



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107002041 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201580055246.1

CN 1809643 A, 2006.07.26

(22) 申请日 2015.08.12

EP 0775750 A2, 1997.05.28

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 0194383 A2, 2001.12.13

申请公布号 CN 107002041 A

US 5460950 A, 1995.10.24

(43) 申请公布日 2017.08.01

Alexandra Preininger et

(30) 优先权数据

al..Strategies for recombinant Furin  
employment in a biotechnological process:  
complete target protein precursor  
cleavage.《Cytotechnology》.1999,第30卷(第  
1-3期),第1页摘要部分,第13页右栏第2段和第3  
段.

62/036,438 2014.08.12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2017.04.11

(86) PCT国际申请的申请数据

Alnawaz Rehemtulla and Randal J.

PCT/US2015/044883 2015.08.12

Kaufman.Preferred Sequence Requirements  
for Cleavage of Pro-von Willebrand Factor  
by Propeptide-Processing Enzymes.《Blood》  
.1992,第79卷(第9期),第2349-2355页.

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2016/025615 EN 2016.02.18

Michele Himmelsbach et

(73) 专利权人 百特股份有限公司

地址 美国伊利诺斯州

专利权人 百特有限责任公司

al..Recombinant Human Factor X:High Yield  
Expression and the Role of Furin in  
Proteolytic Maturation in Vivo and in  
Vitro.《Thrombosis Research》.2000,第97卷  
(第2期),第51页摘要部分左栏,第57页表1和左  
栏第二段.

(72) 发明人 E.勃姆 F.霍林 J.科恩

M.多卡尔

Louise C.Wasley et al..PACE/Furin Can  
Process the Vitamin K-dependent Pro-  
factor IX Precursor within the Secretory  
Pathway.《The journal of biological  
chemistry》.1993,第268卷(第12期),第8458-  
8465页.

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 曹立莉

审查员 何春征

(51) Int.Cl.

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 9/64 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101910401 A, 2010.12.08

权利要求书1页 说明书14页

序列表8页 附图14页

(54) 发明名称

在分泌弗林蛋白酶的哺乳动物表达系统中  
产生被完全加工且功能性的因子X

(57) 摘要

本发明公开了在表达系统中产生完全加工

的成熟因子X的方法,其以50U/mL培养物上清液  
至300U/mL培养物上清液产生受控量的弗林蛋白  
酶。还公开了用于表达弗林蛋白酶和因子X的转  
化细胞、表达系统和表达载体。

1. 转化细胞,其包含:

编码人弗林蛋白酶的第一核苷酸序列和编码人因子X的第二核苷酸序列,以使得该转化细胞向培养物上清液中表达并分泌功能性弗林蛋白酶和因子X,其中所述弗林蛋白酶在培养36至78小时后在培养物上清液中以50 U/mL至173.37 U/mL的浓度分泌,且至少73.47%的因子X是被完全加工的。

2. 根据权利要求1的转化细胞,其中编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码所述蛋白质的核苷酸序列位于不同表达载体上或位于相同表达载体上。

3. 根据权利要求1或2的转化细胞,其中所述表达载体为病毒载体或非病毒载体。

4. 根据权利要求1的转化细胞,其中所述功能性弗林蛋白酶在培养36至78小时后在培养物上清液中以50 U/mL至60 U/mL的浓度分泌。

5. 根据权利要求4的转化细胞,其中由所述转化细胞产生的至少90%的因子X是被完全加工的。

6. 根据权利要求1的转化细胞,其中所述功能性弗林蛋白酶在培养36至78小时后在培养物上清液中以90 U/mL至100 U/mL的浓度分泌。

7. 根据权利要求6的转化细胞,其中由所述转化细胞产生的至少95%的因子X是被完全加工的。

8. 制备重组蛋白质的方法,其包括:

用适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶的第一表达载体转染适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列;和

用适于通过细胞系表达因子X的第二表达载体转染该细胞系,其中所述第二表达载体包含编码因子X多肽的核苷酸序列;

其中用第一和第二表达载体转染的细胞系在培养36至78小时后,以50 U/mL至173.37 U/mL的浓度向培养物上清液中表达并分泌功能性人弗林蛋白酶,且至少73.47%的因子X是被完全加工的。

9. 根据权利要求8的方法,其中在培养36至78小时后,所述功能性弗林蛋白酶以50 U/mL至60 U/mL的浓度通过所述细胞系被分泌到培养物上清液中。

10. 根据权利要求8的方法,其中在培养36至78小时后,所述功能性弗林蛋白酶以90 U/mL至100 U/mL的浓度通过所述细胞系被分泌到培养物上清液中。

11. 根据权利要求10的方法,其中由所述细胞系产生的至少95%的因子X是被完全加工的。

12. 根据权利要求9的方法,其中同时用所述第一表达载体和第二表达载体转染所述细胞系。

13. 根据权利要求9的方法,其中用第一表达载体转染所述细胞系,且在用第二表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平弗林蛋白酶的细胞。

14. 根据权利要求9的方法,其中用所述第二表达载体转染所述细胞系,且在用所述第一表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平蛋白质的细胞。

15. 产生成熟的、被完全加工的FX的方法,包括培养权利要求1-7中任一项的转化细胞以从培养物上清液中产生成熟的、被完全加工的因子X。

## 在分泌弗林蛋白酶的哺乳动物表达系统中产生被完全加工且功能性的因子X

### 技术领域

[0001] 本发明公开的是,在弗林蛋白酶的存在下,用于表达被完全加工的且有活性的重组因子X的表达系统、转化细胞及其相关方法。

### [0002] 背景介绍

[0003] 人凝血因子X (FX)、活化的FX (FXa) 及其变体被用作血液凝固病症(包括,但不限于,血友病和血管性血友病)的治疗剂。FX是一种维生素K-依赖性丝氨酸蛋白酶,其在内质网中作为单链前体蛋白而被合成,随后在高尔基体中进行细胞内蛋白水解的弗林蛋白酶裂解,然后通过向血流中产生细胞或者在重组表达的情况下向培养基中产生细胞。FX中的三个弗林蛋白酶裂解位点负责恰当的FX蛋白酶解加工。FX的成熟形式是二硫键连接的双链分子,其由重链和轻链组成,在前体蛋白裂解后形成。该分子的进一步修饰包括轻链的 $\gamma$ -羧基化和连接到重链的活化肽的N-和O-连接的糖基化。

[0004] 除了FX外,具有共有识别位点Arg-X-Lys/Arg-Arg (SEQ ID NO:4) 的其他维生素K依赖性凝血因子是普遍表达的内切蛋白酶弗林蛋白酶的底物,也被称为成对碱性氨基酸残基切割酶(PACE)。由于高产量表达下细胞内加工的限制,细胞培养物表达系统中对凝血级联重组蛋白的适当的蛋白酶解加工受损。类似于血管性血友病因子和凝血因子IX (FIX),其在重组哺乳动物细胞中呈现出高表达率下不足的蛋白酶解加工,低产量CHO细胞克隆中的FX分泌的特征在于被完全加工的FX,而除了被正确加工的FX重链和轻链种类外,高产量的克隆包含未加工的单链FX以及多种未加工形式的FX轻链。未加工的FX轻链的种类和程度在各细胞克隆之间以及在不同细胞培养条件(如细胞密度)下各不相同。需要额外的体内弗林蛋白酶共表达或后细胞(post-cell)体外培养弗林蛋白酶培养来支持内源性弗林蛋白酶蛋白水解机制,从而促进完整的蛋白质裂解。

[0005] 弗林蛋白酶的共表达对于高产率下被完全加工的FX表达来说是必不可少的。然而,到目前为止,尚未报道弗林蛋白酶的阈水平可确保在细胞培养物系统中被完整加工的FX的高百分比。高浓度的弗林蛋白酶是有毒的,因此由产生FX的哺乳动物表达系统的弗林蛋白酶表达水平必须在有毒、但可能加工100%的FX前体蛋白,和那些极低、因而导致在健康的细胞培养物中生产次优加工的FX的水平之间保持平衡。

### 发明内容

[0006] 本发明公开了用于在相同细胞系中表达弗林蛋白酶和人因子X (FX) 的系统,从而在培养物上清液中提供关键的弗林蛋白浓度,以产生被完全加工且具有完全活性的FX,同时保持该培养物的活力。

[0007] 因此,本发明公开了转化细胞,其包含编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列,使得该转化细胞向培养物上清液中表达并分泌功能性弗林蛋白酶,其中该功能性弗林蛋白酶在培养约36小时至约78小时后以在培养物上清液中以约50U/mL至约300U/mL的浓度分泌。在一个实施方案中,该转化细胞还包含核苷酸序列,其编码可被弗林蛋白酶裂解并呈现出Arg-

(Lys/Arg)-Arg基序的蛋白质。在另一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码该蛋白质的核苷酸序列位于不同的表达载体上。在另一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码该蛋白质的核苷酸序列位于相同的表达载体上。

[0008] 还提供了包含适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系的真核蛋白表达系统;适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶的第一表达载体,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列;和适于通过细胞系表达蛋白质的第二表达载体,其中所述第二表达载体包含编码可被弗林蛋白酶裂解并呈现出Arg-(Lys/Arg)-Arg基序的蛋白质的核苷酸序列,其中所述细胞系能够在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0009] 还提供了包含适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系的真核蛋白表达系统;适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶和可被弗林蛋白酶裂解并呈现出Arg-(Lys/Arg)-Arg基序的蛋白质的第一表达载体,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列以及编码可被弗林蛋白酶裂解的蛋白质的核苷酸序列,其中所述细胞系能够在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。在一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码蛋白质的核苷酸序列位于不同的表达载体上。在另一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码该蛋白质的核苷酸序列位于相同的表达载体上。

[0010] 还提供了包含编码人弗林蛋白酶的第一核苷酸序列和编码人FX的第二核苷酸序列的转化细胞,使得该转化细胞向培养物上清液中表达并分泌功能性弗林蛋白酶和FX,其中所述弗林蛋白酶在培养约36小时至约78小时后以约为50U/mL至约300U/mL的浓度被分泌到培养物上清液中,且至少85%的FX被完全加工。在一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码FX的核苷酸序列位于不同的表达载体上。在另一个实施方案中,编码人弗林蛋白酶的核苷酸序列和编码FX的核苷酸序列位于相同的表达载体上。

[0011] 还提供了包含适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系的真核蛋白表达系统;适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶的第一表达载体,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列;和适于通过细胞系表达FX的第二表达载体,其中所述第二表达载体包含编码FX的核苷酸序列,其中所述细胞系能够在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0012] 还提供了包含适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系的真核蛋白表达系统;适于表达人弗林蛋白酶和FX的第一表达载体,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列和编码FX的核苷酸序列,其中所述细胞系能够在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0013] 还提供了制备重组蛋白质的方法,其包括用适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶的第一表达载体转染适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列;和用适于通过细胞系表达蛋白质的第二表达载体转染所述细胞系,其中所述第二表达载体包含编码呈现出Arg-(Lys/Arg)-Arg基序的蛋白质的核苷酸序列;其中用第一和第二表达载体转染的细胞系在培养约40至约80小时后或在培养约36至约78小时后,以约50U/mL至约300U/mL的浓度在培养物上清液中表达和分泌功能性人弗林蛋白酶。在一个实施方案中,基本上同时用所述第一表达载体和第二表达载体转染所述

细胞系。在另一实施方案中,用第一表达载体转染所述细胞系,且在用第二表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平弗林蛋白酶的细胞。在又一实施方案中,用第二表达载体转染所述细胞系,且在用所述第一表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平蛋白质的细胞。

[0014] 在一个实施方案中,所述蛋白质是血管性血友病因子、因子II、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S或蛋白Z。在另一实施方案中,所述蛋白为因子X。

[0015] 还提供了制备重组蛋白质的方法,其包括用适于通过细胞系表达人弗林蛋白酶的第一表达载体转染适于表达哺乳动物蛋白质的细胞系,其中所述第一表达载体包含编码人弗林蛋白酶多肽的核苷酸序列;和用适于通过细胞系表达FX的第二表达载体转染所述细胞系,其中所述第二表达载体包含编码FX多肽的核苷酸序列;其中用第一和第二表达载体转染的细胞系在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度在培养物上清液中表达和分泌功能性人弗林蛋白酶。在一个实施方案中,基本上同时用所述第一表达载体和第二表达载体转染所述细胞系。在另一实施方案中,用第一表达载体转染所述细胞系,且在用第二表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平弗林蛋白酶的细胞。在又一实施方案中,用所述第二表达载体转染所述细胞系并在用所述第一表达载体转染所述细胞系之前获得分泌稳定水平蛋白质的细胞。

[0016] 在另一实施方案中,所述细胞能够在培养约36至约78小时后以至少约50至约60U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中,且其中至少90%的FX是被完全加工的。在另一实施方案中,所述细胞能够在培养约36至约78小时后以至少约90至约100U/mL的浓度将功能性弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中,且其中至少95%的FX是被完全加工的。

[0017] 还提供了由本发明公开的转化细胞产生的重组FX。

[0018] 还提供了由本发明公开的表达系统产生的重组FX。

[0019] 还提供了由本发明公开的方法产生的重组FX。

[0020] 还提供了用于重组FX的表达系统,其适于在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0021] 还提供了产生成熟、被完全加工的FX的方法,其包括在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的浓度将弗林蛋白酶分泌至培养物上清液中的表达系统。

## 附图说明

[0022] 图1A描绘了RCL.012-74.pD3H-弗林蛋白酶表达载体,且图1B描述了所述载体的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)。对所述人弗林蛋白酶序列加下划线且对起始和终止密码子加双重下划线。

[0023] 图2描绘了人弗林蛋白酶的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。对起始和终止密码子加双重下划线。

[0024] 图3描绘了人弗林蛋白酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:3)。

[0025] 图4描绘了在培养物中被完全加工的因子X(FX)的程度。在还原条件下用FX Western印迹进行密度定量并用多克隆抗-FX抗体染色。所述克隆(克隆ID 42-52)显示多达4种具有不同的像素强度的FX,包括未加工的FX单链(框1、5、9等)、FX重链(框2、6、10等)、未加工的含前肽的FX轻链(框3、7、11等)和加工的FX轻链(框4、8、12等)。确定框45-48的像素

