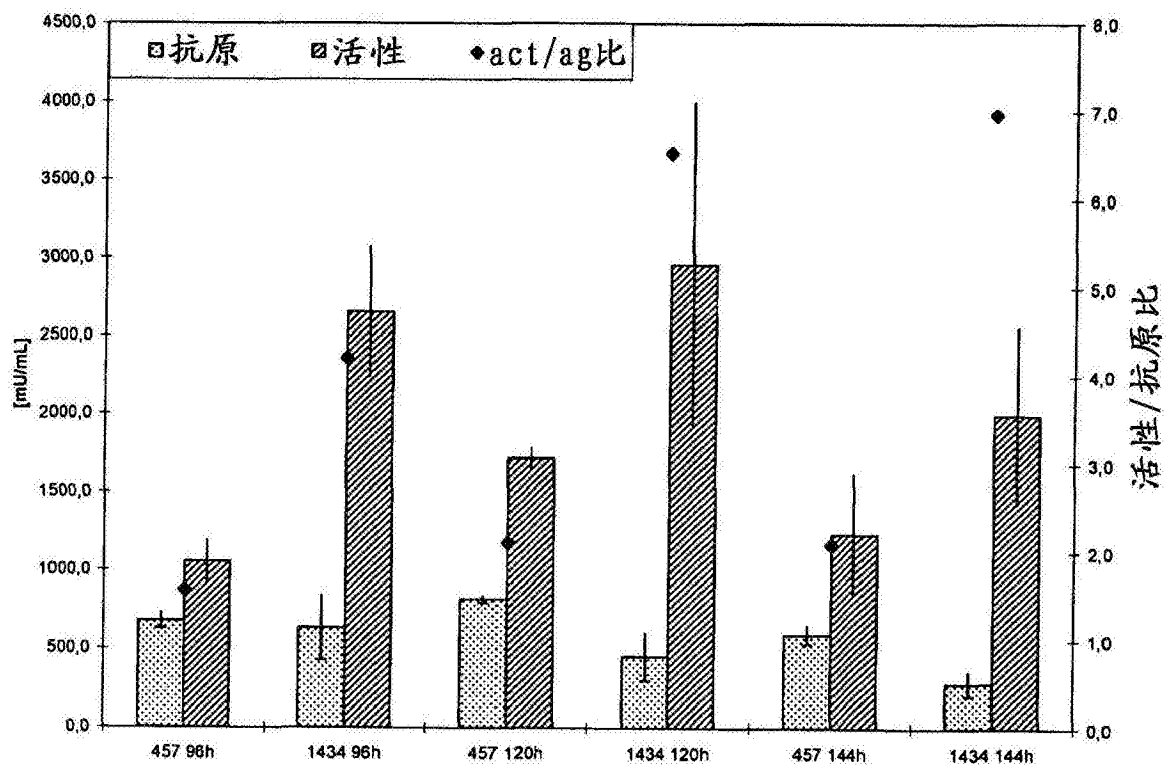


图1

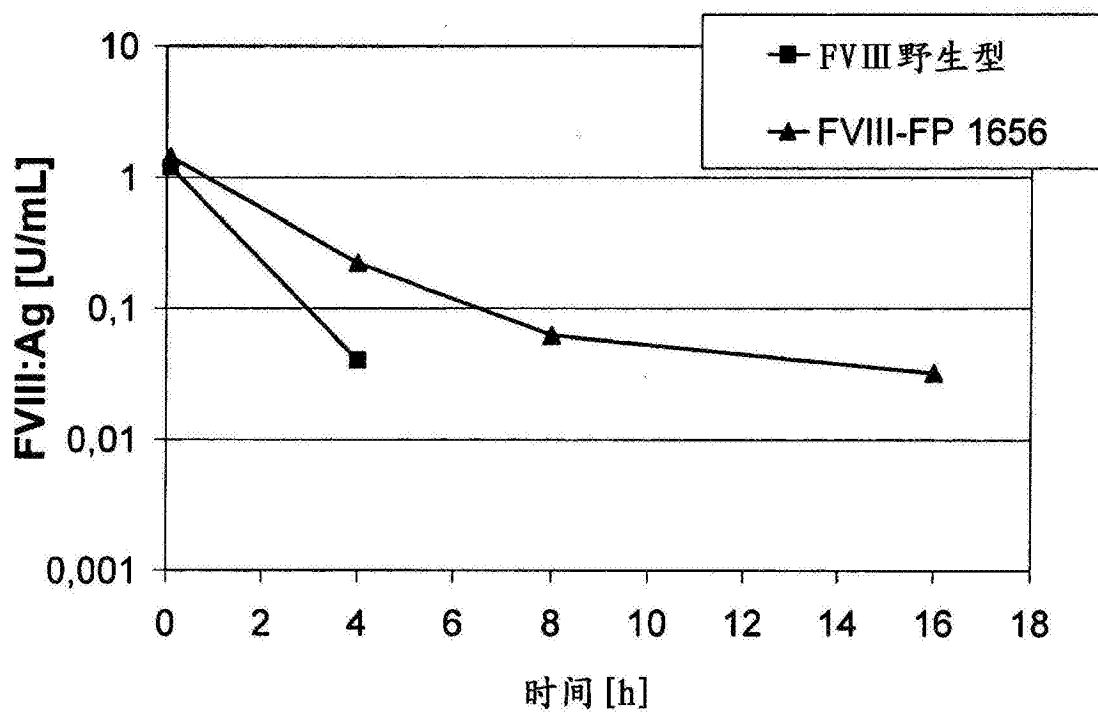


