



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107406493 B

(45) 授权公告日 2021. 08. 13

(21) 申请号 201680014025.4

S • 佩斯特尔 T • 韦默

(22) 申请日 2016.03.04

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107406493 A

代理人 韩威威

(43) 申请公布日 2017.11.28

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据
15158065.1 2015.03.06 EP

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.09.06

(56) 对比文件

CN 102161692 A, 2011.08.24

CN 104302296 A, 2015.01.21

WO 2014173873 A1, 2014.10.30

WO 2014198699 A2, 2014.12.18

CN 102648212 A, 2012.08.22

CN 102648212 A, 2012.08.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/054647 2016.03.04

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/142288 EN 2016.09.15

审查员 贾麒

(73) 专利权人 康诺贝林伦瑙有限公司
地址 瑞士伦瑙

(72) 发明人 M • 莫塞斯 S • 舒尔特
G • 迪肯内特 U • 卡琳娜

权利要求书1页 说明书21页
序列表41页 附图2页

(54) 发明名称

具有改善的半衰期的经修饰的血管性血友
病因子

(57) 摘要

本发明涉及用于治疗凝血疾病的经修饰的
VWF分子。

1. 能够结合因子VIII的人血管性血友病因子即VWF分子在制备药物中的用途,所述药物用于治疗凝血疾病,其中所述凝血疾病是血友病A或血管性血友病,其中所述VWF分子包含在氨基酸位置2298缺少O-糖基化位点的C1结构域且具有相比于天然血浆衍生的VWF而言降低的体内清除,并且其中存在于天然VWF中的位置2298的O-糖基化位点已经通过用选自下列的氨基酸置换VWF氨基酸序列的位置2298的氨基酸苏氨酸而失活:甘氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

2. 权利要求1的用途,其中位置2298的苏氨酸已被氨基酸谷氨酰胺置换。

3. 权利要求2的用途,其中所述VWF分子包含SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa为谷氨酰胺。

4. 权利要求2的用途,其中所述VWF分子包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa为谷氨酰胺。

5. 权利要求1-4中任一项的用途,其中相比于与天然血浆衍生的VWF共同施用的因子VIII的半衰期,所述VWF分子能够增加与所述VWF分子共同施用的因子VIII的半衰期。

6. 权利要求1-4中任一项的用途,其中所述治疗还包括施用因子VIII分子。

7. 权利要求6的用途,其中所述VWF分子和所述因子VIII分子分开施用。

8. 药盒,其包含(i)权利要求1至5中任一项之中所定义的VWF分子和(ii)因子VIII分子。

9. 权利要求8的药盒,其中所述VWF分子和所述因子VIII分子包含在分开的组合物中。

10. 药盒,其包含(i)权利要求1至5中任一项之中所定义的VWF分子和(ii)因子VIII分子,用于同时、分开或顺序用于治疗凝血疾病。

11. 权利要求1至5中任一项之中所定义的VWF分子在制备用于体内增加因子VIII的半衰期的药物中的用途。

12. 权利要求1至5中任一项之中所定义的VWF分子在制备药物中的用途,所述药物用于在治疗性治疗中延长因子VIII的半衰期。

具有改善的半衰期的经修饰的血管性血友病因子

发明领域

[0001] 本发明涉及用于改善凝血疾病治疗的产品和方法。

[0002] 发明背景

[0003] 存在由凝血因子缺陷引起的各种出血性疾病。最常见的疾病是血友病A和B,分别由凝血因子VIII (FVIII) 和IX的缺陷引起。另一种已知的出血性疾病是血管性血友病 (von Willebrand's disease, VWD)。

[0004] 在血浆中, FVIII主要作为血管性血友病因子 (von Willebrand factor, VWF) 的非共价复合物存在, 其凝血功能是加速因子IXa依赖性X因子转化为Xa。

[0005] 经典血友病或血友病A是遗传性出血性疾病。它是由凝血FVIII的染色体X连锁缺陷引起的, 几乎完全影响每10,000人发生的1至2个个体的男性。X染色体缺陷由本身不患血友病的女性携带者传播。血友病A的临床表现是出血倾向增加。

[0006] 在进行预防性治疗的严重血友病A患者中, FVIII必须每周静脉内 (i.v.) 约3次施用, 因为FVIII的血浆半衰期短, 约12至14小时。每次i.v.施用麻烦, 与疼痛相关, 并且具有感染的风险, 特别是因为这主要由患者自己或被诊断患有血友病的儿童的父母在家进行。

[0007] 因此, 非常希望增加FVIII的半衰期, 使得含有FVIII的药物组合物不必太过频繁地施用。

[0008] 已经进行若干尝试以延长非活化的FVIII的半衰期: 通过减少其与细胞受体的相互作用 (WO 03/093313 A2、WO 02/060951 A2), 通过将聚合物共价连接到FVIII (WO 94/15625、WO 97/11957和US 4970300), 通过包封FVIII (WO 99/55306), 通过引入新的金属结合位点 (WO 97/03193), 通过肽键 (WO 97/40145和WO 03/087355) 或二硫键 (WO 02/103024A2) 将A2结构域共价连接到A3结构域或通过 将A1结构域共价连接到A2结构域 (WO2006/108590)。

[0009] 增强FVIII或VWF的功能半衰期的另一方法是通过FVIII的聚乙二醇化 (WO 2007/126808、WO 2006/053299、WO 2004/075923) 或通过VWF的聚乙二醇化 (WO 2006/071801), 其中聚乙二醇化的VWF通过增加的半衰期将间接地也增加存在于血浆中FVIII的半衰期。还已经描述了FVIII的融合蛋白 (WO 2004/101740、WO2008/077616和WO 2009/156137)。

[0010] VWF (其在不同形式的血管性血友病 (VWD) 中缺失、功能缺陷 或仅以减少量可用) 是存在于哺乳动物血浆中的具有多种生理功能的多聚体粘附糖蛋白。在初期止血期间, VWF作为血小板表面上的特异性受体和细胞外基质成分如胶原蛋白之间的介质。此外, VWF作为促凝血因子FVIII的载体和稳定蛋白。VWF在内皮细胞和巨核细胞中合成 为2813个氨基酸的前体分子。野生型VWF的氨基酸序列和cDNA序列公开于Collins et al.1987, Proc Natl.Acad.Sci.USA 84:4393-4397 中。前体多肽pre-pro-VWF由22个残基的信号肽、741-残基的前肽 (pro-peptide) 和成熟血浆VWF中发现的2050残基的多肽组成 (Fischer et al., FEBS Lett.351:345-348, 1994)。在内质网中的信号肽切割后, 在VWF的两个单体之间形成C末端二硫桥。在通过分泌途径的进一步运输期间, 添加了13个N-连接和10个O-连接的碳水化合物侧链 (Canis et al. (2010) Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8:

137-145;Canis et al.(2012) The Biochemical Journal,447:217-228)。更重要的是,VWF二聚体通过N-末端二硫桥多聚化,741个氨基酸长度的前肽在晚期高尔基体中被酶PACE/弗林蛋白酶切割掉。前肽以及VWF的高分子量多聚体(VWF-HMWM)存储在 内皮细胞的 怀布尔-帕拉德小体内或血小板的 α -颗粒中。

[0011] 一旦分泌到血浆中,蛋白酶ADAMTS13在VWF的A1结构域内切割VWF。因此,血浆VWF由从500kDa的单个二聚体到由多达20多个分子量超过10,000kDa的二聚体组成的多聚体的全范围的多聚体组成。据此VWF-HMWM具有最强的止血活性,其可以在瑞斯托菌素辅因子活性(VWF:RCO)中测定。VWF:RCO/VWF抗原的比例越高,高分子量多聚体的相对量越高。

[0012] VWF中的缺陷是血管性血友病(VWD)的原因,其特征在于具有或多或少明显的出血表型。3型VWD是VWF完全缺失的最严重形式,1型VWD涉及VWF的定量损失,其表型可能非常轻微。2型VWD涉及VWF的定性缺陷,可能与3型VWD一样严重。2型VWD具有许多形式,其中一些与高分子量多聚体的损失或减少有关。2a型Von WWD的特征在于中间和大型多聚体的损失。2B型VWD的特征在于最高分子量多聚体的损失。

[0013] VWD是人中最常见的遗传性出血性疾病,可以通过用含有血浆或重组来源的VWF的浓缩物的替代疗法来治疗。

[0014] 在血浆中,FVIII以高亲和力结合VWF,其保护其免于过早的分解代谢,因此,除了其在初期止血中的作用外,起到调节FVIII血浆水平的关键作用,因此也是控制第二期止血的核心因素。结合VWF的非活化FVIII的半衰期在血浆中约为12至14小时。在3型血管性血友病中,不存在或几乎不存在VWF,FVIII的半衰期仅为约6小时,由于FVIII的浓度降低,导致这种患者的轻度至中度血友病A的症状。VWF对FVIII的稳定作用也已经用于帮助在CHO细胞中重组表达FVIII(Kaufman et al.1989,Mol Cell Biol)。