强度以用于背景减除。

[0026] 图5描述了在培养物中分泌的弗林蛋白酶浓度和被完全加工的FX/总FX的百分比。在细胞培养上清液中分泌的弗林蛋白酶浓度(用弗林蛋白酶活性测定法测定)和被完全加工的FX/总FX的百分比(通过在Western印迹中各条带的密度定量来测定)之间存在剂量-响应关系。

[0027] 图6描述了弗林蛋白酶剂量和被完全加工的FX的分析。细胞特异性(粗线)和总体平均值(细线)的数据(圆圈)通过使用 $E_{\max}$ 模型来预测被完全加工的FX/总FX(%),其为弗林蛋白酶浓度的函数。

[0028] 图7A-D描述了 $E_{\max}$ 模型有效性测试。图7A描绘了相对于预测响应的残余响应,其中在零点附近对称分布的数据点表明没有有规律的趋势。图7B描绘了针对该残余的正态Q-Q图,表明正态分布误差的假设成立,因为数据点分散在鉴定线(line of identity)周围。图7C描绘了相对于细胞系的残余响应,其中在零点附近对称分散的数据点表明没有有规律的趋势。图7D描绘了相对于彼此绘制的观察值和预测值,表明随着数据点在鉴定线周围对称地分散,该数据拟合良好。

[0029] 图8描绘了空值模型(null model),其用于测试FX加工程度与弗林蛋白酶浓度无关的假设。数据(圆圈)和具有截距的拟合空值模型仅假设了加工的FX与所述弗林蛋白酶浓度无关(细胞特异性和总体平均值分别拟合为粗线和细线)。

[0030] 图9描绘了剂量-响应曲线并计算了产生90%和95%加工的FX的弗林蛋白酶最小浓度。总体平均值预测了被完全加工的FX/总FX(%) (其为弗林蛋白酶浓度(黑线)的函数)以及提供90%和95%的被完全加工的FX/总FX的弗林蛋白酶浓度,其通过拟合模型的数值优化获得。

[0031] 发明内容

[0032] 本文提供了转化细胞、真核表达系统、用于产生重组蛋白质的方法和通过所述方法制备的重组蛋白质,所有这些都涉及在相同细胞系中表达弗林蛋白酶和因子X(FX),从而在培养上清液中提供关键的弗林蛋白酶浓度以产生被完全加工和成熟的FX,同时保持培养物的活力。

[0033] 与转化细胞的共同之处在于,用于产生重组蛋白质的真核表达系统和方法是指宿主细胞产生稳定水平的重组弗林蛋白酶的能力。弗林蛋白酶是将一些哺乳动物蛋白质(包括FX)从前体蛋白质形式裂解为成熟的被完全加工形式所必需的。在表达系统的培养物上清液中低浓度的弗林蛋白酶导致含有前肽和其他非加工或部分加工形式的蛋白质的累积。弗林蛋白酶浓度过高导致宿主细胞的生长受损,最终导致细胞死亡。

[0034] 本文所用术语“弗林蛋白酶”包括全长弗林蛋白酶以及能够裂解共有识别位点Arg-X-Lys/Arg-Arg的任意弗林蛋白酶片段。弗林蛋白酶的活性截短形式是本领域已知的并且适用于本发明。合适的弗林蛋白酶片段的非限制性实例可见于U.S.6,210,926和Preininger等人(Cytotechnology 30:1-15,1999),所有这些都并入本文作为参考,所有这些都公开了关于重组弗林蛋白酶的截短形式。

[0035] 在本发明的范围内还有本发明公开的弗林蛋白酶和因子X蛋白的变体。例如,可以进行保守氨基酸改变,尽管它们改变了蛋白质或肽的基本序列,但通常不改变其功能。保守氨基酸取代通常包括以下组中的取代:甘氨酸、丙氨酸;缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸;天冬氨

酸、谷氨酸；天冬酰胺、谷氨酰胺；丝氨酸、苏氨酸；和赖氨酸、精氨酸；苯丙氨酸、酪氨酸。

[0036] 还包括融合蛋白或其它修饰或FX，其在施用于受试者后具有增加的半衰期。该实例将是连接到FX序列的免疫球蛋白Fc结构域、白蛋白结构域、延伸的(XTEN)重组多肽(参见US 8,673,860，其并入本文以座位参考，因为其公开了关于XTEN多肽的内容)、聚Glu或聚Asp序列、转铁蛋白或含PAS(Pro Ala Ser)的多肽的融合物。

[0037] 修饰(其通常不改变基本序列)包括多肽的体内或体外化学衍生化，例如乙酰化或羧基化。还包括糖基化的修饰，例如在其合成和加工过程中或在进一步的加工步骤中通过修饰多肽的糖基化模式而制备的那些；例如通过将多肽暴露于影响糖基化的酶，例如哺乳动物的糖基化或去糖基化酶。还包括具有磷酸化氨基酸残基的序列，例如磷酸酪氨酸、磷酸丝氨酸或磷酸苏氨酸。用水溶性生物相容性聚合物(例如聚乙二醇、聚唾液酸或羟乙基淀粉)纯化后，可将蛋白进行化学修饰。

[0038] 还包括已经使用普通分子生物学技术进行修饰以改善其对蛋白水解降解的抗性或优化溶解性质的多肽。这些多肽的类似物包括含有天然存在的L-氨基酸以外的残基的那些，例如D-氨基酸或非天然存在的合成氨基酸。本发明的肽不限于本文列出的任何具体示例性方法的产品。

[0039] 本发明的公开通常涉及用于产生至少一种重组哺乳动物蛋白质的系统、转化细胞、表达载体和方法，所述重组哺乳动物蛋白质通过弗林蛋白酶进行翻译后加工(即需要重组弗林蛋白酶的哺乳动物蛋白质)。哺乳动物蛋白质是以下中的一种或多种：血管性血友病因子、因子II、因子IX、因子X、蛋白C、蛋白S或蛋白质Z。在另一个实施方案中，所述蛋白质是FX。

[0040] 将培养上清液中的弗林蛋白酶的浓度定位在最佳范围内以产生成熟的被完全加工的蛋白质，同时在确定的培养期间内保持培养物的活力。因此，用于产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的培养上清液中有用的弗林蛋白酶浓度为约50U/mL至约400U/mL、约50U/mL至约350U/mL、约50U/mL至约300U/mL、约50U/mL至约250U/mL、约50U/mL至约200U/mL、约50U/mL至约175U/mL、约50U/mL至约150U/mL、约50U/mL至约125U/mL或约50U/mL至约100U/mL。在一个实施方案中，在培养物上清液中弗林蛋白酶的浓度不小于50U/mL。

[0041] 在其他实施方案中，在培养上清液中用于在确定的培养时间段后产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度为约50U/mL至约60U/mL、约55U/mL至约65U/mL、约60U/mL至约70U/mL、约65U/mL至约75U/mL、约70U/mL至约80U/mL、约75U/mL至约85U/mL、约80U/mL至约90U/mL、约85U/mL至约95U/mL、约90U/mL至约95U/mL、约95U/mL至约105U/mL、约100U/mL至约110U/mL、约115U/mL至约125U/mL、约120U/mL至约130U/mL、约125U/mL至约135U/mL、约130U/mL至约140U/mL、约135U/mL至约145U/mL、约140U/mL至约150U/mL、约145U/mL至约155U/mL、约150U/mL至约160U/mL、约155U/mL至约165U/mL、约160U/mL至约170U/mL、约165U/mL至约175U/mL、约170U/mL至约180U/mL、约175U/mL至约185U/mL、约180U/mL至约190U/mL、约185U/mL至约195U/mL或约190U/mL至约200U/mL。在另一实施方案中，培养上清液中用于在确定的培养时间段之后产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度为约50U/mL至约60U/mL或约57U/mL。在另一实施方案中，培养上清液中用于产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度为约90U/mL至约100U/mL或约96U/mL。

[0042] 在其他实施方案中,在培养上清液中用于在确定的培养时间段后产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度小于约400U/mL、小于约375U/mL、小于约350U/mL、小于约325U/mL、小于约300U/mL、小于约275U/mL、小于约250U/mL、小于约225U/mL、小于约200U/mL、小于约175U/mL、小于约150U/mL、小于约125U/mL或小于约100U/mL。

[0043] 在其他实施方案中,在培养上清液中用于在确定的培养时间段后产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度大于约50U/mL、大于约60U/mL、大于约70U/mL、大于约80U/mL、大于约90U/mL、大于约100U/mL、大于约110U/mL、大于约120U/mL、大于约130U/mL、大于约140U/mL、大于约150U/mL、大于约160U/mL、大于约170U/mL、大于约180U/mL、大于约190U/mL或大于约200U/mL。

[0044] 为了本公开的目的,本发明公开的培养物上清液中的弗林蛋白酶的水平在培养开始后约12小时至约96小时的时间段内(在培养约12小时至约96小时)产生,并反映的是在该期间在培养上清液中积累的弗林蛋白酶的水平。在其他实施方案中,在培养开始后约18小时至约90小时、约24小时至约84小时、约30小时至约78小时、约36小时至约72小时、约40小时至约80小时、约42小时至约68小时或约48小时至约72小时或在培养指定时间段后达到培养上清液中弗林蛋白酶的所需水平。

[0045] 或者,在本发明公开的培养物上清液中的弗林蛋白酶的水平表示为每天单位体积的培养物上清液中一定数量的细胞分泌的弗林蛋白酶的浓度。在非限制性实例中,弗林蛋白酶的浓度表示为U/ $10^6$ 细胞/天。在其他实施方案中,培养上清液中用于产生成熟的被完全加工的哺乳动物蛋白质的弗林蛋白酶的有用浓度为约20U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约25U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约30U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约35U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约40U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约45U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约50U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约55U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约60U/ $10^6$ 细胞/天至约75U/ $10^6$ 细胞/天、约20U/ $10^6$ 细胞/天至约70U/ $10^6$ 细胞/天、约20U/ $10^6$ 细胞/天至约65U/ $10^6$ 细胞/天、约20U/ $10^6$ 细胞/天至约60U/ $10^6$ 细胞/天、约20U/ $10^6$ 细胞/天至约55U/ $10^6$ 细胞/天、约25U/ $10^6$ 细胞/天至约55U/ $10^6$ 细胞/天、约25U/ $10^6$ 细胞/天至约50U/ $10^6$ 细胞/天、约25U/ $10^6$ 细胞/天至约45U/ $10^6$ 细胞/天或约25U/ $10^6$ 细胞/天至约40U/ $10^6$ 细胞/天。

[0046] 培养上清液中弗林蛋白酶的浓度足以将至少约75%的哺乳动物前体蛋白质加工成成熟的功能性蛋白质。该蛋白质是被翻译为前体蛋白质的任何蛋白质,且至少部分通过弗林蛋白酶的作用被加工成成熟形式。在一个实施方案中,所述蛋白质为FX。在其他实施方案中,所述弗林蛋白酶浓度足以将至少约80%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约82%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约84%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约86%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约88%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约90%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约92%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约93%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约94%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约95%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约96%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约97%的



哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约98%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质、将至少约99%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质或将100%的哺乳动物FX前体蛋白加工成成熟的功能性FX蛋白质。

[0047] 本文所用术语“前体蛋白”是指无活性的、并且通过合成后在细胞中的裂解和任选的其它翻译后修饰变成活性形式的前体蛋白。

[0048] 因此,本文提供适于分泌弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白质(如FX)的转化细胞。所述转化细胞可以是适合分泌哺乳动物蛋白质的任何真核细胞,无论该细胞是否产生内源性弗林蛋白酶。用于产生转化细胞的合适的细胞系包括但不限于中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、人胚胎肾细胞、灵长类动物肾细胞(例如,COS细胞、HEK293)、成纤维细胞(例如鼠成纤维细胞)和小鼠骨髓瘤细胞(如NS0-GS)。合适的细胞系能够高水平地表达哺乳动物蛋白质,并且能够进行翻译后修饰,例如糖基化、形成二硫键、磷酸化和 $\gamma$ -羧基化。用于选择和培养宿主细胞和用于诱导宿主细胞表达多肽的方法是本领域技术人员通常已知的。

[0049] 本文还公开了表达系统,其包含适于产生哺乳动物蛋白质的细胞和适于表达至少一种哺乳动物蛋白质的至少一种表达载体。真核表达载体通常可用于在哺乳动物细胞中表达。为了使弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白(如FX)能够根据本发明公开的方法进行表达,通过用表达载体转染、转化或感染,将编码该蛋白质的核苷酸序列引入真核细胞,由此表达所述多肽。弗林蛋白酶和/或哺乳动物蛋白质的表达可以是不稳定的或稳定的。弗林蛋白酶和哺乳动物核苷酸序列作为质粒存在,或作为病毒或非病毒表达载体的一部分存在。特别合适的病毒载体包括但不限于杆状病毒、痘苗病毒、腺病毒、巨细胞病毒、腺伴随病毒、复制型慢病毒(RCL)和疱疹病毒。病毒真核表达载体的非限制性实例包括Rc/CMV、Rc/RSV、RCL和SV40载体。示例性的非病毒真核表达载体包括但不限于病毒颗粒、脂质体、阳离子脂质、质粒和聚赖氨酸缀合的DNA。示例性的质粒表达载体包括但不限于pSLX、pcDNA和本领域普通技术人员已知的其它物质。

[0050] 在另一个实施方案中,本发明公开了表达载体,其包含编码弗林蛋白酶的核苷酸序列、编码哺乳动物蛋白质的核苷酸序列(例如编码FX的核苷酸序列)或其组合。在一个实施方案中,弗林蛋白酶和蛋白质序列均由单一表达载体表达。在另一个实施方案中,所述弗林蛋白酶序列和所述蛋白质序列由不同的表达载体表达。在一个实施方案中,如果所述弗林蛋白酶和蛋白质核苷酸序列由相同的表达载体表达,则它们任选地被内部核糖体进入位点(IRES)分离。这些基因可以由一个或多个启动子表达。此外,编码每个蛋白质的核苷酸序列可以在质粒上以相反的方向定向或以相同的方向定向。所述表达载体还包含用于有效产生哺乳动物蛋白质的可选择元件和其它调节序列,如本领域普通技术人员所理解的。

[0051] 本文还公开了允许通过使用重组酶介导的盒式交换来表达弗林蛋白酶和其它哺乳动物蛋白质的表达载体。

[0052] 如果由不同的表达载体表达弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白质,则所述表达载体将具有不同的选择标记,从而可以选择被载体转化的细胞。然后可以将这样选定的细胞分离并生长成单克隆培养物。