图2

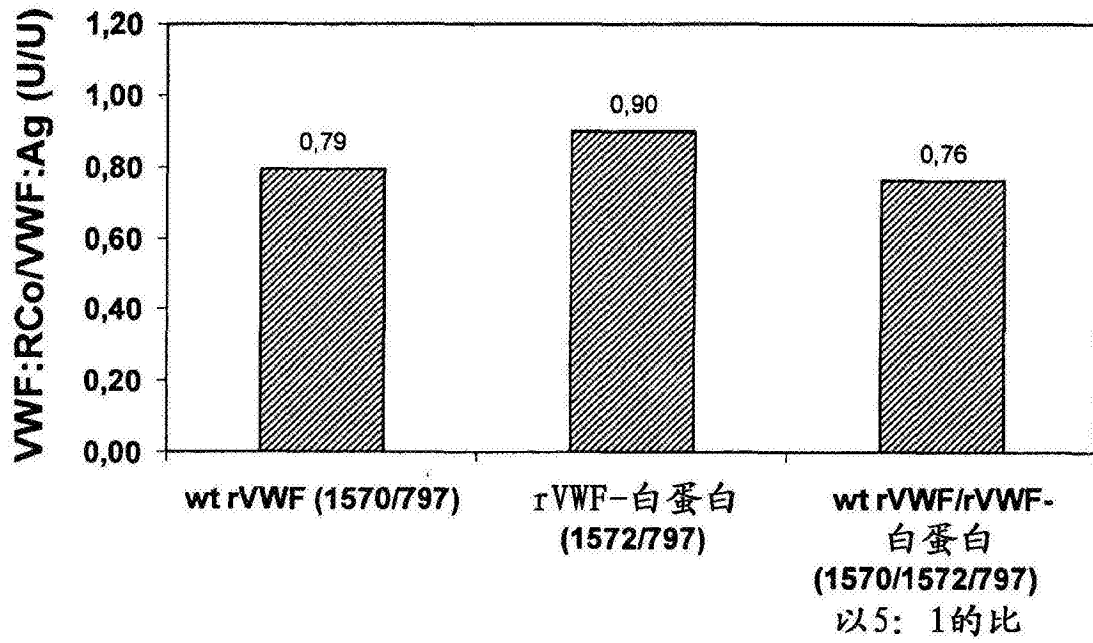
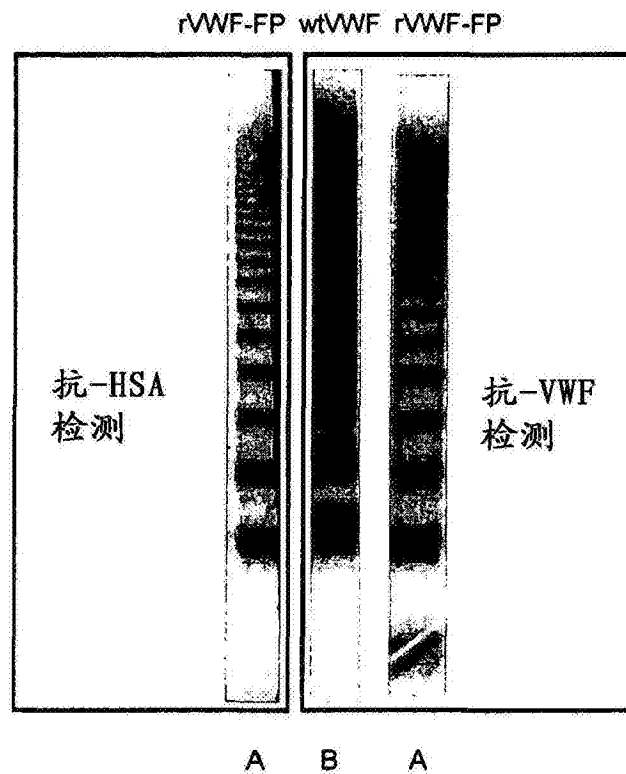