[0015] 存在增加VWF、FVIII或这两个因子的半衰期的产品和方法的需要。

[0016] 发明概述

[0017] 在分开的发明中,已经发现VWF单体强烈结合到钙型凝集素结构域家族10成员A(CLEC10A)(其为存在于巨噬细胞上的受体蛋白)。特别是可以证明,CLEC10A在VWF清除中起关键作用。在本发明中,还发现存在于VWF上的O-连接的聚糖位点2298与CLEC10A相互作用。因此,本发明提供在位置2298缺乏O-连接糖基化的经修饰的VWF分子,以延长体内VWF分子的半衰期。

[0018] 因此,本发明涉及在项目[1]至[21]中定义的主题:

[0019] [1]能够结合因子VIII的血管性血友病因子(VWF)分子,其包含在氨基酸位置2298缺少O-糖基化位点的C1结构域。优选地,VWF分子不是鼠的。更优选地,VWF分子是人的。

[0020] [2]根据项目[1]的VWF分子,其中存在于天然VWF中位置2298的O-糖基化位点已经通过缺失或置换VWF氨基酸序列的位置2292至2303的一个或多个氨基酸而失活。

[0021] [3]根据项目[2]的VWF分子,其中位置2298的苏氨酸已被缺失或被除苏氨酸和丝氨酸之外的氨基酸置换。

[0022] [4]根据项目[3]的VWF分子,其中所述除苏氨酸和丝氨酸之外的氨基酸选自甘氨酸、丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨酸。

- [0023] [5]根据前述任一项的VWF分子,其包含SEQ ID NO:10或11所示的氨基酸序列。
- [0024] [6]根据项目[2]的VWF分子,其中位置2295、2297和2302之一的脯氨酸已被缺失或被不同氨基酸置换。
- [0025] [7]根据前述项目中任一项的VWF分子,其具有比天然血浆衍生的VWF降低的体内清除。
- [0026] [8]VWF的C1结构域,其包含氨基酸位置2298的O-糖基化位点,连接至半衰期延长部分,优选与人白蛋白融合。
- [0027] [9]根据上述项目中任一项的VWF分子,相比于与天然血浆衍生的VWF共同施用的因子VIII的半衰期,所述VWF分子能够增加与所述VWF分子共同施用的因子VIII的半衰期。
- [0028] [10]根据上述任一项的VWF分子,其用于治疗凝血疾病。
- [0029] [11]根据项目[10]的VWF分子,其中所述凝血疾病是血友病A或血管性血友病。
- [0030] [12]根据项目[10]或[11]的VWF分子,其中所述治疗还包括施用因子VIII分子。
- [0031] [13]根据项目[12]的VWF分子,其中所述VWF分子和所述因子VIII分子分别施用。
- [0032] [14]药物组合物,其包含项目[1]至[9]中任一项的VWF分子。
- [0033] [15]药盒,其包含(i)项目[1]至[9]中任一项的VWF分子和(ii)因子VIII分子。
- [0034] [16]根据项目[15]的药盒,其中所述VWF分子和所述因子VIII分子包含在分开的组合物中。
- [0035] [17]药盒,其包含(i)项目[1]至[9]中任一项的VWF分子和(ii)因子VIII分子,用于同时、分开或顺序用于治疗凝血疾病。
- [0036] [18]项目[1]至[9]中任一项的VWF分子用于增加体内VIII因子的半衰期的用途。
- [0037] [19]根据项目[1]至[9]中任一项的VWF分子,其用于延长治疗性治疗中因子VIII的半衰期。
- [0038] [20]体内增加半衰期因子VIII的方法,包括向受试者施用有效量的项目[1]至[9]中任一项的VWF分子。
- [0039] [21]治疗凝血疾病的方法,包括向有需要的患者施用有效量的项目[1]至[9]中任一项的VWF分子。

附图说明

- [0040] 图1:成熟VWF单体的结构域结构、功能结合位点和聚糖位置
- [0041] VWF单体的蛋白质结构显示称为A、C和D结构域的内部同源区域。VWF与具有一系列生物功能的大量配体相互作用。每个成熟VWF单体包含如图所示分布的13个N-连接(向上箭头)和10个O-连接(向下箭头)糖基化位点。给出参与糖苷键的氨基酸的序列号。对VWF成熟亚单位结构的修订注释改编和修改自Zhou et al. (2012) Blood 120 (2): 449-458。
- [0042] 图2:用可溶性CLEC10A孵育胰蛋白酶消化VWF片段后在洗脱液级分中检测到的主要O-聚糖
- [0043] (NeuGc=N-羟乙酰神经氨酸;GlcNAc=N-乙酰葡萄糖胺;Gal=半乳糖;GalNAc=N-乙酰半乳糖胺)
- [0044] 核心2聚糖(A)、携带一个NeuGc残基的核心1聚糖(B)和用二糖GlcNAc β 1,3Gal延长的核心2聚糖(C)被鉴定为存在于洗脱液级分中的主要O-聚糖结构。胰蛋白酶消化VWF片

段与可溶性 CLEC10A孵育后,洗涤和洗脱结合的VWF肽,游离聚糖的 MALDI-TOF-MS分析显示,与CLEC10A孵育前的起始物质相比,聚糖结构A(浓缩因子>40)、B(因子9)和C(因子7)的显著富集。三种显示的O-聚糖占有所有O-聚糖结构的约80%(与结构B相关的40%,而A和C分别占20%)。

[0045] 详述

[0046] 在第一方面,本发明涉及能够结合因子VIII的经修饰的血管性血友病因子(VWF)分子,其包含在氨基酸位置2298缺少O-糖基化位点的C1结构域。

[0047] VWF

[0048] 本文所用的术语“血管性血友病因子”(VWF)包括天然存在的(天然的)VWF,还包括其变体,例如,片段,融合蛋白或缀合物,或其中一个或多个残基已被插入、缺失或被置换但保留天然存在的VWF的生物学活性的序列变体。如果VWF变体保留至少10%,优选至少25%,更优选至少50%,最优选至少75%的野生型VWF的至少一种生物活性,则生物活性在本发明的意义上得到保留。野生型VWF及其变体的生物活性可由本领域技术人员使用瑞斯托菌素辅因子活性的方法(Federici A B et al.2004.Haematologica 89:77-85),VWF与血小板中的糖蛋白复合物Ib-V-IX的GP Ib α 的结合(Sucker et al.2006.Clin Appl Thromb Hemost.12:305-310),胶原结合测定(Kallas&Talpsep.2001. Annals of Hematology 80:466-471),或因因子VIII结合测定(Veyradier et al.(2011)Haemophilia, vol.17,pp 944-951)来测定。

[0049] 编码人天然VWF的基因被转录成9kb的mRNA,其被翻译成2813个氨基酸的前原多肽(pre-propolypeptide),估计分子量为310,000Da。前原肽含有22个氨基酸的信号肽、741个氨基酸的前多肽(pro-polypeptide)(SEQ ID NO:2的氨基酸23-763)和成熟亚单位(SEQ ID NO:2的氨基酸764-2813)。来自N末端的741个氨基酸的前多肽切割导致由2050个氨基酸组成的成熟VWF。人天然VWF前原多肽的氨基酸序列示于SEQ ID NO:2中。除非另有说明,否则本申请中VWF残基的氨基酸编号参考SEQ ID NO:2,即便VWF分子不包含SEQ ID NO:2的所有残基也是如此。除非另有说明,否则本文所用的术语“VWF”是指VWF的成熟形式。

[0050] 天然VWF的前多肽包含多个结构域。可以在文献中找到不同的结构域注释(参见例如Zhou et al.(2012)Blood 120(2):449-458)。在本申请中应用VWF的天然前多肽的以下结构域注释(参见图1):

[0051] D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK

[0052] 参考SEQ ID NO:2,D'结构域由氨基酸764-865组成;D3结构域由氨基酸866-1242组成;并且C1结构域由氨基酸2255-2328组成。

[0053] “经修饰的”VWF分子具有与成熟人天然VWF(SEQ ID NO:2所示氨基酸的氨基酸764-2813)的氨基酸序列不同的氨基酸序列。

[0054] 本发明的经修饰的VWF分子包含在氨基酸位置2298缺少O-糖基化位点的VWF的C1结构域。包含在本发明的经修饰的VWF分子中的C1结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的氨基酸2255-2328具有至少80%,优选至少85%,更优选至少90%,最优选至少95%的序列同一性。

[0055] 在优选的实施方案中,存在于SEQ ID NO:2的氨基酸2255-2328中的一个、两个或

三个(但不是更多个)氨基酸在本发明的经修饰的 VWF分子中包含的C1结构域中被缺失和/或置换。

[0056] 在第一个实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子包含SEQ ID NO:2的氨基酸2255-2328,除了三个氨基酸,其中所述三个氨基酸中的每一个已被缺失或被在SEQ ID NO:2中的相应位置不存在的氨基酸置换。也就是说,本发明的经修饰的VWF分子的C1结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的C1结构域的氨基酸序列的不同之处在于三个(并且不是更多个)氨基酸。