[0053] 允许在真核细胞中进行组成型、可调节、组织特异性、细胞类型特异性、细胞周期特异性或代谢特异性表达的启动子适合例如在哺乳动物细胞中表达。可调节元件是启动子、激活序列、增强子、沉默子和/或阻遏序列。允许在真核生物中进行组成型表达的可调节

元件的实例是由RNA聚合酶III识别的启动子或病毒启动子、巨细胞病毒(CMV)增强子、CMV启动子、SV40启动子或长末端重复(LTR)启动子(例如衍生自MMTV(小鼠乳腺肿瘤病毒))和其他病毒启动子和激活序列(其衍生自例如乙肝病毒(HBV)、丙肝病毒(HCV)、单纯疱疹病毒(HSV)、人乳头瘤病毒(HPV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、热激启动子或人类免疫缺陷病毒(HIV))。允许在真核生物中诱导表达的可调节元件的实例是与适当的阻遏物组合的四环素操纵基因。弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白质核苷酸序列的表达也可以在组织特异性或蛋白质特异性启动子的控制下进行。蛋白质特异性启动子的非限制性实例是FX基因启动子或弗林蛋白酶基因启动子。

[0054] 在一些实施方案中,除了弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白质之外,用另一种蛋白质转化所述细胞。在一个实施方案中,另外的蛋白质是维生素K环氧化物还原酶(VKOR)。在一些实施方案中,另外的蛋白质由与弗林蛋白酶和哺乳动物蛋白质中的一种或两者相同的表达载体表达,或者另外的蛋白质由不同的表达载体表达。

[0055] 本文还公开了表达系统,其包含宿主细胞和一种或多种适于表达弗林蛋白酶和至少一种另外的哺乳动物蛋白质(例如,FX)的表达载体。

[0056] 本文还公开了产生需要重组弗林蛋白酶的、被完全加工的哺乳动物蛋白质(如FX)的方法。在一个实施方案中,产生了生成重组弗林蛋白酶的稳定细胞系,并随后用表达载体转染,该表达载体含有至少一种需要弗林蛋白酶的哺乳动物蛋白质的核苷酸序列。可以建立产生重组弗林蛋白酶的稳定细胞系,并将其储存以用于用表达载体进行转染,该表达载体含有至少一种需要弗林蛋白酶的哺乳动物蛋白质的核苷酸序列。或者,可以各自在约30分钟、约60分钟、约2小时、约6小时、约12小时或约24小时内将弗林蛋白酶和需要弗林蛋白酶的哺乳动物蛋白质(如FX)的表达载体转染入宿主细胞。在另一个实施方案中,基本上同时将两种或多种表达载体转染入宿主细胞。为了本发明的目的,基本上同时指的是小于或等于1小时的任何时间段。

[0057] 根据存在于表达载体中的选择标记来选择转化细胞以产生稳定的转化细胞池,然后任选地克隆所述池以产生稳定的克隆。在培养开始后约36至约78小时、约36至约72小时、约40小时至约78小时、约42小时至约68小时或约48小时至约72小时后、或培养指定时间段后,稳定的克隆在培养物上清液中产生约50U/mL至约300U/mL、约50U/mL至约400U/mL、约50U/mL至约350U/mL、约50U/mL至约300U/mL、约50U/mL至约250U/mL、约50U/mL至约200U/mL、约50U/mL至约175U/mL、约50U/mL至约150U/mL、约50U/mL至约125U/mL或约50U/mL至约100U/mL的弗林蛋白酶。此外,稳定的克隆产生活性重组哺乳动物蛋白质(如FX),其中转化细胞产生的所有重组蛋白质(如FX)的超过80%被完全加工,

[0058] 本发明还公开了重组弗林蛋白酶和重组FX的表达系统,其在培养约36至约78小时后,以约50U/mL至约300U/mL的累积浓度将弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0059] 本发明还公开了一种产生成熟的被完全加工的FX的方法,其包括使用表达系统,其在培养约36至约78小时后以约50U/mL至约300U/mL的累积浓度将弗林蛋白酶分泌到培养物上清液中。

[0060] 本发明还包括通过要求保护的方法产生的重组哺乳动物蛋白质,和任何被完全加工的哺乳动物重组FX。

## 实施例

[0061] 实施例1.通过确定水平的弗林蛋白酶生产被完全加工的和具有完全活性的重组因子X

[0062] 对于FX表达,使用哺乳动物表达质粒pSLX,其含有人密码子优化的FX或含有人密码子优化的FX和人密码子优化的维生素K环氧化物还原酶(FX/VKOR)二者(由内部核糖体进入位点(IRES)分开)。中国仓鼠卵巢(CHO)-S和CHO-DG44表达系统的构建分别包括遗传霉素的选择和二氢叶酸还原酶(dhfr)的选择。对于弗林蛋白酶的表达,使用哺乳动物表达质粒pcDNA3.1,其含有与作为选择标记的潮霉素结合的人全长弗林蛋白酶(图1A)。

[0063] 最初,用FX或FX/VKOR构建体转染CHO衍生的细胞系(CHO-S和CHO DG44)以产生稳定的池,随后将该池进行亚克隆以产生稳定的克隆。在第二轮转染和亚克隆中,将选定数量的表达FX或FX/VKOR的克隆分别用弗林蛋白酶进行超转染(super-transfect),产生稳定的池和表达FX/弗林蛋白酶或FX/VKOR/弗林蛋白酶的稳定克隆。

[0064] 将稳定的产生重组FX的CHO-S和CHO-DG44细胞系在无动物组分的培养基中在摇瓶中培养约42至约72小时,起始细胞数为 $0.3 \times 10^6$ 或 $0.5 \times 10^6$ 细胞/mL。将CHO-S细胞保持在补充有4mM谷氨酰胺、500 $\mu$ g/mL遗传霉素、500 $\mu$ g/mL潮霉素和5 $\mu$ g/mL维生素K1的PowerCHO<sup>®</sup>-CD培养基(Lonza BioWhittaker)中。将CHO-DG44细胞保持在补充有6mM谷氨酰胺、500nM甲氨蝶呤(MTX)和5 $\mu$ g/mL维生素K1的OptiCHO<sup>TM</sup>-CD培养基(Life Technologies)中。

[0065] 通过Western印迹在还原条件下分析所收集的细胞培养物上清液,以使用多克隆山羊抗人FX或多克隆绵羊抗人FX(Affinity Biologicals)来测定重组人FX的质量。Western印迹的光密度分析使得能够对不同种类的正确加工的FX(被称为重链FX(HC)和轻链FX(LC))、以及不完全裂解的FX种类(被称为单链FX(SC)和含前肽的轻链FX(PP-LC))进行定量。

[0066] 对于FX定量,用ELISA分析细胞培养物上清液以确定FX浓度,并使用拉氏蝰蛇毒液(RVV)作为激活剂的FXa显色测定来确定活性FX的浓度。使用血浆衍生的FX(Hyphen Biomed)校准这些测定。比活性通过将活性FX的浓度除以总FX的浓度乘以100得出,以%表示。对于弗林蛋白酶定量,在弗林蛋白酶荧光测定中测定活性弗林蛋白酶,所述测定被针对弗林蛋白酶参考物质(New England Biolabs)校准。

[0067] 对于统计分析,使用在CHO-DG44转染池(A)、CHO-S转染池(B)和CHO-S单细胞衍生的克隆(C)上的 $E_{\max}$ 模型,对被完全加工的FX/总FX(%)建模,其为弗林蛋白酶浓度的函数。该模型用于剂量响应研究的统计学评估。所述 $E_{\max}$ 模型使用四个参数( $E_0$ 、 $E_{\max}$ 、 $ED_{50}$ 和n),从而将FX建模为弗林蛋白酶的函数,如下所示:

$$[0068] \quad y = E_0 + (x^n \cdot E_{\max}) / (ED_{50}^n + x^n)$$

[0069] 其中y是指被完全加工的FX/总FX,且x是指弗林蛋白酶浓度。所述参数 $E_0$ 是指当弗林蛋白酶浓度为零时,对应于该响应的基础效应, $E_{\max}$ 是指可归因于弗林蛋白酶浓度的最大效应, $ED_{50}$ 是指产生 $E_{\max}$ 的一半的弗林蛋白酶浓度,且参数n代表决定该曲线陡度的斜率(希尔因子)。

[0070] 为了说明如果弗林蛋白酶接近无限大的浓度,则被完全加工的FX/总FX接近100%,将该 $E_{\max}$ 模型修改为具有按以下估计的三个参数的函数:

$$[0071] \quad y = E_0 + (x^n \cdot (100 - E_0)) / (ED_{50}^n + x^n)$$

[0072] 使用非线性混合效应模型,考虑三种不同细胞系之间的变异性,使这种模型对数据进行拟合,其中允许参数 $E_0$ 和 $n$ 在不同细胞系之间变化,还将这两个参数建模为随机效应。

[0073] 进行模型诊断以验证所应用的模型。使用似然比检验将该拟合的 $E_{\max}$ 模型与空值模型进行比较,以确定 $E_{\max}$ 模型的统计学可信度,根据弗林蛋白酶浓度估计总FX中被完全加工的FX的百分比。

[0074] 结果

[0075] 使用包含CHO-DG44转染池(A)、CHO-S转染池(B)和CHO-S单细胞衍生的克隆(C)的用于人FX的基于CHO的异源表达系统作为研究不同转染策略下弗林蛋白酶表达对人类FX加工效果的基础。转染池以及克隆还表达了对研究没有影响的VKOR。

[0076] 在2至3个培养天数的孵育期后,对细胞培养物上清液进行一系列分析,包括还原条件下的Western印迹分析、弗林蛋白酶活性测定、ELISA和RVV测定(表1)。平均来说,产生FX的CHO池和克隆显示超过50%的FX比活性,部分达到100%(表1)。Western印迹分析显示该重组FX在不同程度上被不充分地加工,如除了被完全加工的无前肽FX轻链和FX重链(图4)外的两种不完全加工形式的FX(即含前肽的FX轻链和FX单链)所示。通过对这四种FX进行光密度分析,在细胞培养物上清液中被完全加工的FX的百分比(即FX轻链加FX重链相对于总FX)在30%至几乎100%之间(表1,图4)。此外,没有观察到预活化,如果存在,则该预活化是可见的,因为由于缺失的活化肽的大小,重链带被缩短。此外,还通过绘制这两个参数评估了分泌的弗林蛋白酶的浓度是否对加工的FX的程度有影响(图5)。如图5所示,用低浓度的被分泌的弗林蛋白酶( $<20\text{U/mL}$ )来部分加工FX是可行的,而更高水平的被分泌的弗林蛋白酶与被更好加工的FX相关。

[0077]

表 1：共表达 FX 和弗林蛋白酶的细胞系的数据总结：显示了针对各细胞系测量的 FX 生产率、弗林蛋白酶生产率和滴度以及被完全加工的 FX/总 FX 的百分比。

克隆/池 ID	表达的重组蛋白质	细胞系(池或克隆)	弗林蛋白酶浓度 (U/mL)	最终细胞密度[10 <sup>6</sup> 细胞/mL]	弗林蛋白酶单位生产率 [U/10 <sup>6</sup> 细胞/天]	FX 比活性[%]	被完全加工的 FX/总 FX(%)
1	FX	CHO-DG44 池	8.03	2.015	2.22	5.64	30.34
2	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	8.05	1.155	3.45	7.58	45.69
3	FX/VKOR	CHO-DG44 池	7.88	1.436	2.86	6.44	31.05
4	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	7.88	1.029	3.68	11.16	40.08
5	FX	CHO-DG44 池	2.74	1.518	0.95	9.04	41.42
6	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	11.59	0.952	5.71	14.12	71.78
7	FX/VKOR	CHO-DG44 池	2.38	1.152	1.02	15.14	36.92
8	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	2.82	0.795	1.58	29.37	57.17
9	FX	CHO-DG44 池	5.36	2.438	1.26	9.23	34.46
10	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	9.94	1.503	3.48	12.23	59.30
11	FX/VKOR	CHO-DG44 池	4.88	2.162	1.27	14.57	33.12
12	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	4.78	1.372	1.80	20.48	46.98
13	FX	CHO-DG44 池	8.07	2.005	2.24	47.68	40.93
14	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	8.83	1.851	2.62	64.80	60.54
15	FX/VKOR	CHO-DG44 池	8.42	1.843	2.50	45.48	33.98
16	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	6.72	2.220	1.71	58.04	47.46
17	FX	CHO-DG44 池	2.59	1.246	1.05	78.72	46.40
18	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	55.91	1.396	20.75	98.49	73.47
19	FX/VKOR	CHO-DG44 池	2.59	1.207	1.07	70.43	47.61
20	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	3.48	1.431	1.27	93.42	60.04
21	FX	CHO-DG44 池	5.96	2.035	1.63	71.19	37.77
22	FX/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	27.57	2.226	7.00	104.40	71.85

[0078]

23	FX/VKOR	CHO-DG44 池	4.40	1.827	1.32	69.50	42.84
24	FX/ VKOR/弗林蛋白酶	CHO-DG44 池	5.20	2.283	1.29	75.60	49.19
25	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.224	0.00	90.59	63.96
26	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 池	51.34	1.828	25.20	99.57	88.97
27	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.851	0.00	49.99	57.75
28	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 池	62.84	2.248	26.13	48.73	87.78
29	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	3.584	0.00	81.39	68.02
30	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 池	66.98	2.362	26.75	66.57	89.64
31	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.870	0.00	69.04	67.02
32	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 池	55.08	2.295	22.52	52.91	89.99
33	FX/VKOR	CHO-S 池	0.00	2.645	0.00	59.62	71.13
34	FX/弗林蛋白酶	CHO-S 池	116.89	2.083	50.52	51.40	86.56
35	FX	CHO-S 池	0.00	2.230	0.00	67.49	62.65
36	FX/弗林蛋白酶	CHO-S 池	46.62	1.846	22.18	19.29	82.99
37	FX	CHO-S 池	0.00	2.049	0.00	11.47	51.69
38	FX/弗林蛋白酶	CHO-S 池	48.41	1.457	27.61	<25.33	77.46
39	FX	CHO-S 池	0.00	2.265	0.00	95.04	45.87
40	FX/弗林蛋白酶	CHO-S 池	60.72	1.566	32.80	27.69	84.27
41	FX	CHO-S 池	0.00	2.018	0.00	35.63	49.28
42	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	113.45	3.704	26.99	90.30	95.91
43	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	63.41	3.133	17.45	92.26	96.23
44	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	92.86	2.893	27.37	98.55	98.12
45	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	173.37	3.430	44.11	79.46	98.42
46	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	23.54	2.816	7.10	86.31	91.69
47	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	105.42	2.918	30.84	78.63	95.14
48	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	33.77	3.542	8.35	80.02	92.21
49	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	135.62	2.777	41.39	94.46	95.18
50	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	82.03	2.193	30.46	48.80	93.75
51	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	8.06	2.280	2.90	67.11	52.38
52	FX/VKOR/弗林蛋白酶	CHO-S 克隆	81.02	2.889	23.91	85.37	95.61