图3



A=rVWF-FP在弗林蛋白酶的存在下表达
B=wt VWF在弗林蛋白酶的存在下表达

图4

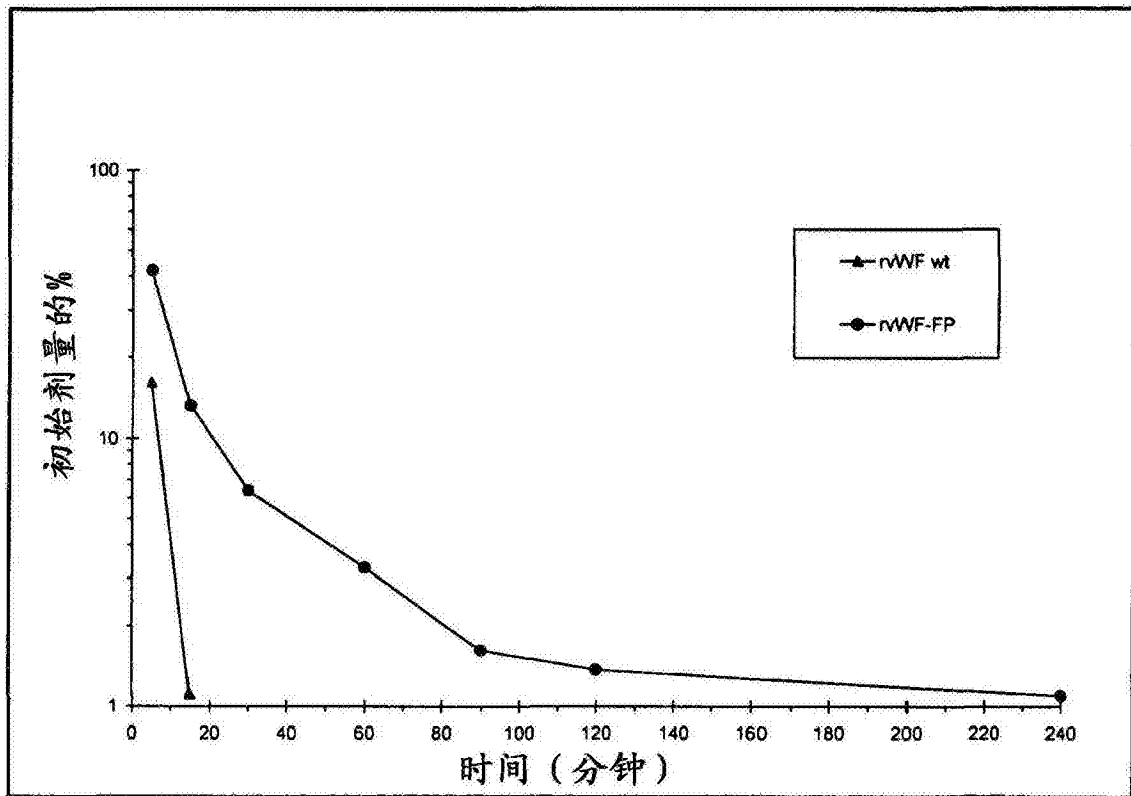


图5