[0057] 在第二个实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子包含SEQ ID NO:2的氨基酸2255-2328,除了两个氨基酸,其中所述两个氨基酸中的每一个已被缺失或被在SEQ ID NO:2中的相应位置不存在的氨基酸置换。也就是说,本发明的经修饰的VWF分子的C1结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的C1结构域的氨基酸序列的不同之处在于两个(并且不是更多个)氨基酸。

[0058] 在第三个实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子包含SEQ ID NO:2的氨基酸2255-2333,除了一个氨基酸,其中所述一个氨基酸已被缺失或被在SEQ ID NO:2中的相应位置不存在的氨基酸置换。也就是说,本发明的经修饰的VWF分子的C1结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:2的C1结构域的氨基酸序列的不同之处在于一个(并且不是更多个)氨基酸。

[0059] 优选地,VWF氨基酸序列的位置2298的O-糖基化位点通过缺失位置2298的苏氨酸或用不同的氨基酸、优选除苏氨酸和丝氨酸之外的氨基酸置换而失活。

[0060] 因此,本发明在另一个实施方案中提供了包含SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的经修饰的VWF分子。在优选的方面,本发明的VWF分子包括:

- [0061] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa不存在;
- [0062] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是甘氨酸;
- [0063] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是丙氨酸;
- [0064] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是精氨酸;
- [0065] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是天冬酰胺;
- [0066] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是天冬氨酸;
- [0067] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是半胱氨酸;
- [0068] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是谷氨酸;
- [0069] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是谷氨酰胺;
- [0070] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是组氨酸;
- [0071] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是异亮氨酸;
- [0072] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是亮氨酸;
- [0073] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是赖氨酸;
- [0074] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是甲硫氨酸;
- [0075] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是苯丙氨酸;
- [0076] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是脯氨酸;
- [0077] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是色氨酸;
- [0078] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是酪氨酸;或者

[0079] -SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列,其中Xaa是缬氨酸。

[0080] 通常,本发明的经修饰的VWF分子还包含D'D3结构域。优选地,经修饰的VWF分子包含SEQ ID NO:2的氨基酸764至1242,或与由SEQ ID NO:2的氨基酸764至1242组成的氨基酸序列具有至少90%,优选至少95%,更优选至少98%的序列同一性的氨基酸序列。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子包含SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列或由SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列组成。在优选的方面,本发明的VWF分子包含或由以下组成:

[0082] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa不存在;

[0083] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是甘氨酸;

[0084] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是丙氨酸;

[0085] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是精氨酸;

[0086] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是天冬酰胺;

[0087] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是天冬氨酸;

[0088] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是半胱氨酸;

[0089] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是谷氨酸;

[0090] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是谷氨酰胺;

[0091] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是组氨酸;

[0092] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是异亮氨酸;

[0093] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是亮氨酸;

[0094] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是赖氨酸;

[0095] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是甲硫氨酸;

[0096] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是苯丙氨酸;

[0097] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是脯氨酸;

[0098] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是色氨酸;

[0099] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是酪氨酸;或者

[0100] -SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列,其中Xaa是缬氨酸。

[0101] 或者,位置2298的O-糖基化位点通过缺失或置换参与由糖基转移酶识别糖基化位点的一个或多个氨基酸而失活。推定的糖基化基序包含VWF的氨基酸2292-2303。在一个实施方案中,位置2295、2297和/或2302的至少一个脯氨酸被缺失或被不同的氨基酸置换。或者,位置2292、2293和/或2303的至少一个苏氨酸缺失或被不同的氨基酸置换。

[0102] 本发明的经修饰的VWF分子能够结合至因子VIII分子,和/或其包含D'结构域和D3结构域(例如SEQ ID NO:3的D'结构域和D3结构域)。优选地,经修饰的VWF分子能够结合人天然因子VIII的成熟形式。在另一个实施方案中,经修饰的VWF分子能够结合由氨基酸序列SEQ ID NO:12组成的单链因子VIII分子。

[0103] 基于先前报道的方法描述(Veyradier et al. (2011) Haemophilia, vol. 17, pp 944-951), VWF与因子VIII的结合可以通过使用市售分布的即用型ELISA试剂盒(Asserachrom VWF:FVIII, Diagnostica Stago, Asnieres, France)来测定。样品用测试试剂盒供应商分别定义的即用型稀释缓冲液稀释。存在于待测试样品中的VWF被预先包被在微量滴定板上的兔抗人VWF多克隆抗体捕获。随后,潜在的内源性FVIII与VWF分离并消

除。在加入与捕获的VWF相互作用的重组FVIII后，与过氧化物酶偶联的小鼠单克隆抗人FVIII抗体与附着的FVIII结合，并且在5分钟的反应时间后用1M硫酸停止随后的底物反应在450nm进行光度测定定量。测试结果通过使用测试试剂盒相关标准进行计算。

[0104] 或者，例如，如Bendetowicz et al. (1998) Blood, vol 92, No 2: pp 529-538所述，可以使用流式细胞计数/平衡结合测定。

[0105] 因子VIII

[0106] 术语“因子VIII”和“FVIII”在本文中同义使用。“FVIII”包括 FVIII的天然等位基因变异，可能存在并发生于从一个个体到另一个个体。使用熟知的生产和纯化方法，FVIII可以是血浆衍生的或重组产生的。糖基化、酪氨酸硫酸化和翻译后修饰的程度和位置可以变化，这取决于所选择的宿主细胞及其生长条件。

[0107] 术语FVIII包括FVIII类似物。本文所用的术语“FVIII类似物”是指与FVIII的野生型氨基酸序列（即由UniProt标识P00451定义的序列）相比，其中一个或多个氨基酸已被置换或缺失的FVIII分子（全长或B结构域截短/缺失或单链FVIII），或对于B结构域截短/缺失的FVIII分子，该氨基酸序列的相应部分。FVIII类似物不是在自然界中发生，而是通过人类操作获得的。根据本发明使用的因子VIII分子也可以是B结构域截短/缺失的FVIII分子，其中剩余的结构域对应于FVIII野生型氨基酸序列的氨基酸编号1-740和1649-2332所示的序列。其他形式的B结构域缺失的FVIII分子在其a3结构域中另外具有部分缺失，这得到单链FVIII分子。

[0108] 因此，这些FVIII分子是在转化的宿主细胞（优选哺乳动物来源）中产生的重组分子。然而，B结构域缺失的FVIII（即三个A-结构域，两个C结构域以及a1, a2和a3区域）中的剩余结构域可能略有不同，例如与各自野生型氨基酸序列（氨基酸1-740和1649-2332）有约1%，2%，3%，4%或5%的氨基酸序列的不同。

[0109] 根据本发明使用的FVIII分子可以是双链FVIII分子或单链FVIII分子。包含在本发明组合物中的FVIII分子也可以是FVIII的生物活性片段，即其中除了B结构域之外的一个或多个结构域已被缺失或截短的FVIII，但其中缺失/截短形式的FVIII分子保留其支持血块形成的能力。可以使用本领域熟知的技术在体外评估FVIII活性。根据本发明的用于测定FVIII活性的优选测试是显色底物测定或一步测定（参见下文）。可以在其余的结构域中引入氨基酸修饰（置换，缺失等），例如以修饰因子VIII与如下的各种其它成分的结合能力：例如，VWF，低密度脂蛋白受体相关蛋白（LPR），各种受体，其他凝血因子，细胞表面等，或为了引入和/或消除糖基化位点等。不消除FVIII活性的其他突变也可以适用于本发明组合物中使用的FVIII分子/类似物。

[0110] FVIII类似物还包括FVIII分子，其中亲本多肽的一个或多个氨基酸残基已被缺失或被其它氨基酸残基置换，和/或其中另外的氨基酸残基已添加到亲本FVIII多肽中。

[0111] 此外，因子VIII分子/类似物可以在例如截短的B结构域中和/或在分子（“FVIII衍生物”）的一个或多个其他结构域中包括其它修饰。这些其它修饰可以是与因子VIII分子缀合的各种分子的形式，例如，聚合物化合物，肽化合物，脂肪酸衍生物等。

[0112] 术语FVIII包括糖基化的FVIII。在本发明的上下文中，术语“糖基化的FVIII”旨在表示其中一个或多个PEG基团已通过多肽的多糖侧链（聚糖）连接到FVIII多肽上的因子VIII分子（包括全长FVIII和B结构域截短/缺失的FVIII）。