[0079] 为了理解弗林蛋白酶对FX加工的影响并提供数据的统计学支持,在细胞系A、B和C中,使用 $E_{\max}$ 模型将总FX中的被完全加工的FX(%)建模为弗林蛋白酶浓度的函数(图6)。图

7A-D中提供了四个模型诊断图,表明该模型对数据的良好拟合。使用似然比检验将拟合的 $E_{\max}$ 模型与空值模型进行比较,得到 $p$ 值 $<0.0001$ ,从而提供了统计学证据,即总FX中较高的被完全加工FX的百分比取决于较高的弗林蛋白浓度(图8),再次证明了该数据的有效性。根据该统计分析,由所估计的与FX一起在总FX中产生大于或等于90%和大于或等于95%的被完全加工的FX的生产细胞系中弗林蛋白酶的浓度(在细胞培养基中检测)分别为至少57U/mL和至少96U/mL(图9)。

[0080] 总之,该数据提供了充分的FX加工(大于或等于90%和大于或等于95%)所需的细胞培养上清液中确定的最低水平的分泌弗林蛋白酶(至少57U/mL和至少96U/mL)。

[0081] 在表达高水平重组蛋白质的生物技术过程中,可以使用弗林蛋白酶过表达来获得被完全加工的酶原。通过我们的发明,我们首次提供了确定的最低限度的分泌弗林蛋白酶,以用于高FX加工( $\geq 57$ U/mL的弗林蛋白酶,以实现至少90%被完全加工的FX;和 $\geq 96$ U/mL的弗林蛋白酶,以实现至少95%被完全加工的FX)。该发现对于表达来自人和动物物种的重组FX、FXa和变体的发酵过程特别有利,其中所述弗林蛋白酶水平可用作FX前体蛋白被适当加工的指标,并用作细胞系和过程开发的靶标。

[0082] 除非另有说明,否则在说明书和权利要求中使用的表示成分数量、性质(例如分子量)、反应条件等的所有数字应被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。本文所用术语“约”和“近似”是指在10至15%之间,优选在5至10%之内。因此,除非有相反指示,否则在说明书和所附权利要求书中阐述的数值参数可以根据本发明寻求获得的期望性质而变化。至少且非试图将等同原则的适用范围限制在权利要求书的范围内,每个数值参数至少应该根据报告的有效数字的数量和通过应用普通舍入技术来解释。尽管提出本发明的广泛范围的数值范围和参数是近似值,但是具体实施例中列出的数值尽可能精确地报告。然而,任何数值固有的地包含其各自测试测量中发现的标准偏差导致的一些必然的误差。

[0083] 在描述本发明的上下文中使用的术语“一”、“一个”、“该”和相似的指示物(特别是在所附权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数,除非另有说明或与上下文明显矛盾。本文对于数值范围的描述仅旨在作为逐一提及落在该范围内的每个单独值的简写方法。除非另有说明,否则将每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独列举一样。本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行,除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有实施例或示例性语言(例如“例如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并且不对所要求保护的本发明的范围构成限制。说明书中的任何语言不应被解释为表示对本发明的实践至关重要的任何非要求保护的元素。

[0084] 本发明公开的本发明替代元素或实施例的分类不应被解释为限制。每个组成员可以单独地或与组中的其他成员或本文中找到其他成分的任意组合而被引用和请求保护。为了方便起见和/或可专利性,预期组中的一个或多个成员可以被包括在组中或从组中删除。当发生任何此类包含或删除时,该说明书被认为包含经修改的组,从而满足所附权利要求中使用的所有马库什组的书面描述。

[0085] 本文描述了本发明的一些实施方案,包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。当然,这些描述的实施方案的变化在本领域普通技术人员阅读前面的描述后将变得显而易见。发明人期望本领域技术人员适当地使用这种变化,并且本发明人旨在以本文具体描述的方式实施本发明。因此,本发明包括根据适用法律允许的所附权利要求中列举的主

题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖了所有可能变化的上述元件的任何组合。

[0086] 本发明公开的具体实施方式可以在权利要求中进一步受限于“由…组成”或“基本上由…组成”的语言。当在权利要求中使用时,无论是根据修改提交还是添加,该过渡术语“由…组成”都不包括权利要求中未指定的任何要素、步骤或成分。过渡术语“基本上由…组成”将权利要求的范围限制在指定的材料或步骤以及不显著影响实质和新颖特征的那些。所要求保护的本发明的实施方案在本文中被固有地或明确地描述和实现。

[0087] 此外,在本说明书中已经对专利和印刷出版物进行了许多参考。上述引用的参考文献和印刷出版物中的每一个通过引用全部并入本文。

[0088] 最后,应当理解,本发明公开的本发明实施方案是本发明原理的说明。可以采用的其它修改在本发明的范围内。因此,作为示例而非限制,可以根据本文的教导来利用本发明的替代配置。因此,本发明不限于明确所示和所述。



[0001]	序列表
[0002]	<110> 百特有限责任公司
[0003]	百特股份有限公司
[0004]	<120> 在分泌弗林蛋白酶的哺乳动物表达系统中产生被完全加工且功能性的因子X
[0005]	<130> 3724526.00092W0
[0006]	<150> US62/036,438
[0007]	<151> 2014-08-12
[0008]	<160> 4
[0009]	<170> PatentIn version 3.5
[0010]	<210> 1
[0011]	<211> 7981
[0012]	<212> DNA
[0013]	<213> 人工序列
[0014]	<220>
[0015]	<223> RCL.012-74.pD3H-弗林蛋白酶表达载体
[0016]	<400> 1
[0017]	gacggatcgg gagatctccc gatccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg 60
[0018]	ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg 120
[0019]	cgagcaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc 180
[0020]	ttagggtag gcgttttgcg ctgcttcgcg atgtacgggc cagatatacg cgttgacatt 240
[0021]	gattattgac tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagtcat agccatata 300
[0022]	tggagtccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc 360
[0023]	cccgccatt gacgtcaata atgacgtatg tcccatagt aacgccaata gggactttcc 420
[0024]	attgacgtca atgggtggac tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt 480
[0025]	atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt 540
[0026]	atgccagta catgacctta tgggacttct ctacttgga gtacatctac gtattagtca 600
[0027]	tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga tagcggtttg 660
[0028]	actcacggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagttg ttttggcacc 720
[0029]	aaaatcaacg gactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg caaatggcg 780
[0030]	gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact agagaacca 840
[0031]	ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaccaa gctggctagc 900
[0032]	gtttaactt aagcttggtta ccgagctcgg atccactagt ccagtgtggt ggaattctgc 960
[0033]	agatatccag cacagtggcg gccgcatgga gctgaggccc tggttgctat gggtagtagc 1020
[0034]	agcaacagga accttggtcc tgctagcagc tgatgctcag ggccagaagg tcttcacaa 1080
[0035]	cacgtgggct gtgcgcatcc ctggaggccc agcgggtggc aacagtgtgg cacggaagca 1140
[0036]	tgggttctc aacctgggcc agatcttcgg ggactattac cacttctggc atcaggaggt 1200
[0037]	gacgaagcgg tccctgtcgc ctaccgccc gcggcacagc cggctgcaga gggagcctca 1260
[0038]	agtacagtgg ctggaacagc aggtggcaaa gcgacggact aaacgggacg tgtaccagga 1320
[0039]	gcccacagac cccaagtctc ctacagcagtg gtacctgtct ggtgtcactc agcgggacct 1380
[0040]	gaatgtgaag gcggcctggg cgcagggcta cacagggcac ggcattgtgg tctccattct 1440
[0041]	ggacgatggc atcgagaaga accaccgga cttggcaggc aattatgatc ctggggccag 1500

[0042]	ttttgatgtc aatgaccagg accctgaccc ccagcctcgg tacacacaga tgaatgacaa	1560
[0043]	caggcacggc acacggtgtg cggggggaagt ggctgcggtg gccacaacg gtgtctgtgg	1620
[0044]	tgtaggtgtg gcctacaacg cccgcattgg aggggtgcgc atgctggatg gcgaggtgac	1680
[0045]	agatgcagtg gaggcacgct cgctgggcct gaacccaac cacatccaca tctacagtgc	1740
[0046]	cagctggggc cccgaggatg acggcaagac agtggatggg ccagcccgcc tcgccgagga	1800
[0047]	ggccttcttc cgtgggggtta gccagggccg aggggggctg ggctccatct ttgtctgggc	1860
[0048]	ctcggggaac gggggccggg aacatgacag ctgcaactgc gacggctaca ccaacagtat	1920
[0049]	ctacacgtg tccatcagca gcgccacgca gtttggaac gtgccgtggt acagcgaggc	1980
[0050]	ctgctcgtcc aactggcca cgacctacag cagtggcaac cagaatgaga agcagatcgt	2040
[0051]	gacgactgac ttgcggcaga agtgcacgga gtctcacacg ggcacctcag cctctgcccc	2100
[0052]	cttagcagcc ggcatcattg ctctaccct ggaggccaat aagaacctca catggcggga	2160
[0053]	catgcaacac ctggtgttac agacctgaa gccagccac ctcaatgcca acgactgggc	2220
[0054]	caccaatggt gtgggccgga aagttagcca ctcatatggc tacgggcttt tggacgcagg	2280
[0055]	cgccatggtg gccctggccc agaattggac cacagtggcc cccagcgga agtgcacat	2340
[0056]	cgacatcctc accgagccca aagacatcgg gaaacggctc gaggtgcgga agaccgtgac	2400
[0057]	cgcgtgcctg ggcgagccca accacatcac tcggctggag cagctcagg cgcggctcac	2460
[0058]	cctgtcctat aatcgccgtg gcgacctggc catccacctg gtcagccca tgggcacccg	2520
[0059]	ctccacctg ctggcagcca ggccacatga ctactccga gatgggttta atgactgggc	2580
[0060]	cttcatgaca actcattcct gggatgagga tccctctggc gagtgggtcc tagagattga	2640
[0061]	aaacaccagc gaagccaaca actatgggac gctgaccaag ttcacctcg tactctatgg	2700
[0062]	caccgccctt gagggctgc ccgtacctc agaaagcagt ggctgcaaga cctcacgtc	2760
[0063]	cagtcaggcc tgtgtgtgtt gcgaggaagg cttctccctg caccagaaga gctgtgtcca	2820
[0064]	gcactgccct ccaggcttcg cccccaagt cctcgatacg cactatagca ccgagaatga	2880
[0065]	cgtggagacc atccgggcca gcgtctgcgc cccctgccac gcctcatgtg ccacatgcca	2940
[0066]	ggggccggcc ctgacagact gcctcagctg cccagccac gcctccttgg accctgtgga	3000
[0067]	gcagacttgc tcccgcaaa gccagagcag ccgagagtcc ccgccacagc agcagccacc	3060
[0068]	tcggctgccc ccggaggtgg aggcggggca acggctgcgg gcagggtgc tgccctcaca	3120
[0069]	cctgcctgag gtggtggccg gcctcagctg cgccttcac gtgctggtct tcgtcactgt	3180
[0070]	cttctgtgtc ctgcagctgc gctctggtt tagttttcgg ggggtgaagg tgtacacat	3240
[0071]	ggaccgtggc ctcatctcct acaaggggt gcccctgaa gcctggcagg aggagtgcc	3300
[0072]	gtctgactca gaagaggacg agggccgggg cgagaggacc gcctttatca aagaccagag	3360
[0073]	cgccctctga tctagagggc ccgtttaaac ccgctgatca gcctcgaactg tgccttctag	3420
[0074]	ttgccagcca tctgttgtt gcccctcccc cgtgccttc ttgacctgg aaggtgccac	3480
[0075]	tcccactgtc ctttctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca	3540
[0076]	ttctattctg ggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagacaatag	3600
[0077]	caggcatgct ggggatgcgg tgggtcttat ggcttctgag gcggaagaa ccagctgggg	3660
[0078]	ctctaggggg tatccccacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt	3720
[0079]	tacgcgcagc gtgaccgcta caattgccag cgccctagcg cccgtcctt tcgtttctt	3780
[0080]	cccttccttt ctgccacgt tcgccggtt tcccgtcaa gctctaaatc ggggcatccc	3840
[0081]	tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg attagggtga	3900
[0082]	tggttcacgt agtgggcat cgccctgata gacggtttt cgcccttga cgttgagtc	3960
[0083]	cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggt	4020