[0113] 术语FVIII包括具有保护基或半衰期延长部分的FVIII分子。术语“保护基”/“半衰期延长部分”在本文中被理解为指连接至一个或多个氨基酸位点链功能度(例如-SH,-OH,-COOH,-CONH₂,-NH₂或一种或多种N-和/或O-聚糖结构)的一个或多个化学基团,并且当与许多治疗性蛋白质/肽缀合时可以增加这些蛋白质/肽的体内循环半衰期。保护基/半衰期延长部分的实例包括:生物相容性脂肪酸及其衍生物,羟烷基淀粉(HAS),例如,羟甲基乙基淀粉(HES),聚(Glyx-Sery)_n(高氨基酸聚合物(HAP)),透明质酸(HA),肝素前体(Heparosan)聚合物(HEP),磷酸胆碱基聚合物(PC聚合物),**Fleximer®**聚合物(Mersana Therapeutics,MA,USA),葡聚糖,聚唾液酸(PSA),聚乙二醇(PEG),Fc结构域,转铁蛋白,白蛋白,弹性蛋白样肽,**XTEN®**聚合物(Amunix,CA,USA),白蛋白结合肽,血管性血友病因子片段(vWF片段),羧基末端肽(CTP肽,Prolor Biotech,IL)及其任何组合(参见例如McCormick,C.L.,A.B.Lowe,and N.Ayres, Water-Soluble Polymers,于Encyclopedia of Polymer Science and Technology.2002,John Wiley&Sons,Inc.)。衍生的方式不是关键的,可以从上面内容得到阐明。

[0114] 可以根据本发明使用的FVIII分子包括融合蛋白,其包含与异源氨基酸序列、优选半衰期延长的氨基酸序列融合的FVIII氨基酸序列。优选的融合蛋白是Fc融合蛋白和白蛋白融合蛋白。术语“Fc融合蛋白”在本文中旨在涵盖与可以衍生自任何抗体同种型的Fc结构域融合的FVIII。由于IgG抗体的相对长的循环半衰期,IgG Fc结构域通常是优选的。此外可以修饰Fc结构域以便调节某些效应子功能,例如,补体结合和/或结合某些Fc受体。FVIII与具有结合FcRn受体能力的Fc结构域的融合通常会导致与野生型FVIII的半衰期相比,融合蛋白的循环半衰期延长。因此,用于本发明的FVIII分子也可以是FVIII类似物的衍生物,例如FVIII类似物的融合蛋白,聚乙二醇化或糖基化聚乙二醇化FVIII类似物,或与肝素前体聚合物缀合的FVIII类似物。本文中术语“白蛋白融合蛋白”意在涵盖与白蛋白氨基酸序列或其片段或衍生物融合的FVIII。异源氨基酸序列可以融合到FVIII的N-或C-末端,或者它可以内部插入FVIII氨基酸序列内。异源氨基酸序列可以是WO 2008/077616A1中描述的任何“半衰期延长多肽”,其公开内容通过引用并入本文。

[0115] 用于本发明组合物的FVIII分子的实例包括例如在WO 2010/045568、WO 2009/062100、WO 2010/014708、WO 2008/082669、WO 2007/126808、US 2010/0173831、US 2010/0173830、US 2010/0168391、US 2010/0113365、US 2010/0113364、WO 2003/031464、WO 2009/108806、WO 2010/102886、WO 2010/115866、WO 2011/101242、WO 2011/101284、WO 2011/101277、WO 2011/131510、WO 2012/007324、WO 2011/101267、WO 2013/083858和WO 2004/067566中描述的FVIII分子。

[0116] 可用于本发明组合物中的FVIII分子的实例包括**Advate®**,**Helixate®**,**Kogenate®**,**Xyntha®**的活性成分以及WO 2008/135501、WO 2009/007451中所述的FVIII分子和WO 2004/067566的称为“dBN(64-53)”的构建体(SEQ ID NO: 12)。

[0117] 治疗凝血疾病

[0118] 本发明的经修饰的VWF分子可用于治疗凝血疾病,包括但不限于血友病和血管性血友病。优选地,该疾病是血友病A或血管性血友病。

[0119] 术语“血友病A”是指功能性凝血FVIII缺乏症,其通常是遗传的。

[0120] 术语“血管性血友病”(VWD)是指与VWF的定性或定量缺乏有关的凝血异常症。

[0121] 疾病的治疗包括已经在任何临床阶段或症状时诊断为具有任何形式的疾病的患者的治疗;疾病的症状或指征的发作或进展或加重或恶化的延缓;和/或预防和/或降低疾病的严重性。

[0122] 向其施用经修饰的VWF分子的“受试者”或“患者”可以是哺乳动物,例如非灵长类(例如牛、猪、马、猫、狗、大鼠等)或灵长类(例如猴或人)。在某些方面,人是儿科患者。在其他方面,人是成年患者。

[0123] 本文描述了包含本发明的经修饰的VWF分子和任选的一种或多种另外的治疗剂如下述第二治疗剂的组合物。组合物通常作为包括药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。该组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用于患者的所需方法)。

[0124] 本发明的经修饰的VWF分子可以通过各种途径施用于患者,例如经口、经皮、皮下、鼻内、静脉内、肌内、鞘内、外用或局部。任何给定情况下最合适的给药途径将取决于待施用的具体分子、受试者、疾病的性质和严重程度以及受试者的身体状况。通常,静脉内施用本发明的经修饰的VWF分子。

[0125] 在典型的实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子以足以允许以0.5mg/kg至20mg/kg静脉内施用的浓度存在于药物组合物中。在一些实施方案中,适用于本文所述的组合物和方法的抗体浓度包括但不限于0.5mg/kg、0.75mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、2.5mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg、15mg/kg、16mg/kg、17mg/kg、18mg/kg、19mg/kg、20mg/kg,或者在任何上述值之间的范围,例如1mg/kg至10mg/kg、5mg/kg至15mg/kg或10mg/kg至18mg/kg。

[0126] 本发明的经修饰的VWF分子的有效剂量可以为每个单次(例如,推注)施用、多次施用或连续施用约0.001至约750mg/kg,或达到血清浓度为每个单次(例如,推注)施用、多次施用或连续施用0.01-5000μg/ml血清浓度或其中根据所治疗的病症、施用途径和受试者的年龄、体重和状况的任何有效范围或值。在某些实施方案中,每个剂量可以为每千克体重约0.5mg至约50mg或每千克体重约3mg至约30mg。本发明的经修饰的VWF分子可以配制为水溶液。

[0127] 药物组合物可以方便地以每剂量含有预定量的本发明的经修饰的VWF分子的单位剂量形式存在。这样的单位可以含有0.5mg至5g,例如但不限于1mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、100mg、200mg、300mg、400mg、500mg、750mg、1000mg,或者在任何上述值之间的范围,例如10mg至1000mg、20mg至50mg或30mg至300mg。药学上可接受的载体可以取决于例如待治疗的病症或施用途径的多种形式。

[0128] 用本发明的经修饰的VWF分子确定有效剂量、总剂量数和治疗长度完全在本领域技术人员的能力范围内,并且可以使用标准剂量递增研究来确定。

[0129] 可以通过将具有所需纯度的经修饰的VWF分子与任选的本领域通常使用的药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(所有这些在本文中称为“载体”),即缓冲剂、稳定剂、防腐剂、等渗剂、非离子洗涤剂、抗氧化剂和其它各种添加剂混合制备适用于本文所述方法的本发明的经修饰的VWF分子的治疗剂型,作为冻干制剂或水溶液储存。参见 Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition (Osol, ed. 1980)。这样的添加剂所用的剂量

和浓度必须对接受者无毒。

[0130] 缓冲剂有助于将pH值保持在接近生理条件的范围内。它们可以以约2mM至约50mM的浓度存在。合适的缓冲剂包括有机酸和无机酸及其盐,例如柠檬酸盐缓冲液(例如,柠檬酸一钠-柠檬酸二钠混合物,柠檬酸-柠檬酸三钠混合物,柠檬酸-柠檬酸单钠柠檬酸盐混合物等),琥珀酸盐缓冲剂(例如琥珀酸-琥珀酸一钠混合物,琥珀酸-氢氧化钠混合物,琥珀酸-琥珀酸二钠混合物等),酒石酸缓冲剂(例如酒石酸-酒石酸钠混合物,酒石酸-酒石酸钾混合物,酒石酸-氢氧化钠混合物等),富马酸盐缓冲剂(例如富马酸-富马酸一钠混合物,富马酸-富马酸二钠混合物,富马酸一钠-富马酸二钠混合物等),葡萄糖酸盐缓冲剂(例如葡萄糖酸-葡萄糖酸钠混合物,葡萄糖酸-氢氧化钠混合物,葡萄糖酸-葡萄糖酸钾混合物等),草酸盐缓冲剂(例如草酸-草酸钠混合物,草酸-氢氧化钠混合物,草酸-草酸钾混合物等),乳酸盐缓冲剂(例如乳酸-乳酸钠混合物,乳酸-氢氧化钠混合物,乳酸-乳酸钾混合物等)和乙酸盐缓冲剂(例如乙酸-乙酸钠混合物,乙酸-氢氧化钠混合物等)。此外,可以使用磷酸盐缓冲剂、组氨酸缓冲剂和三甲胺盐如Tris。

[0131] 可以加入防腐剂以延迟微生物生长,并且可以以0.2%-1% (w/v) 的量加入防腐剂。合适的防腐剂包括苯酚,苄醇,间甲酚,对羟基苯甲酸甲酯,对羟基苯甲酸丙酯,十八烷基二甲基苄基氯化铵,苄基卤化铵(例如氯化物、溴化物和碘化物),六氯化铵和对羟基苯甲酸烷基酯如 对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯,儿茶酚,间苯二酚,环己醇和 3-戊醇。可以加入有时称为“稳定剂”的等渗剂以确保液体组合物的等渗性,并且等渗剂包括多羟基糖醇,优选三羟基或更高的糖醇,例如甘油,赤藓醇,阿糖醇,木糖醇,山梨醇和甘露醇。稳定剂是指广泛类型的赋形剂,其功能范围可以从填充剂到添加剂,所述添加剂溶解治疗剂或有助于防止变性或粘附到容器壁。典型的稳定剂可以是多羟基糖醇(上面列举的);氨基酸如精氨酸,赖氨酸,甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,丙氨酸,鸟氨酸,L-亮氨酸,2-苯丙氨酸,谷氨酸,苏氨酸等,有机糖或糖醇如乳糖,海藻糖,水苏糖,甘露醇,山梨糖醇,木糖醇,核糖醇,肌醇,半乳糖醇,甘油等,包括环多醇如肌醇;聚乙二醇;氨基酸聚合物;含硫还原剂如尿素,谷胱甘肽,硫辛酸,巯基乙酸钠,硫代甘油, α -巯代甘油和硫代硫酸钠;低分子量多肽(例如10个或更少的肽);蛋白质如人血清白蛋白,牛血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;单糖如木糖,甘露糖,果糖,葡萄糖;二糖如乳糖,麦芽糖,蔗糖和三糖如棉子糖;和多糖如葡聚糖。稳定剂可以以活性蛋白质重量的0.1至10,000重量/份存在。

[0132] 可以添加非离子表面活性剂或洗涤剂(也称为“润湿剂”)以帮助溶解治疗剂以及保护治疗性蛋白质免受搅动诱导的聚集,这也允许制剂暴露于剪切表面应力而不引起蛋白质的变性。合适的非离子表面活性剂包括聚山梨醇酯(20、80等),泊洛沙姆(184、188等),普朗尼克多元醇,聚氧乙烯脱水山梨糖醇单醚(**TWEEN®**-20、**TWEEN®**-80等)。非离子表面活性剂可以以约0.05mg/ml至约1.0mg/ml或约0.07mg/ml至约0.2mg/ml的范围存在。

[0133] 附加的其它赋形剂包括填充剂(例如淀粉),螯合剂(例如EDTA),抗氧化剂(例如抗坏血酸,甲硫氨酸,维生素E)和助溶剂。

[0134] 除了本发明的经修饰的VWF分子之外,本文的制剂还可以含有第二治疗剂。合适的第二治疗剂的实例提供如下。

[0135] 给药方案可以根据许多临床因素(包括疾病的类型、疾病的严重程度和患者对本发明的经修饰的VWF分子的敏感性)从每月一次到每天 发生变化。在具体实施方案中,本发明的经修饰的VWF分子以下面的 方式施用:每天,每周两次,每周三次,每5天,每10天,每两周, 每三周,每四周一次或每月一次,或在上述值中的任意两个值之间的任 何范围,例如从每四个星期到每个月,从每10天到每两周,或每周两 到三次等。

[0136] 所施用的本发明的经修饰的VWF分子的剂量将根据具体的经修饰 的VWF分子、受试者以及疾病的性质和严重程度、受试者的身体状况、治疗方案(例如,是否使用第二治疗剂)和所选择的施用途径;可以由 本领域技术人员容易地确定合适的剂量。

[0137] 本领域技术人员将认识到,本发明的经修饰的VWF分子的单个剂 量的最佳量和间隔将由所治疗病症的性质和程度、施用形式、途径和部 位以及受治疗的特定受试者的年龄和状况确定,以及医生将最终确定要 使用的合适的剂量。每当合适时,该剂量可以重复。如果发展出副作用, 剂量的量和/或频率可以根据正常的临床实践改变或减少。

[0138] 联合治疗

[0139] 优选地,用本发明的经修饰的VWF分子治疗的患者也用凝血疾病 的常规疗法进行治疗。例如,患有血友病的患者通常也用凝血因子VIII (因子VIII)进行治疗。

[0140] 根据本发明使用的组合物中因子VIII的浓度通常在 10-10,000IU/mL的范围内。在不同的实施方案中,本发明组合物中FVIII 分子的浓度在10-8,000IU/mL、或10-5,000IU/mL、或20-3,000IU/mL、或50-1,500IU/mL的范围内或者是3,000IU/mL、或2,500IU/mL、或 2,000IU/mL、或1,500IU/mL、或1,200IU/mL、1,000IU/mL、或800 IU/mL、或600IU/mL、或500IU/mL、或400IU/mL、或300IU/mL、或250IU/mL、或200IU/mL、或150IU/mL、或100IU/mL。

[0141] “国际单位”或“IU”是通过FVIII活性测定测量的FVIII的凝血 活性(效力)的量度单位,所述FVIII活性测定例如使用针对在“IU” 中校准的国际标准制剂的标准校准的一步凝血测定或显色底物FVIII活 性测定。一步凝血测定是本领域已知的,例如在N Lee, Martin L,et al., An Effect of Predilution on Potency Assays of FVIII Concentrates, Thrombosis Research(Pergamon Press Ltd.) 30,511-519(1983)中描述的。一步测定的原理:测试作为激活的部分促凝血酶原激酶时间(aPTT) -测定的修改版本进行:血浆与磷脂和表面活化剂的孵育导致内源性凝血 系统因子的激活。加入钙离子会引发凝血级联。测定形成可测量的纤维 蛋白凝块的时间。该测定在因子VIII缺乏血浆的存在下进行。缺乏血 浆的凝血能力由待测样品中包含的凝血因子VIII恢复。凝血时间的缩 短与样品中存在的因子VIII的量成正比。通过与国际单位中具有已知 因子VIII活性的标准制剂直接比较来定量凝血因子VIII的活性。

[0142] 另一个标准测定是显色底物测定。显色底物测定可以商业购买,例 如coamatic FVIII测试试剂盒(Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA V.le Monza 338-20128Milano,Italy)。显色测定的原 理:在钙和磷脂存在下,因子X被因子IXa激活成因子Xa。因子VIIIa 作为辅因子刺激该反应。FVIIIa由反应混合物中的少量凝血酶从待测样 品中的FVIII形成。当使用最佳浓度的Ca²⁺、磷脂和因子IXa和过量 的因子X时,因子X的活化与因子VIII的效力成正比。活化的因子X 从显色底物S-2765中释放发色团pNA。因此,在405nm处测量的pNA 的释放与所形成的FXa的量成比例,因此也与样品的因子VIII活性成

比例。

[0143] 在一个实施方案中,治疗包括将本发明的经修饰的VWF分子和因子VIII施用于患有血友病、优选血友病A的患者。

[0144] 在另一个实施方案中,治疗包括将本发明的经修饰的VWF分子和能够结合CLEC10A的化合物施用于患有血友病、优选血友病A的患者。

[0145] 在另一个实施方案中,治疗包括将本发明的经修饰的VWF分子和因子VIII分子和能够结合CLEC10A的化合物施用于患有VWD或血友病、优选血友病A的患者。

[0146] 在一个具体实施方案中,同时施用本发明的经修饰的VWF分子和第二治疗剂(例如因子VIII和/或能结合CLEC10A的化合物)。在另一个实施方案中,分别施用本发明的经修饰的VWF分子和第二治疗剂(例如因子VIII和/或能结合CLEC10A的化合物)。施用本发明的经修饰的VWF分子和第二治疗剂(例如因子VIII和/或能够结合CLEC10A的化合物)之间的时间没有特别限制。优选本发明的经修饰的VWF分子在能够结合CLEC10A的化合物之前施用。

[0147] CLEC10A

[0148] CLEC10A(也称为巨噬细胞Gal型凝集素)是CLEC家族的人II型跨膜受体蛋白。其他同义词是C型凝集素超家族成员14,巨噬细胞凝集素2和CD301。CLEC10A与肝脏ASGPR蛋白密切相关,但由中等单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞表达。如本文所用,术语“CLEC10A”是指具有或由在标识Q8IUN9-1、Q8IUN9-2和Q8IUN9-3之下的UniProt数据库中显示的氨基酸序列组成的人蛋白质。最优选地,CLEC10A包含在标识Q8IUN9-1下的UniProt数据库中显示的氨基酸序列或由其组成。

[0149] 能够结合CLEC10A的化合物

[0150] 能够结合CLEC10A的化合物(以下称为“该化合物”)的类型或类别没有特别限定。然而,优选地,该化合物是肽或多肽,最优选地,该化合物是抗体或其片段。