[0084]	ctattctttt gatttataag ggattttggg gatttcggcc tatttggttaa aaaatgagct	4080
[0085]	gatttaacaa aaatttaacg cgaattaatt ctgtggaatg tgtgtcagtt aggggtgtgga	4140
[0086]	aagtccccag gctccccagg caggcagaag tatgcaaagc atgcatctca attagtcagc	4200
[0087]	aaccagggtgt ggaaagtccc caggctcccc agcaggcaga agtatgcaaa gcatgcatct	4260
[0088]	caattagtcg gcaaccatag tcccggccct aactccgccc atcccgcgcc taactccgcc	4320
[0089]	cagttccgcc cattctccgc cccatggctg actaattttt tttatttatg cagaggccga	4380
[0090]	ggccgcctct gcctctgagc tattccagaa gtagtgagga ggcttttttg gaggcctagg	4440
[0091]	cttttgcaaa aagctcccg gaggcttgat atccattttc ggatctgac agcacgtgat	4500
[0092]	gaaaaagcct gaactcaccg cgacgtctgt cgagaagttt ctgacgaaa agttcgacag	4560
[0093]	cgtctccgac ctgatgcagc tctcggaggg cgaagaatct cgtgctttca gcttcgatgt	4620
[0094]	aggaggcggt ggatatgtcc tgcgggtaaa tagctgcgcc gatggtttct acaaagatcg	4680
[0095]	ttatgtttat cggcactttg catcggccgc gctcccgatt ccggaagtgc ttgacattgg	4740
[0096]	ggaattcagc gagagcctga cctattgcat ctcccgcctg gcacagggtg tcacgttgca	4800
[0097]	agacctgcct gaaaccgaac tgcccgtgt tctgcagccg gtcgcggagg ccatggatgc	4860
[0098]	gatcgctgcg gccgatctta gccagacgag cgggttcggc ccattcggac cgcaaggaa	4920
[0099]	cggtaatac actacatggc gtgatttcat atgcgcgatt gctgatcccc atgtgtatca	4980
[0100]	ctggcaaact gtgatggacg acaccgtcag tgcgtccgtc gcgcaggctc tcgatgagct	5040
[0101]	gatgcttttg gccgaggact gcccgaagt ccggcacctc gtgcacgcgg atttcggctc	5100
[0102]	caacaatgtc ctgacggaca atggccgcat aacagcggtc attgactgga gcgaggcgat	5160
[0103]	gttcggggat tcccaatac aggtcgccaa catcttcttc tggaggccgt ggttggttg	5220
[0104]	tatggagcag cagacgcgt acttcgagcg gaggcacccg gagcttgagc gatcgccgcg	5280
[0105]	gctccgggag tatatgtcc gcattggtct tgaccaactc tatcagagct tggttgacgg	5340
[0106]	caatttcgat gatgcagctt gggcgcaggg tcgatgcgac gcaatcgtcc gatccggagc	5400
[0107]	cgggactgtc gggcgtagac aaatcgcccg cagaagcgcg gccgtctgga ccgatggctg	5460
[0108]	tgtagaagta ctgccgata gtggaaaccg acgcccagc actcgtccga gggcaaagga	5520
[0109]	atagcacgtg ctacgagatt tcgattccac cgccgccttc tatgaaaggt tgggcttcgg	5580
[0110]	aatcgttttc cgggacgccg gctggatgat cctccagcgc ggggatctca tgctggagtt	5640
[0111]	cttcgccac cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt taaaaataa gcaatagcat	5700
[0112]	cacaaatttc acaataaag catttttttc actgcattct agttgtggtt tgtecaaact	5760
[0113]	catcaatgta tcttatcatg tctgtatacc gtcgacctct agctagagct tggcgtaatc	5820
[0114]	atggtcatag ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatac	5880
[0115]	agccggaagc ataaagtgtg aagcctgggg tgcctaata gtagagtaac tcacattaat	5940
[0116]	tgcgttgccg tcaactgccc ctttcagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg	6000
[0117]	aatcgcccaa cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgtctttccg ctctctgct	6060
[0118]	cactgactcg ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc	6120
[0119]	ggtaatacgg ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg	6180
[0120]	ccagcaaaag gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg	6240
[0121]	ccccctgac gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtacg aggtggcgaa acccgacagg	6300
[0122]	actataaaga taccaggcgt tccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac	6360
[0123]	cctgccgctt accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca	6420
[0124]	atgctcacgc tgtaggtatc tcagttcggg ttaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt	6480
[0125]	gcacgaaccc cccgttcage ccgaccgtg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc	6540

[0126]	caaccggtgta agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggttaaca ggattagcag 6600
[0127]	agcgaggtat gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac 6660
[0128]	tagaaggaca gtatttggtg tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt 6720
[0129]	tggtagctct tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtgggtttt ttgtttgcaa 6780
[0130]	gcagcagatt acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cttttgatct tttctacggg 6840
[0131]	gtctgacgct cagtggaaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa 6900
[0132]	aaggatcttc acctagatcc ttttaaatta aaaatgaagt tttaaatcaa tctaaagtat 6960
[0133]	atatgagtaa acttggtctg acagttacca atgcttaatc agtgaggcac ctatctcagc 7020
[0134]	gatctgtcta tttcgttcat ccatagtgtc ctgactcccc gtcgtgtaga taactacgat 7080
[0135]	acgggagggc ttaccatctg gccccagtgc tgcaatgata ccgcgagacc cacgctcacc 7140
[0136]	ggctccagat ttatcagcaa taaaccagcc agccggaagg gccgagcgca gaagtgggtc 7200
[0137]	tgcaacttta tccgcctcca tccagtctat taattgttgc cgggaagcta gagtaagtag 7260
[0138]	ttcgccagtt aatagtttgc gcaacgttgt tgccattgct acaggcatcg tgggtgtcacg 7320
[0139]	ctcgtcgttt ggtatggctt cattcagctc cggttcccaa cgatcaaggc gagttacatg 7380
[0140]	atcccccatg ttgtgcaaaa aagcggttag ctcttcggt cctccgatcg ttgtcagaag 7440
[0141]	taagtggcc gcagtgttat cactcatggt tatggcagca ctgcataatt ctcttactgt 7500
[0142]	catgccatcc gtaagatgct tttctgtgac tggtagtac tcaaccaagt cattctgaga 7560
[0143]	atagtgtatg cggcgaccga gttgctcttg cccggcgctca atacgggata ataccgcgcc 7620
[0144]	acatagcaga actttaaaag tgctcatcat tggaaaacgt tcttcggggc gaaaactctc 7680
[0145]	aaggatctta ccgctgttga gatccagttc gatgtaaccc actcgtgcac ccaactgac 7740
[0146]	ttcagcatct tttactttca ccagcgttgc tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc 7800
[0147]	cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa atgttgaata ctcatactct tcctttttca 7860
[0148]	atattattga agcatttatc agggttattg tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat 7920
[0149]	ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc cgaaaagtgc cacctgacgt 7980
[0150]	c 7981
[0151]	<210> 2
[0152]	<211> 2385
[0153]	<212> DNA
[0154]	<213> 智人
[0155]	<400> 2
[0156]	atggagctga ggccctgggt gctatgggtg gtagcagcaa caggaacctt ggtcctgcta 60
[0157]	gcagctgatg ctacgggcca gaaggtcttc accaacacgt gggctgtgcg catccctgga 120
[0158]	ggcccagcgg tggccaacag tgtggcacgg aagcatgggt tcctcaacct gggccagatc 180
[0159]	ttcggggact attaccactt ctggcatcga ggagtgcga agcggtcctt gtcgcctcac 240
[0160]	cgcccgcggc acagccggct gcagaggag cctcaagtac agtggctgga acagcaggtg 300
[0161]	gcaaagcgac ggactaaacg ggacgtgtac caggagccca cagaccccaa gtttcctcag 360
[0162]	cagtggtagc tgtctgggtg cactcagcgg gacctgaatg tgaaggcggc ctgggcgcag 420
[0163]	ggctacacag ggcacggcat tgtggtctcc attctggacg atggcatcga gaagaaccac 480
[0164]	ccggacttgg caggcaatta tgatcctggg gccagttttg atgtcaatga ccaggacct 540
[0165]	gacccccagc ctcggtacac acagatgaat gacaacaggc acggcacacg gtgtgcgggg 600
[0166]	gaagtggctg cgggtggccaa caacggtgtc tgtggtgtag gtgtggccta caacgcccgc 660
[0167]	attggagggg tgcgcatgct ggatggcgag gtgacagatg cagtggaggc acgctcgtctg 720

[0168]	ggcctgaacc ccaaccacat ccacatctac agtgccagct ggggccccga ggatgacggc	780
[0169]	aagacagtgg atgggccagc ccgcctcgcc gaggaggcct tcttccgtgg ggtagccag	840
[0170]	ggccgagggg ggctgggctc catctttgtc tgggcctcgg ggaacggggg ccgggaacat	900
[0171]	gacagctgca actgcgacgg ctacaccaac agtatctaca cgctgtccat cagcagcgcc	960
[0172]	acgcagtttg gcaacgtgcc gtggtacagc gaggcctgct cgtccacact ggccacgacc	1020
[0173]	tacagcagtg gcaaccagaa tgagaagcag atcgtgacga ctgacttgcg gcagaagtgc	1080
[0174]	acggagtctc acacgggcac ctacagcctc gccccttag cagccggcat cattgtctc	1140
[0175]	acctggagg ccaataagaa cctcacatgg cgggacatgc aacacctggt ggtacagacc	1200
[0176]	tcgaagccag cccacctcaa tgccaacgac tgggccacca atggtgtggg ccggaagtgc	1260
[0177]	agccactcat atggctacgg gcttttgac gcaggcgcca tgggtggcct ggcccagaat	1320
[0178]	tggaccacag tggccccca gcggaagtgc atcatcgaca tctcaccga gcccaaagac	1380
[0179]	atcgggaaac ggctcgaggt gcggaagacc gtgaccgct gcctgggcga gcccaaccac	1440
[0180]	atcactcggc tggagcacgc tcaggcgagg ctaccctgt cctataatcg ccgtggcgac	1500
[0181]	ctggccatcc acctggtcag ccccatgggc acccgctcca ccctgctggc agccaggcca	1560
[0182]	catgactact ccgcagatgg gtttaatgac tgggccttca tgacaactca ttcctgggat	1620
[0183]	gaggatccct ctggcgagtg ggtcctagag attgaaaaca ccagcgaagc caacaactat	1680
[0184]	gggacgctga ccaagttcac cctcgtactc tatggcaccg cccctgaggg gctgcccgt	1740
[0185]	cctccagaaa gcagtggctg caagaccctc acgtccagtc aggcctgtgt ggtgtgcgag	1800
[0186]	gaaggcttct ccctgcacca gaagagctgt gtccagcact gccctccagg cttcgcccc	1860
[0187]	caagtcctcg atacgacta tagcaccgag aatgacgtgg agaccatccg ggccagcgtc	1920
[0188]	tgcgccccct gccacgctc atgtgccaca tgccaggggc cggccctgac agactgcctc	1980
[0189]	agctgcccc gccacgctc cttggaccct gtggagcaga cttgctccc gcaaagccag	2040
[0190]	agcagccgag agtccccgcc acagcagcag ccacctcgcc tgcccccgga ggtggaggcg	2100
[0191]	gggcaacggc tgcgggcagg gctgctgccc tcacacctgc ctgaggtggt ggccggcctc	2160
[0192]	agctgcgect tcatcgtgt ggtcttcgtc actgtcttcc tggctctgca gctgcgtct	2220
[0193]	ggctttagtt ttcgggggt gaaggtgtac accatggacc gtggcctcat ctctacaag	2280
[0194]	gggctgcccc ctgaagcctg gcaggaggag tgcccgtctg actcagaaga ggacgagggc	2340
[0195]	cggggcgaga ggaccgcctt tatcaaagac cagagcgccc tctga	2385
[0196]	<210> 3	
[0197]	<211> 794	
[0198]	<212> PRT	
[0199]	<213> 智人	
[0200]	<400> 3	
[0201]	Met Glu Leu Arg Pro Trp Leu Leu Trp Val Val Ala Ala Thr Gly Thr	
[0202]	1 5 10 15	
[0203]	Leu Val Leu Leu Ala Ala Asp Ala Gln Gly Gln Lys Val Phe Thr Asn	
[0204]	20 25 30	
[0205]	Thr Trp Ala Val Arg Ile Pro Gly Gly Pro Ala Val Ala Asn Ser Val	
[0206]	35 40 45	
[0207]	Ala Arg Lys His Gly Phe Leu Asn Leu Gly Gln Ile Phe Gly Asp Tyr	
[0208]	50 55 60	
[0209]	Tyr His Phe Trp His Arg Gly Val Thr Lys Arg Ser Leu Ser Pro His	

[0210]	65	70	75	80
[0211]	Arg Pro Arg His Ser Arg Leu Gln Arg Glu Pro Gln Val Gln Trp Leu			
[0212]		85	90	95
[0213]	Glu Gln Gln Val Ala Lys Arg Arg Thr Lys Arg Asp Val Tyr Gln Glu			
[0214]		100	105	110
[0215]	Pro Thr Asp Pro Lys Phe Pro Gln Gln Trp Tyr Leu Ser Gly Val Thr			
[0216]		115	120	125
[0217]	Gln Arg Asp Leu Asn Val Lys Ala Ala Trp Ala Gln Gly Tyr Thr Gly			
[0218]		130	135	140
[0219]	His Gly Ile Val Val Ser Ile Leu Asp Asp Gly Ile Glu Lys Asn His			
[0220]	145	150	155	160
[0221]	Pro Asp Leu Ala Gly Asn Tyr Asp Pro Gly Ala Ser Phe Asp Val Asn			
[0222]		165	170	175
[0223]	Asp Gln Asp Pro Asp Pro Gln Pro Arg Tyr Thr Gln Met Asn Asp Asn			
[0224]		180	185	190
[0225]	Arg His Gly Thr Arg Cys Ala Gly Glu Val Ala Ala Val Ala Asn Asn			
[0226]		195	200	205
[0227]	Gly Val Cys Gly Val Gly Val Ala Tyr Asn Ala Arg Ile Gly Gly Val			
[0228]		210	215	220
[0229]	Arg Met Leu Asp Gly Glu Val Thr Asp Ala Val Glu Ala Arg Ser Leu			
[0230]	225	230	235	240
[0231]	Gly Leu Asn Pro Asn His Ile His Ile Tyr Ser Ala Ser Trp Gly Pro			
[0232]		245	250	255
[0233]	Glu Asp Asp Gly Lys Thr Val Asp Gly Pro Ala Arg Leu Ala Glu Glu			
[0234]		260	265	270
[0235]	Ala Phe Phe Arg Gly Val Ser Gln Gly Arg Gly Gly Leu Gly Ser Ile			
[0236]		275	280	285
[0237]	Phe Val Trp Ala Ser Gly Asn Gly Gly Arg Glu His Asp Ser Cys Asn			
[0238]		290	295	300
[0239]	Cys Asp Gly Tyr Thr Asn Ser Ile Tyr Thr Leu Ser Ile Ser Ser Ala			
[0240]	305	310	315	320
[0241]	Thr Gln Phe Gly Asn Val Pro Trp Tyr Ser Glu Ala Cys Ser Ser Thr			
[0242]		325	330	335
[0243]	Leu Ala Thr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Gln Asn Glu Lys Gln Ile Val			
[0244]		340	345	350
[0245]	Thr Thr Asp Leu Arg Gln Lys Cys Thr Glu Ser His Thr Gly Thr Ser			
[0246]		355	360	365
[0247]	Ala Ser Ala Pro Leu Ala Ala Gly Ile Ile Ala Leu Thr Leu Glu Ala			
[0248]		370	375	380
[0249]	Asn Lys Asn Leu Thr Trp Arg Asp Met Gln His Leu Val Val Gln Thr			
[0250]	385	390	395	400
[0251]	Ser Lys Pro Ala His Leu Asn Ala Asn Asp Trp Ala Thr Asn Gly Val			