[0151] 本文所用的术语“抗体”是指与特定抗原结合或具有免疫反应性的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆、单克隆、遗传工程化和其他修饰形式的抗体,包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、异源缀合抗体(例如,双特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)、抗体的单域抗体(纳米抗体)和抗原结合片段,包括例如Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv、rIgG和scFv片段。此外,除非另有说明,否则术语“单克隆抗体”(mAb)意在包括完整分子以及抗体片段(例如Fab和F(ab')₂片段),其能够结合蛋白质。Fab和F(ab')₂片段缺乏完整抗体的Fc片段,从动物或植物的循环中更快地清除,并且可能具有比完整抗体更少的非特异性组织结合(Wahl et al,1983,J.Nucl.Med.24:316)。

[0152] 在本发明使用的抗体能够结合CLEC10A的至少一种变体。在其它实施方案中,抗体能够结合CLEC10A的细胞外结构域,例如结合CLEC10A的氨基酸序列的氨基酸61-316内的表位。优选地,本发明的抗体与CLEC10A的凝集素结合位点结合。

[0153] 还优选抗体特异性结合CLEC10A。在一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合以下所有受体:ASGPR1、COLEC12、CLEC4F、CLEC4M、SCARA5和MMR。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合ASGPR1(UniProt标识:P07306)。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合COLEC12(UniProt标识:Q5KU26)。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合CLEC4F(UniProt标识:Q8N1N0)。在另一个

实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合CLEC4M (UniProt标识:Q9H2X3)。在另一个实施方案中,抗体能够结合 CLEC10A,但不能结合SCARA5 (UniProt标识:Q6ZMJ2)。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但不能结合MMR (UniProt 标识:P22897)。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A,但 不能结合以下受体中任何一种:ASGPR1、COLEC12、CLEC4F、CLEC4M、SCARA5和MMR。

[0154] 在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A的至少一种鼠直系同源物。在该实施方案中,抗体可能能够结合MGL1、MGL2或MGL1 和MGL2两者。抗体可能能够结合具有或由UniProt标识P49300中定义的氨基酸序列组成的蛋白质。抗体可能能够结合具有或由UniProt标识F8WHB7中定义的氨基酸序列组成的蛋白质。抗体可能能够结合具有或由UniProt标识Q8JZN1中定义的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0155] 在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A的大鼠直系同源物。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A的兔直系同源物。在另一个实施方案中,抗体能够结合CLEC10A的食蟹猴(*macaca fascicularis*)直系同源物和/或普通猕猴(*macaca mulatta*)直系同源物。

[0156] 由CLEC10A和抗体形成的复合物的解离常数 K_D 优选小于100nM,更优选小于10nM,最优选小于5nM。通常, K_D 范围为约10pM至约 100nM,或约100pM至约10nM,或约500pM至约5nM。

[0157] 优选地,在本发明中使用的抗体是单克隆抗体。本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆(包括任何真核、原核或噬菌体克隆)的抗体,并且不是产生其的方法。单克隆抗体可以使用本领域已知的多种技术制备,包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。(Harlow and Lane, "Antibodies, A Laboratory Manual" CSH Press 1988, Cold Spring Harbor N.Y.)。

[0158] 在其他实施方案中,包括在人中体内使用抗CLEC10A抗体,可以使用嵌合、灵长类、人源化或人抗体。在优选的实施方案中,抗体是人抗体或人源化抗体,更优选单克隆人抗体或单克隆人源化抗体。

[0159] 本文所用的术语“嵌合”抗体是指具有衍生自非人免疫球蛋白(例如大鼠或小鼠抗体)的可变序列和通常选自人免疫球蛋白模板的人免疫球蛋白恒定区的抗体。嵌合抗体的制备方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison,1985,Science 229(4719):1202-7; Oi et al.,1986, BioTechniques 4:214-221; Gillies et al.,1985, J.Immunol.Methods 125:191-202; 美国专利号5,807,715、4,816,567和4,816397,其全部内容通过引用并入本文。

[0160] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他目标结合子序列),其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。通常,人源化抗体将包含基本上全部的至少一个、通常为两个可变结构域,其中所有或基本上所有的对应于非人免疫球蛋白的CDR区域和全部或基本上所有的FR区域是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体还可以包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是所选择的人免疫球蛋白模板的一部分。人源化是制备嵌合抗体的技术,其中人可变结构域的一个或多个氨基酸或部分已经被来自非人物种的相应序列所置换。人源化抗体是在非人物种中产生的结合期望的抗原的抗体分子,其具有来自非人物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架(FR)区域。通常,人框架区中

的框架残基将被来自CDR供体抗体的相应残基置换,以改变(优选改善)抗原结合。这些框架置换通过本领域熟知的方法来鉴定,例如,通过CDR和框架残基的相互作用的建模来鉴定对于抗原结合重要的框架残基,以及通过序列比较来鉴定在特定位置处的异常框架残基。参见例如Riechmann et al.,1988,Nature 332:323-7和Queen et al.的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370(其各自的全部内容通过引用并入本文)。抗体可以使用本领域已知的各种技术进行人源化,包括例如CDR移植(EP239400;PCT公开W0 91/09967;美国专利号5,225,539、5,530,101和5,585,089)、镶饰(veneering)或重塑(resurfacing)(EP592106;EP519596;Padlan,1991,Mol.Immunol,28:489-498;Studnicka et al,1994,Prot.Eng.7:805-814;Roguska et al,1994,Proc.Natl.Acad.Sci. 91:969-973)和链置换(chain shuffling)(美国专利号5,565,332),所有这些的全部内容通过引用并入本文。

[0161] 在一些实施方案中,如Queen et al.的美国专利号5,530,101、5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370(其各自的全部内容通过引用并入本文)中所述制备人源化抗体。

[0162] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体是人抗体。完全“人”抗CLEC10A抗体对于人类患者的治疗性治疗可能是期望的。如本文所用,“人抗体”包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从一种或多种人免疫球蛋白转基因并且不表达内源性免疫球蛋白的动物分离的抗体。可以通过本领域已知的多种方法制备人抗体,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上文所述噬菌体展示方法。参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和PCT公开W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735和W0 91/10741,其各自的全部内容通过引用并入本文。也可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体。参见例如PCT公开W0 98/24893、W0 92/01047、W0 96/34096、W0 96/33735;美国专利号5,413,923、5,625,126;5,633,425、5,569,825、5,661,016、5,545,806、5,814,318、5,885,793、5,916,771和5,939,598,其全部内容通过引用并入本文。可以使用称为“指导的选择(guided selection)”的技术来产生识别所选表位的完全人抗体。在该方法中,选择的非人单克隆抗体(例如小鼠抗体)用于指导识别相同表位的完全人抗体的选择(Jespersen et al,1988, Biotechnology 12:899-903)。

[0163] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体是灵长类抗体。术语“灵长类抗体”是指包含猴可变区和人恒定区的抗体。产生灵长类抗体的方法是本领域已知的。参见例如美国专利号5,658,570、5,681,722和5,693,780,其全部内容通过引用并入本文。

[0164] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体是衍生化抗体。例如但不限于,已经通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、已知的保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解切割、与细胞配体或其它蛋白质的连接进行了修饰的衍生化抗体(参见下文关于抗体缀合物的讨论)等。许多化学修饰中的任何一种可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学切割、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,衍生物可以含有一种或多种非经典氨基酸。

[0165] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体或其片段可以是这样的抗体或抗体片段,其序列已被修饰以相对于相应的野生型序列减少至少一个恒定区介导的生物效应子功能。

为了修饰抗CLEC10A抗体,使得其表现出与Fc受体的结合降低,抗体的免疫球蛋白恒定区片段可以在Fc受体(FcR)相互作用所需的特定区域突变(参见例如,Canfield and Morrison,1991,J.Exp.Med.173:1483-1491;和Lund et al,1991,J. Immunol.147:2657-2662)。抗体的FcR结合能力的降低还可以降低依赖于FcR相互作用的其它效应子功能,例如调理作用和吞噬作用以及抗原依赖性细胞毒性。

[0166] 另一方面,抗CLEC10A抗体或其片段可以是已被修饰以增加或降低其与胎儿Fc受体FcRn的结合亲和力的抗体或抗体片段。为了改变对FcRn的结合亲和力,抗体的免疫球蛋白恒定区片段可以在FcRn相互作用所必需的特定区域突变(参见例如WO 2005/123780)。增加对FcRn的结合亲和力应该增加抗体的血清半衰期,降低对FcRn的结合亲和力应相反地降低抗体的血清半衰期。在具体实施方案中,抗CLEC10A抗体是IgG类的抗体,其中重链恒定区的氨基酸残基250、314和428中的至少一个被用未修饰抗体中存在的氨基酸残基不同的氨基酸残基置换。IgG类抗体包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的抗体。置换可以在单独的位置250、314或428或其任何组合中进行,例如在位置250和428,或在位置250和314,或在位置314和428,或在位置250、314和428,其中在位置250和428作为优选组合。对于每个位置,置换氨基酸可以是与未修饰抗体的该位置中存在的氨基酸残基不同的任何氨基酸残基。对于位置250,置换氨基酸残基可以是除苏氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸,半胱氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,苯丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,赖氨酸,亮氨酸,甲硫氨酸,天冬酰胺,脯氨酸,谷氨酰胺,精氨酸,丝氨酸,缬氨酸,色氨酸或酪氨酸。对于位置314,置换氨基酸残基可以是除亮氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸,半胱氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,苯丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,赖氨酸,甲硫氨酸,天冬酰胺,脯氨酸,谷氨酰胺,精氨酸,丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,色氨酸或酪氨酸。对于位置428,置换氨基酸残基可以是除甲硫氨酸以外的任何氨基酸残基,包括但不限于丙氨酸,半胱氨酸,天冬氨酸,谷氨酸,苯丙氨酸,甘氨酸,组氨酸,异亮氨酸,赖氨酸,亮氨酸,天冬酰胺,脯氨酸,谷氨酰胺,精氨酸,丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,色氨酸或酪氨酸。WO 2005/123780的表1中鉴定了合适的氨基酸置换的具体组合,该表全部内容通过引用并入本文。另见Hinton et al的美国专利号7,217,797、7,361,740、7,365,168和7,217,798,其全部内容通过引用并入本文。

[0167] 在另一方面,抗CLEC10A抗体具有插入一个或多个其高变区的一个或多个氨基酸,例如US 2007/0280931中所述。

[0168] 抗体缀合物

[0169] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体是通过例如任何类型的分子共价连接到抗体而被修饰的抗体缀合物,使得共价连接不干扰与CLEC10A的结合。将效应子部分与抗体缀合的技术在本领域中是熟知的(参见例如Hellstrom等人,Controlled Drug Delivery, 2nd Ed., 于pp. 623-53 (Robinson等人,eds.,1987));Thorpe et al,1982,Immunol.Rev. 62:119-58和Dubowchik等人,1999,Pharmacology and Therapeutics 83:67-123)。

[0170] 在一个实例中,抗体或其片段通过共价键(例如,肽键)在任选地N末端或C末端融合到另一种蛋白质(或其部分;优选在蛋白质的至少10、20或50个氨基酸部分)的氨基酸序列。优选地,抗体(或其片段)在抗体恒定结构域的N末端与另一个蛋白质连接。可以使用重组DNA程序来产生这样的融合物(例如如WO 86/01533和EP0392745中所述)。在另一个实

例中,效应子分子可以增加体内的半衰期。这种类型的合适的效应子分子的实例包括聚合物、白蛋白、白蛋白结合蛋白或白蛋白结合化合物(例如在W0 2005/117984中描述的那些)。

[0171] 在一些实施方案中,抗CLEC10A抗体可以连接到聚(乙二醇)(PEG)部分上。例如,如果抗体是抗体片段,PEG部分可以通过位于抗体片段中的任何可用的氨基酸侧链或末端氨基酸官能团(例如任何游离氨基、亚氨基、巯基、羟基或羧基基团)连接。这样的氨基酸可以天然存在于抗体片段中,或者可以使用重组DNA方法工程改造到片段中。参见例如美国专利5,219,996。可以使用多个位点来连接两个或更多个PEG分子。优选地,PEG部分通过位于抗体片段中的至少一个半胱氨酸残基的巯基共价连接。当巯基用作连接点时,可以使用适当活化的效应子部分,例如巯基选择性衍生物如马来酰亚胺和半胱氨酸衍生物。

[0172] 在另一个实例中,抗CLEC10A抗体缀合物是经修饰的Fab'片段,其是PEG化的,即具有共价连接到其上的PEG(聚(乙二醇))(例如根据EP0948544中公开的方法)。另见Poly(ethyleneglycol)Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications, (J.Milton Harris(ed.), Plenum Press, New York, 1992); Poly(ethyleneglycol)Chemistry and Biological Applications, (J.Milton Harris and S.Zalipsky, eds., American Chemical Society, Washington D.C, 1997); 和Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, (M.Aslam and A.Dent, eds., Grove Publishers, New York, 1998); 和Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 531-545。

[0173] 可用于阻断CLEC10A受体的另一个实施方案是VWF-C1结构域,其包含位置2298的O-糖基化位点,其连接到半衰期延长部分例如与白蛋白融合,优选通过接头连接。优选的实施方案是具有如SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列的融合蛋白。

[0174] 试剂盒

[0175] 本发明的另一方面是药盒,其包含(i)如上文所定义的经修饰的VWF分子和(ii)选自因子VIII、能够结合CLEC10A的化合物(优选抗体)及其组合的多肽。优选地,经修饰的VWF分子和多肽包含在分开的组合物中。

[0176] 本发明的另一方面是药盒,其包含(i)如上文所定义的经修饰的VWF分子和(ii)选自因子VIII、能够结合CLEC10A的化合物(优选抗体)及其组合的多肽,用于同时、分开或顺序用于治疗凝血疾病。

[0177] 本发明的另一方面是如上所定义的修饰的VWF分子用于增加半衰期或降低因子VIII的清除的用途。

[0178] 术语“半衰期”是指从体内循环中消除一半的蛋白质所需的时间。可以测定曲线下面积(AUC)以评估清除效果。清除的减少导致较高的AUC值和半衰期的增加。

[0179] 本发明的另一方面是上文定义的化合物(优选抗体)用于增加因子VIII的半衰期、优选在治疗性治疗中的用途。

[0180] 本发明还涉及在体内增加因子VIII的半衰期或降低因子VIII的清除的方法,包括向受试者施用有效量的如上文所定义的经修饰的VWF分子。

[0181] 本发明的另一方面是治疗凝血疾病的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的如上文所定义的经修饰的VWF分子。

[0182] 另一方面是如上定义的经修饰的VWF分子在血友病A治疗中降低 施用FVIII的频率的用途。静脉内或皮下施用FVIII的频率可以减少到 每周两次。或者,静脉内或皮下施用FVIII的频率可以减少到每周一次。

[0183] 另一方面是如上定义的经修饰的VWF分子在VWD治疗中降低施 用VWF的频率的用途。静脉内或皮下施用VWF的频率可以减少到每 周两次。或者,静脉内或皮下施用VWF的频率可以减少到每周一次。即,本发明的经修饰的VWF分子每周施用一次或两次。

[0184] 另一方面是如上定义的经修饰的VWF分子用于降低在血友病A的 治疗中待施用的剂量FVIII的用途。

[0185] 另一方面是如上定义的经修饰的VWF分子用于降低在VWD治疗 中待施用的剂量VWF的用途。

[0186] 下表总结了序列表中显示的核苷酸和氨基酸序列:

[0187]

SEQ ID NO:	备注
1	编码人天然VWF前原肽的DNA序列
2	人天然VWF前原肽的氨基酸序列引物
3	引物
4	引物
5	引物
6	引物
7	引物
8	引物
9	通过Gly-Ser接头与人白蛋白融合的人VWF的C1结构域的氨基酸序列
10	具有T2298突变的经修饰的VWF的C1结构域
11	具有T2298突变的经修饰VWF的成熟形式
12	单链因子VIII分子

实施例

[0188] 实施例1:存在于VWF上的特异性糖基化结构被鉴定为与 CLEC10A进行相互作用, 以及存在于VWF上O-连接的糖基位点2298

[0189] 为了鉴定CLEC10A在人VWF上的结合位点,VWF的胰蛋白酶 消化片段与可溶性CLEC10A一起温育。洗涤后,结合的蛋白质片段分 别在pH 11和使用含有100mM GalNAc的溶液洗脱。基于SPR预实验 选择洗脱条件,所述SPR预实验指示所有与CLEC10A结合的组分在 规定的条件下完全洗脱。随后,对各洗脱液级分进行MS分析。

[0190] 游离的N-和O-聚糖被全甲基化并通过MALDI-TOF-MS分析表征。得到的数据表明, CLEC10A在识别N-和O-聚糖时显著不同。与用作 起始物质的VWF片段(聚糖分析观察到18% 非唾液酸化O-聚糖的存 在)相比,两种洗脱液级分均显示非唾液酸化O-聚糖的强烈富集, 而 含有一个或多个NeuAc残基的唾液酸化O-聚糖以及不管唾液酸化状态 如何的N-聚糖都 极度降低。不同的洗脱条件(碱性对GalNAc) 导致仅 略微不同的聚糖模式。可以在洗脱液级 分中鉴定出三种主要的O-糖基 化结构,其代表检测到的所有O-聚糖结构的约80%。各自的结构如图 2所示。通过MALDI-TOF-MS分析鉴定了核心2聚糖(浓缩因子大于 40)、携带一个

NeuGc残基的核心1聚糖(浓缩因子约9)和用二糖 GlcNAc β 1,3Gal延长的核心2聚糖(浓缩因子约为7)的富集。括号中提及的浓缩因子定量描述了与CLEC10A孵育前的起始物质相比,各自聚糖的富集。