[0252]		405		410		415
[0253]	Gly Arg Lys Val Ser His Ser Tyr Gly Tyr Gly Leu Leu Asp Ala Gly					
[0254]		420		425		430
[0255]	Ala Met Val Ala Leu Ala Gln Asn Trp Thr Thr Val Ala Pro Gln Arg					
[0256]		435		440		445
[0257]	Lys Cys Ile Ile Asp Ile Leu Thr Glu Pro Lys Asp Ile Gly Lys Arg					
[0258]		450		455		460
[0259]	Leu Glu Val Arg Lys Thr Val Thr Ala Cys Leu Gly Glu Pro Asn His					
[0260]	465		470		475	480
[0261]	Ile Thr Arg Leu Glu His Ala Gln Ala Arg Leu Thr Leu Ser Tyr Asn					
[0262]		485		490		495
[0263]	Arg Arg Gly Asp Leu Ala Ile His Leu Val Ser Pro Met Gly Thr Arg					
[0264]		500		505		510
[0265]	Ser Thr Leu Leu Ala Ala Arg Pro His Asp Tyr Ser Ala Asp Gly Phe					
[0266]		515		520		525
[0267]	Asn Asp Trp Ala Phe Met Thr Thr His Ser Trp Asp Glu Asp Pro Ser					
[0268]		530		535		540
[0269]	Gly Glu Trp Val Leu Glu Ile Glu Asn Thr Ser Glu Ala Asn Asn Tyr					
[0270]	545		550		555	560
[0271]	Gly Thr Leu Thr Lys Phe Thr Leu Val Leu Tyr Gly Thr Ala Pro Glu					
[0272]		565		570		575
[0273]	Gly Leu Pro Val Pro Pro Glu Ser Ser Gly Cys Lys Thr Leu Thr Ser					
[0274]		580		585		590
[0275]	Ser Gln Ala Cys Val Val Cys Glu Glu Gly Phe Ser Leu His Gln Lys					
[0276]		595		600		605
[0277]	Ser Cys Val Gln His Cys Pro Pro Gly Phe Ala Pro Gln Val Leu Asp					
[0278]		610		615		620
[0279]	Thr His Tyr Ser Thr Glu Asn Asp Val Glu Thr Ile Arg Ala Ser Val					
[0280]	625		630		635	640
[0281]	Cys Ala Pro Cys His Ala Ser Cys Ala Thr Cys Gln Gly Pro Ala Leu					
[0282]		645		650		655
[0283]	Thr Asp Cys Leu Ser Cys Pro Ser His Ala Ser Leu Asp Pro Val Glu					
[0284]		660		665		670
[0285]	Gln Thr Cys Ser Arg Gln Ser Gln Ser Ser Arg Glu Ser Pro Pro Gln					
[0286]		675		680		685
[0287]	Gln Gln Pro Pro Arg Leu Pro Pro Glu Val Glu Ala Gly Gln Arg Leu					
[0288]		690		695		700
[0289]	Arg Ala Gly Leu Leu Pro Ser His Leu Pro Glu Val Val Ala Gly Leu					
[0290]	705		710		715	720
[0291]	Ser Cys Ala Phe Ile Val Leu Val Phe Val Thr Val Phe Leu Val Leu					
[0292]		725		730		735
[0293]	Gln Leu Arg Ser Gly Phe Ser Phe Arg Gly Val Lys Val Tyr Thr Met					

[0294]	740	745	750
[0295]	Asp Arg Gly Leu Ile Ser Tyr Lys Gly Leu Pro Pro Glu Ala Trp Gln		
[0296]	755	760	765
[0297]	Glu Glu Cys Pro Ser Asp Ser Glu Glu Asp Glu Gly Arg Gly Glu Arg		
[0298]	770	775	780
[0299]	Thr Ala Phe Ile Lys Asp Gln Ser Ala Leu		
[0300]	785	790	
[0301]	<210> 4		
[0302]	<211> 4		
[0303]	<212> PRT		
[0304]	<213> 人工序列		
[0305]	<220>		
[0306]	<223> 弗林蛋白酶共有识别位点		
[0307]	<220>		
[0308]	<221> 变体		
[0309]	<222> (2) .. (2)		
[0310]	<223> X为任何氨基酸,或无氨基酸		
[0311]	<220>		
[0312]	<221> 变体		
[0313]	<222> (3) .. (3)		
[0314]	<223> X为赖氨酸或精氨酸		
[0315]	<400> 4		
[0316]	Arg Xaa Xaa Arg		
[0317]	1		



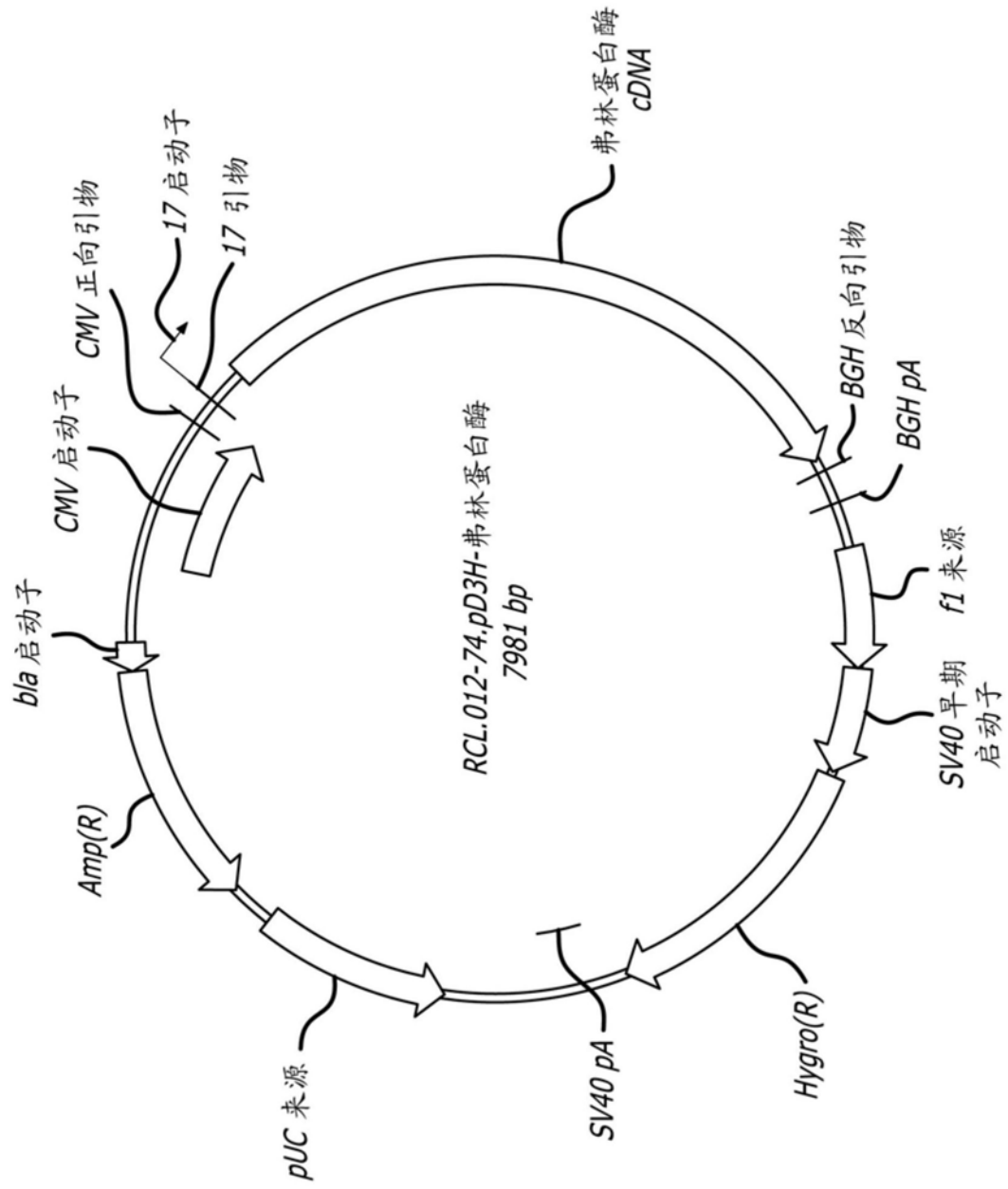


图1A

GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCTATGGTCGACTCTCAGTACAATCTGTCTGTATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATCTGTCCCT  
GCTTGTGTTGGAGTCGCTGAGTAGTGGCGAGCAAAATTAAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACAATTGCATGAAGAATCT  
GCTTAGGGTTAGGCGTTTTCGCGTGTCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGATTATAGCTAGTTATTAATAGTAAT  
CAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAAC  
GACCCCGCCCAATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGACTATT  
ACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCTTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCT  
GGCATATATGCCCCAGTACATGACCTTATGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGG  
TTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGGATTTCCAACTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT  
TTGGCAACAAAAACAACGGGACTTTCAAAAATGTCGTAAACAATCCGCCCATTTGACGCAAAATGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGG  
TCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCTACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAA  
GCTGGCTAGCGTTTAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTCCAGTGTGGTGAATTTTCAGATATTCAGACATCCAGCACAGTGGC  
GGCCGCTAGGAGCTGAGGCCCTGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACAGGAACCTTGGTCTCTGTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAA  
GGTCTTCAACCAACAGTGGGCTGTGGCATCCCTGGAGGCCACGCGTGGCCAAACAGTGTGGCAACGGAAGCATGGGTTCTTCAACCTGG  
GCCAGATCTTCGGGACTATTACCACTTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTGCGCTCACCGCCCGGGCACAGCCGGCTG  
CAGAGGAGCCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAAGCAGCGACTAAACGGGACGTGTACCAGGAGCCACACAGACCCCAA  
GTTTCTCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGCGGCTTGGCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCA  
TTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCCCGGACTTGGCAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTGTATGTCAAT  
GACCAGGACCCCTGACCCCGAGCTCGGTACACACAGATGAATGACAAACAGGCACGGCACACGCTGTGCGGGGAAAGTGGCTGCGGTGGC  
CAACAAACGGTGTCTGTGGTGTAGGTGTGGCTTACAAACGCCCGCATTTGGAGGGGTGCGCATGTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGG  
AGGCACGCTCGCTGGGCTTGAACCCCAACACATCCACATCTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGGG  
CCAGCCCGCTCGCCGAGGAGGCCCTTCTTCGTGGGTAGCCAGGCCGAGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTCTGGGCTCGGGGAA  
CGGGGCCGGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACAGCTGTCCATCAGCAGCCCAACGCAATTGGCA  
ACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCTGTCTCGTCCACACTGGCCACGACCTACAGCAGTGGCAACAGAAATGAGAAGCAGATCGTGACGACT  
GACTTGGCGCAGAAGTGACGGAGTCTCACACGGGCACCTCAGCCCTCTGCCCTTTAGCAGCCGGCATCATTTGCTCTCACCTGGAGGC  
CAATAAGAACCTCACATGGCGGACATGCAACACCTGTTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCCACTCAATGCCAACGACTGGGCCACCA  
ATGGTGTGGCCGGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGAGCGGCCATGGTGGCCCTGGCCCAAGATTGGACCA  
GTGGCCCCCGAGCGGAAGTGATCATCGACATCTCATCCGAGCCCAAGACATCGGGAAACGGCTCGAGTGGGGAAGACCGTGACCGC  
GTGCCCTGGCGAGCCCAACACATCACTCGGTGGAGCACGCTCAGGCGGGCTCACCTGTCTCTATATCGCCGTGGCGACCTGGCCA  
TCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCTGTGTGGCAGCCAGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAAATGACTGGCC  
TTTCATGACAACTCATTCCTGGGATGAGGATCCCTCTGGCGAGTGGTCTTAGAGATTGAAAACACCCAGCGAAGCCAACTATGGGAC  
GCTGACCAAGTTTACCCCTCGTACTCTATGGCACCGCCCTGAGGGGCTGCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGGTGCAAGACCCCTCACGT

图1B

[illegible]

图1B (续)

GCACCTCGTGACGCGGATTTCGGCTCCAAACAATGTCCTGACGGACAATGGCCGCAATAACAGCGGTCAATTGACTGGAGCGAGCGGATGT  
 TCGGGGATTCCTCAATACGAGGTCGCCAACAATCTTCTCTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATGGAGCAGCAGACGCGCTACTTCGAGCGG  
 AGGCATCCGGAGCTTGACAGGATCGCCGCGGCTCCGGCGGTATATGCTCCGCAATTGGCTTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGTTGATTGACGG  
 CAATTTCGATGATGACGCTTGCGGCGCAGGTCGATGCGACGCAATCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGGTACACAAATCGCCCC  
 GCAGAAAGCGGCGCTGACCGGATGGCTGTGTAGAAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGTCCGAGGGCAAAAG  
 GAATAGCACGTGCTACGAGATTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGTTGGCTTCGGAATCGTTTCCGGGACGCCCGCTGGAT  
 GATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCCACCCCAACTTGTATTATGCACTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATA  
 GCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTCACCTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTAATCTTATCATGTCTGT  
 ATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGCGGTAATCATGGTCATAGCTGTTCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAA  
 CATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCCGCTT  
 TCCAGTCGGGAAACCTGTGTCGCAAGCTGCATTAAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTTGGGCGCTCTTCCGCT  
 TCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCTGCTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGCGGTAAATACGGTTATCCACAGA  
 ATCAGGGGATAACGAGGAAAGAAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGCCAGGAACCGTAAAGAGCCGCGTGTGCTGGCGTTTTC  
 ATAGGCTCCGCCCTTGACGAGCATCAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAAGCG  
 TTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGT  
 GCGCTTTCTCAAATGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCTGCTCCAAAGCTGGGCTGTGTGCAACGAAACCCCGTTT  
 AGCCCGACCGCTGCGCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGT  
 AACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTCTTGAAAGTGGTGCCCTAACTACGGCTACACTAGAAAGGACAGTATT  
 TGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAAACAAACCAACCGCTGGTAGCGGTG  
 GTTTTGTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAAGATCCCTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAG  
 TGGAAACGAAAACTCAGTTAAGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAAGGATCTTCACTAGATCCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTT  
 TAAATCAATCTAAAGTATATAGATAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACTTATCTCAGCGATCTGTCTAT  
 TTCGTTCAATCCATAGTTGCCCTGACTCCCGCTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATA  
 CCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGCCGAGCGCAGAGTGGTCCGTGCAACTTT  
 ATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTATGTTCCGCAAGTAAATAGTTTTCGCAACGTTGTTGCCATG  
 CTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCAATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATATCCCCC

图1B(续)

ATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGATCGTTGTGCAGAAAGTAAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGC  
AGCACTGCATAAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAGTCATTTCTGAGAAATAGT  
GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTTAAAAAGTGCTCATCATTTGGA  
AAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAAACCCACTCGTGCAACCCAACTGATCTTC  
AGCATCTTTTACTTTCACCAAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAT  
GTTGAAATACATCATCTCTTCTTTTCAATAATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTTGAATGTATT  
TAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTC

图1B(续)





MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFTNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFWHRGVTKRSLSPHRPRHSRLQR  
EPQVQWLEQQVAKRRRTKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDNLNVKAAWAQGYTGHHGI VVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDDVNDQ  
DPDPQPRYTQMNDNRHGTGRCAGEVA AVANNVCGVGVAYNARIGGVRMLDGEVTD AVEARSLGLNPNIHIYSASWGPEDDGGKTVDGPA  
RLAEAEFFRGVSQGRGGLGSI FVWASNGGREHDSNCNCDGYTNSIYTLSSISSATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDL  
RQCTESHTGTSASAPLAAGI IALTLEANKNLTWRDMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSYSYGYGLLDAGAMVALAQNWTTVA  
PQRKCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHI TRLEHAQARLTLSYNRRGDLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDY SADGFNDWAFM  
TTHSWDEDPGGEWVLEIENTSEANNYGTLTKFTLVLYGTAP EGPLPVPPESSGCKTLTSSQACVVC EEGFSLHQKSCVQHCP PGFAPQVL  
DTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCSRQSQSSRESPPQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSH  
LPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVYTMDRGLISYKGLPPEAWQEECPSDSEDEGRGERTAFIKDQSAL

图3

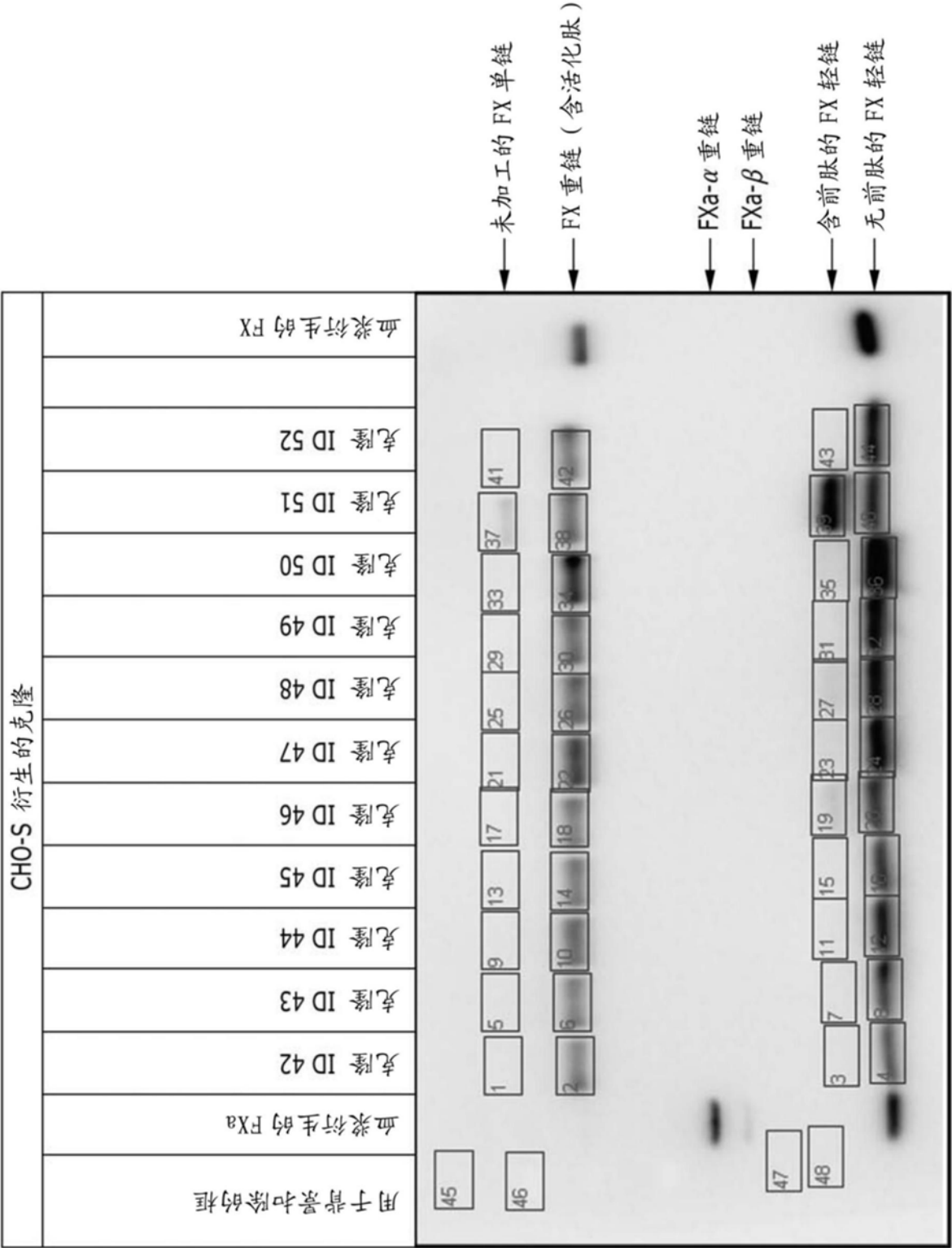


图4



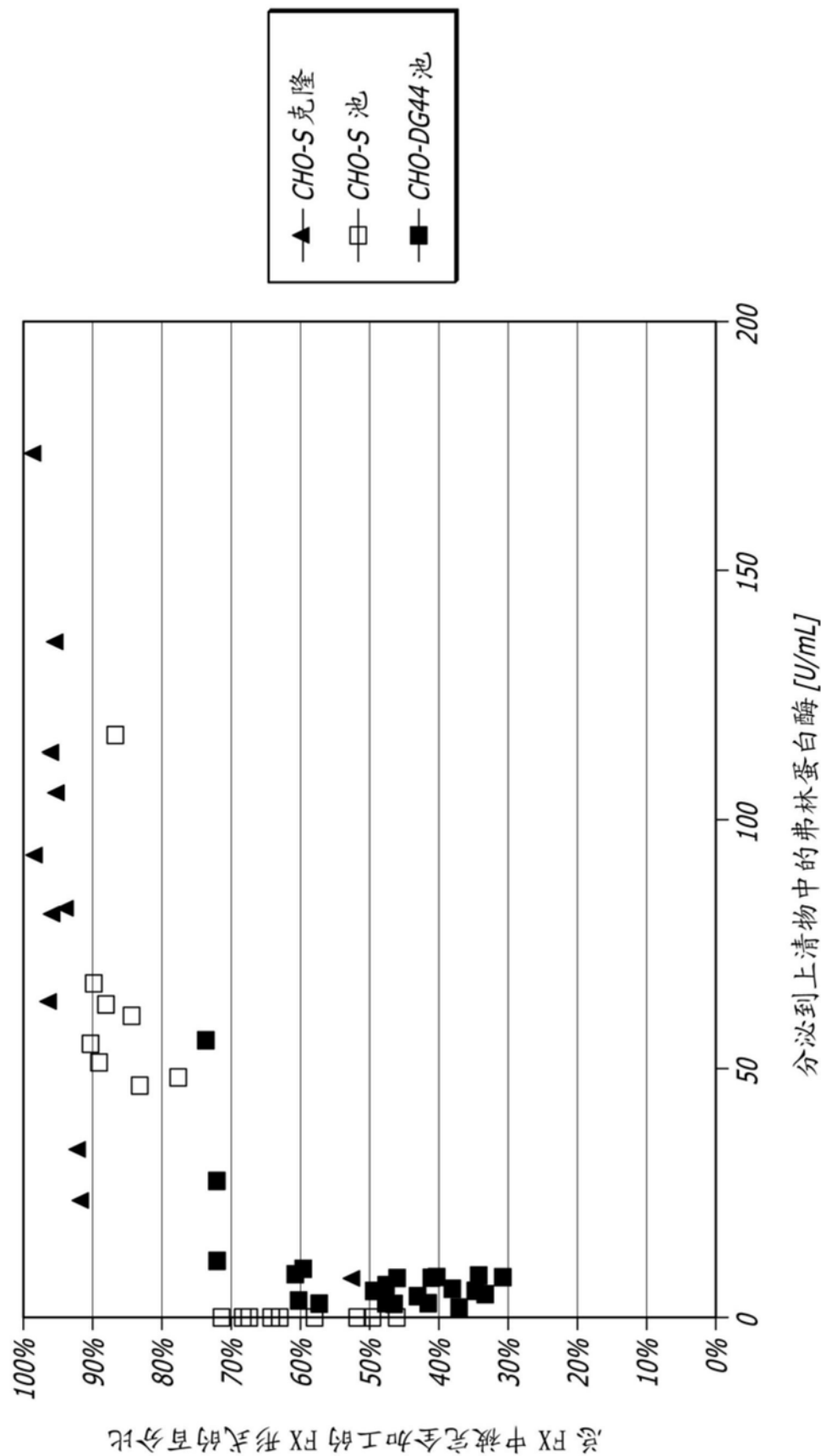


图5

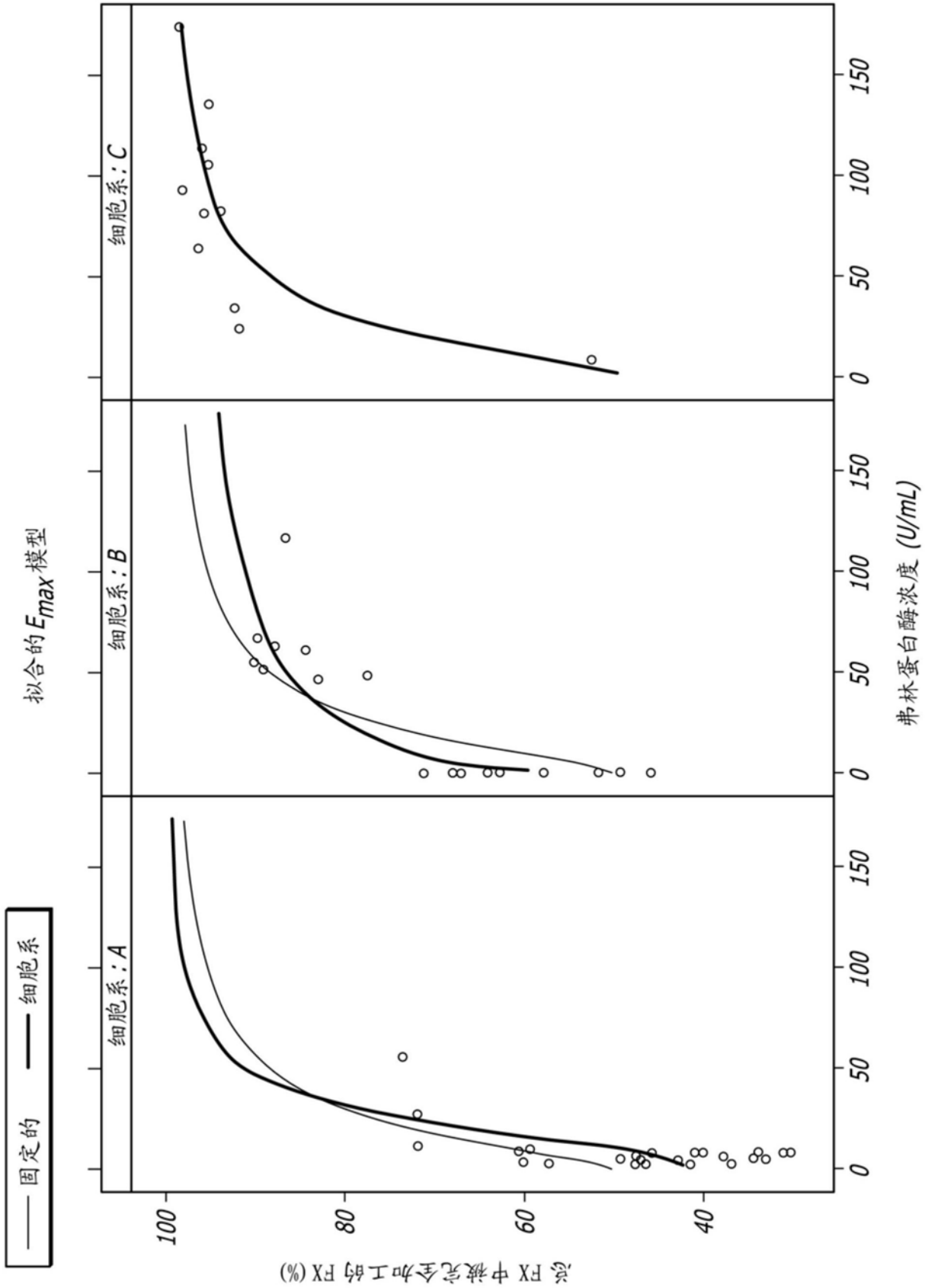


图6

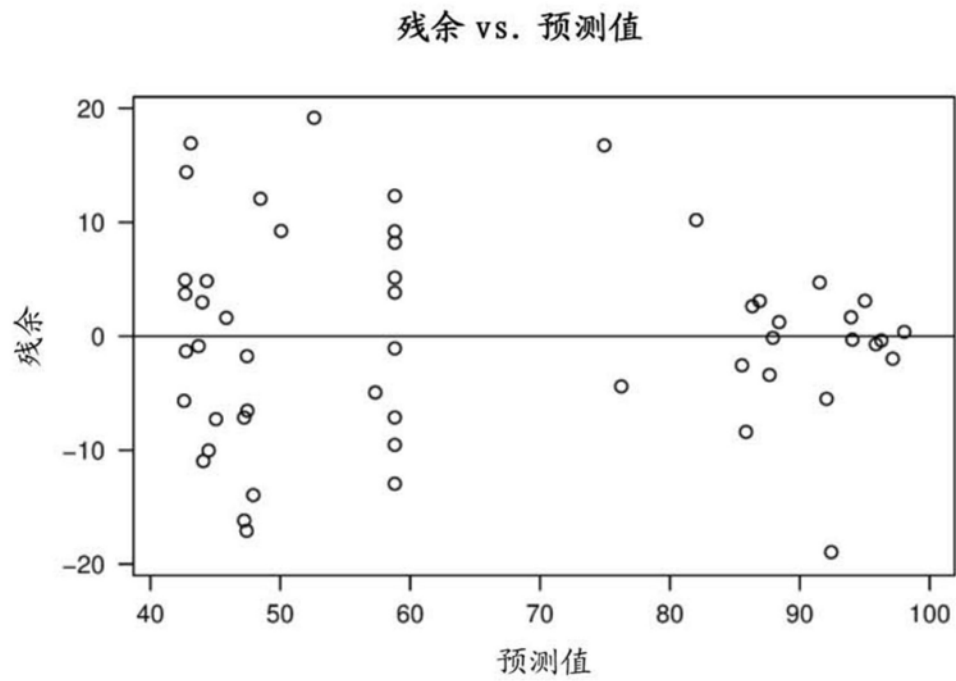


图7A

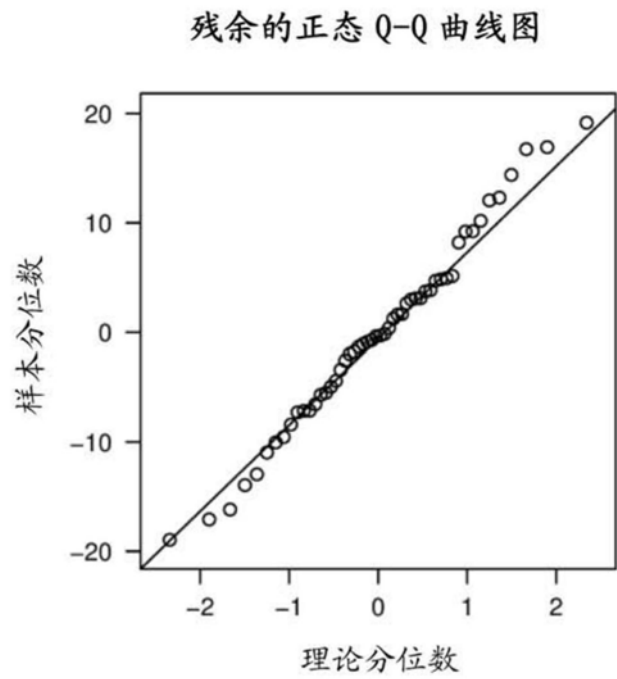


图7B

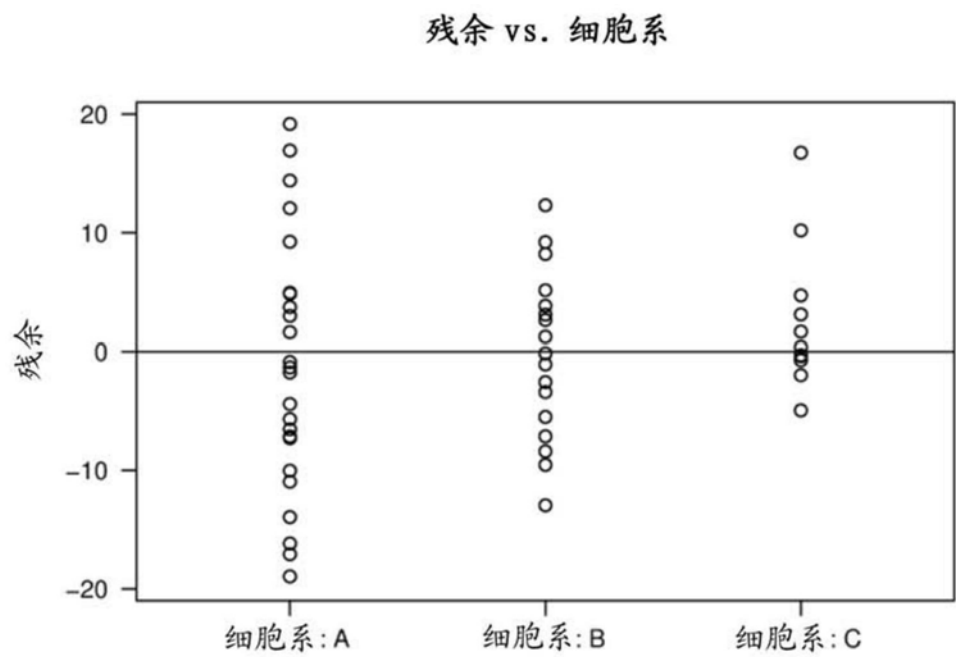


图7C

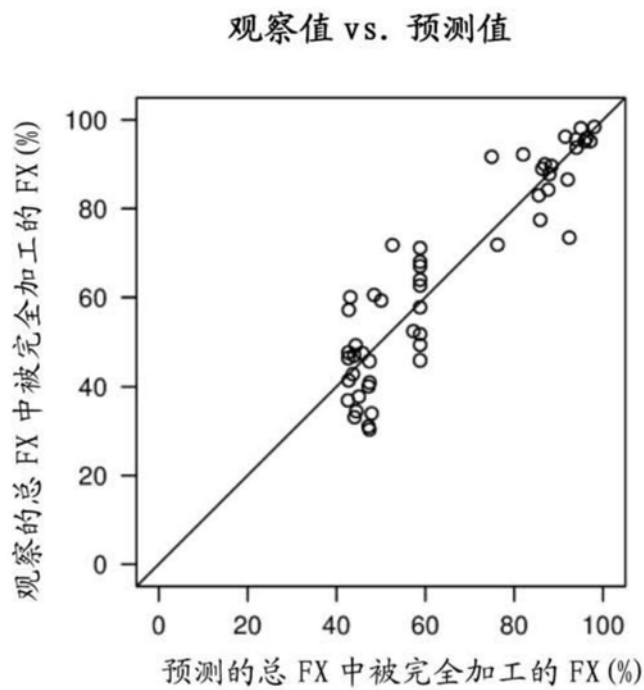


图7D

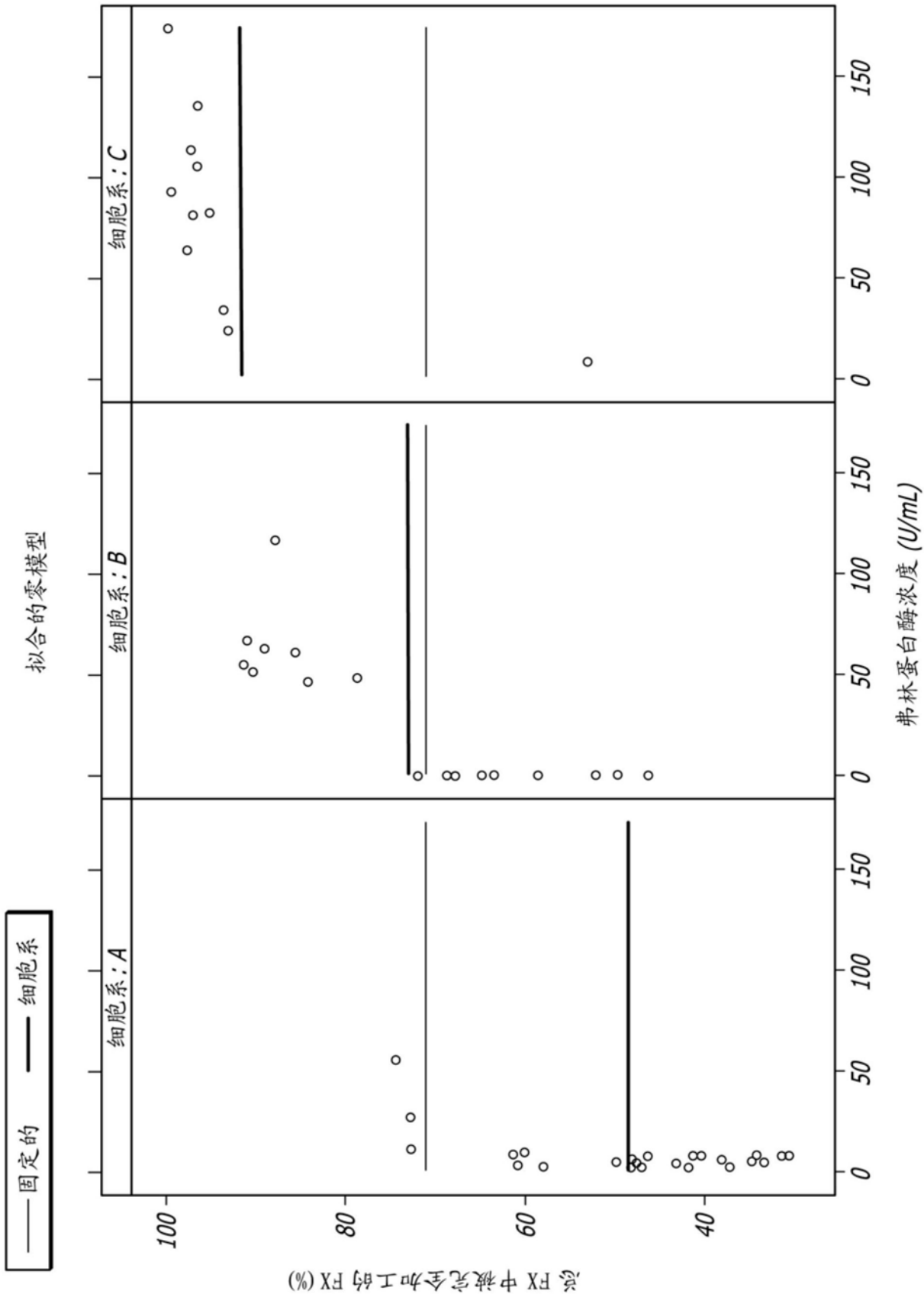


图8

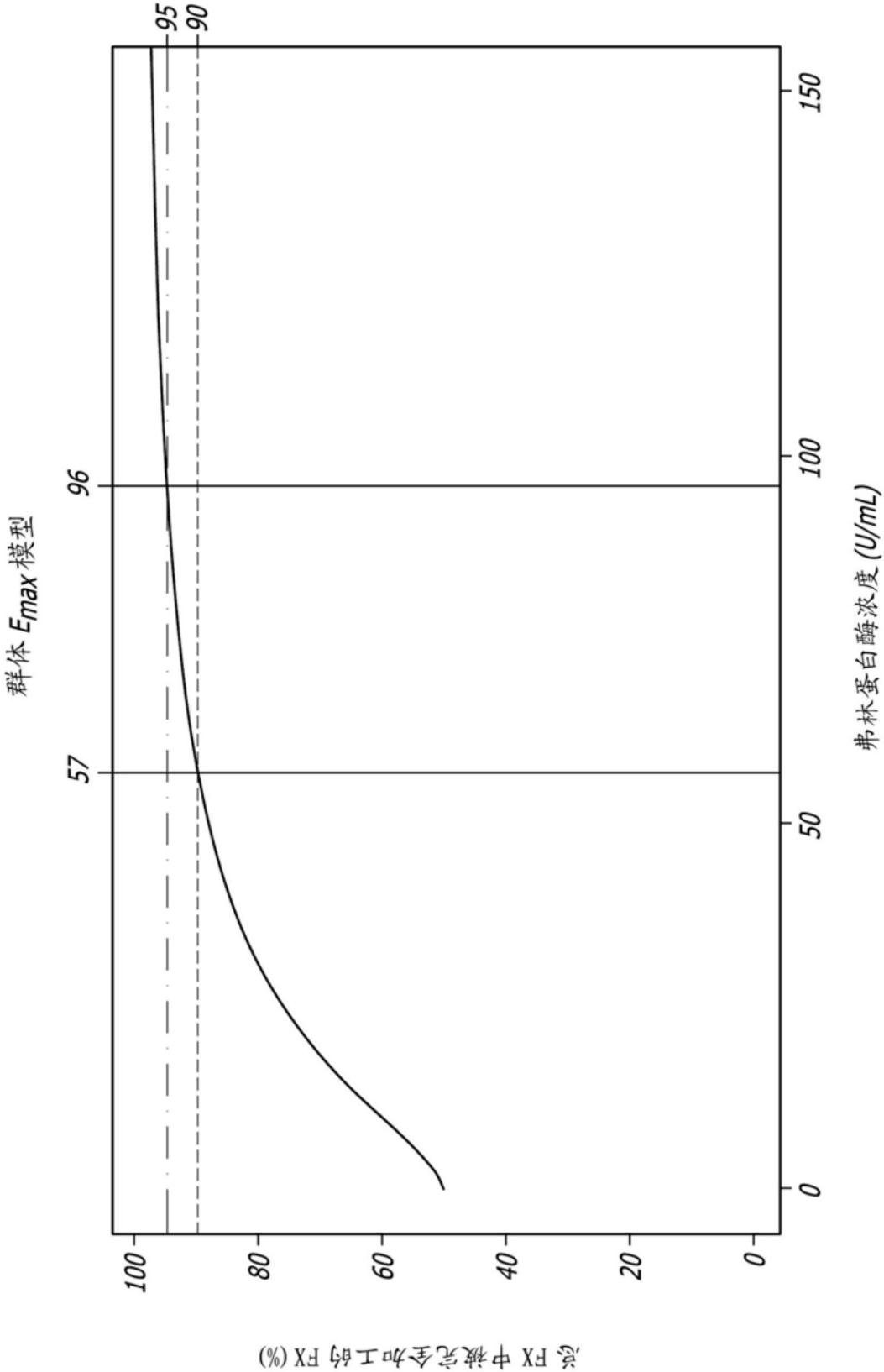


图9