[0191] 除了前述的研究之外,在VWF片段去糖基化后,通过纳米液相色谱电喷雾离子化MS/MS进行分析。在两种不同洗脱液级分中的每一种中检测到的肽模式是可比的,因此与所用的洗脱条件无关。结果,洗脱后清楚地鉴定了含有苏氨酸2298的VWF肽。基于获得的分析数据,可以排除其他糖基化VWF片段参与CLEC10A结合。因此,0-连接的聚糖位点T2298最有可能含有未被唾液酸化的聚糖结构,因此与CLEC10A相互作用。此外,存在于VWF上的该糖基化位点被专门鉴定为CLEC10A的主要相互作用配偶体,因此被认为是完全负责受体相互作用。所有其他VWF聚糖位点似乎不参与CLEC10A结合。

[0192] 总之,在从可溶性CLEC10A中洗脱胰蛋白酶消化的VWF片段后,MS分析表明,发现非唾液酸化0-聚糖结合CLEC10A,而唾液酸化0-聚糖以及无论唾液酸化状态如何的N-聚糖不与CLEC10A发生显著相互作用。存在于VWF上的三个主要0-糖基化结构(核心2聚糖、携带一个NeuGc残基的核心1聚糖和用二糖GlcNAc β 1,3Gal延长的核心2聚糖)被鉴定为负责相互作用。由于与两种其他结构相比,核心2聚糖检测到非常高的浓缩因子,VWF上存在的该聚糖似乎对CLEC10A具有很强的亲和力。另外,仅含有0-连接的聚糖位点2298的VWF肽被鉴定为与CLEC10A结合,因此含有未被唾液酸化的聚糖结构。最终,这些结果是出乎意料的,并表明聚糖位点T2298完全负责VWF-CLEC10A的相互作用。此外,观察到的糖基化模式似乎只存在于T2298。基于这些结果和CLEC10A介导的VWF清除的观察,可以认为CLEC10A对天然糖基化VWF的清除仅受0-连接的糖基化位点2298的影响。因此,为了防止CLEC10A结合,在操作相应的0-糖基化位点和/或鉴定存在于该聚糖位点的各自的碳水化合物结构之后,可以假设VWF突变体的清除降低。

[0193] 方法

[0194] 1) VWF的还原和羧甲基化

[0195] 在+4℃下,依照前面部分描述的方法纯化的体积30mL的VWF溶液进一步在1升还原缓冲液(50mM Tris,100mM NaCl,pH8.5)中透析过夜。再次重复该步骤,除了第二次透析在室温下进行4小时。随后,通过在轻轻搅拌(IKA,Staufen,Germany)下加入1M DTT的储备溶液将溶液调节至15mM DTT。通过在+37℃温育60分钟进行VWF的还原。然后通过加入1M储备溶液用40mM碘乙酰胺烷基化VWF,并将溶液在室温下孵育60分钟。

[0196] 2) 从人血浆中纯化的单体VWF的酶消化

[0197] 在基于前述方法还原和烷基化后,通过Membra-Cel MD25-14透析管路(Serva,Heidelberg,Germany)在+4℃下将60mL单体VWF(蛋白质浓度为1mg/mL)针对20L的50mM NH₄HCO₃(pH 7.8)透析过夜。透析步骤重复2次。将固定的胰蛋白酶树脂(Promega,Mannheim,Germany)用50mM NH₄HCO₃(pH 7.8)洗涤,并加入到蛋白质溶液中,导致浓度为每8mg蛋白质1mL胰蛋白酶树脂。随后,将悬浮液在旋转混合器(Glaswarenfabrik Karl Hecht,Sondheim,Germany)上于+37℃孵育24小时。反应后,通过离心(Multifuge 3SR,Heraeus,Osterode,Germany)以2,000×g在+20℃离心15分钟来分离固定的胰蛋白酶。在另外的过滤步骤(孔径为0.45μm,Sterivex-HV,Millipore,Cork,Ireland)后,将反应混合物转移到Centricon Plus-70装置(Merck Millipore,Darmstadt,Germany)并在室温下以

3,000xg离心15分钟 (Multifuge 3SR, Heraeus, Osterode, Germany)。通过SDS-PAGE 证明了成功的切割反应(数据未显示)。通过施加显色底物证实胰蛋白酶的消耗(数据未显示)。将胰蛋白酶消化片段(约0.5mg/mL的蛋白质浓度)在SpeedVac真空浓缩器系统(Thermo Scientific, Langenselbold, Germany)中浓缩至终浓度约40mg/mL。最终,通过MS分析研究浓缩的VWF片段的肽谱,并与在第一离心步骤之前获得的中间体级分比较,从而提供两个样品具有相同组成的VWF片段的证据。

[0198] 3) 与CLEC10A相互作用的胰蛋白酶消化VWF片段的鉴定

[0199] 为了鉴定VWF中存在的哪个聚糖链与CLEC10A相互作用,胰蛋白酶消化VWF片段与可溶性CLEC10A (R&D Systems, Wiesbaden, Germany) 一起孵育。将1mg冻干的受体蛋白溶于2mL含有10mM HEPES、150mM NaCl和5mM CaCl₂ (pH 7.4) 的反应缓冲液中。通过加入20倍浓缩的缓冲液储备溶液将蛋白质含量为0.5mg/mL的胰蛋白酶消化后20mL浓缩的VWF片段调节至相同的缓冲液条件,然后与含有受体蛋白的溶液混合。在+37℃,在轻轻混合下进行孵育过夜 (Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim, Germany)。然后,以3,000 × g (Multifuge 3SR, Heraeus, Osterode, Germany) 离心 (Amicon Ultra-15离心过滤器单元, NMWL 10kDa, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 分离未结合的VWF片段并弃去。在室温下进行离心,直至达到0.5mL的剩余体积。然后将含有与VWF片段相互作用的受体蛋白的浓缩反应混合物用反应缓冲液洗涤并再次浓缩。在重复该浓缩溶液的洗涤步骤2次后,将反应混合物分成两等份,然后用两种不同的洗脱缓冲液处理。一方面,在pH 11 (100mM甘氨酸/NaOH缓冲液, pH 11.0) 下洗脱结合的蛋白质片段,另一方面,通过使用含有GalNAc (100mM GalNAc, pH 4.3) 的溶液洗脱结合的蛋白质片段。将相应的洗脱缓冲液加入洗涤和浓缩的溶液中,并在轻轻混合下在室温下孵育过夜。通过离心分离后,收集含有洗脱的VWF片段的所得滤液并通过MS分析。

[0200] 4) 胰蛋白酶消化VWF片段与清除受体相互作用的分析

[0201] 分离的胰蛋白酶片段通过PNGase F处理和β-消除进行去糖基化,然后通过应用纳米液相色谱电喷雾离子化MS/MS进行分析。此外,游离的N-和O-聚糖被全甲基化并通过MALDI-TOF-MS分析表征。基于发表的方法 (Canis et al. (2010) Journal of Thrombosis and Haemostasis, 8:137-145; Canis et al. (2012) The Biochemical Journal, 447:217-228) 进行分析。

[0202] 实施例2:生成VWF突变体T2298的表达载体

[0203] 先前已经产生了在其多克隆位点中含有全长VWF cDNA序列的表达质粒。该载体中包含的VWF cDNA序列显示为SEQ ID NO:1,其对应的蛋白质序列为SEQ ID NO:2。

[0204] 为了产生这样的表达载体,在本领域技术人员已知的标准条件下,使用引物组VWF+和VWF- (SEQ ID NO.3和4),通过聚合酶链反应 (PCR) 从含有VWF cDNA的质粒(商业上可获得,例如来自ATCC, No.67122的pMT2-VWF) 扩增VWF cDNA (并且如Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel FM et al. (eds.) John Wiley&Sons, Inc.; <http://www.currentprotocols.com/WileyCDA/>中所述)。将得到的PCR片段用限制性内切核酸酶EcoRI消化,并连接到已经通过EcoRI线性化的表达载体pIRESneo3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 中。得到的插入片段正确取向的表达质粒含有CMV启动子下游的VWF的野生型cDNA。

[0205] 为了将突变引入VWF序列中,定点诱变(QuickChange XL Site Directed Mutagenesis Kit,Stratagene,La Jolla,CA,USA)按照试剂盒制造商的建议,按照以下操作方案应用于上述质粒。每个诱变反应 5 μ l的10 $\times$ 反应缓冲液、1 μ l质粒DNA (50ng)、各自1 μ l (10pmol/ μ l) 的两种诱变寡核苷酸We4781和We4782 (SEQ ID NO.5和6)、1 μ l 的dNTP Mix、3 μ l的Quick-溶液,1 μ l的Turbo聚合酶 (2,.5U/ μ l) 和37 μ l的H₂O混合并进行聚合酶链式反应,初始变性在95 $^{\circ}$ C下进行2 分钟,18个循环a)在95 $^{\circ}$ C下变性50秒,b)在60 $^{\circ}$ C退火50秒,c)在68 $^{\circ}$ C下延伸17分钟,然后在68 $^{\circ}$ C下进行7分钟的单末端延伸阶段。随后加入1 μ l来自该试剂盒的DpnI酶,反应物在37 $^{\circ}$ C下再孵育60分 钟。然后将3 μ l的诱变反应物转化到大肠杆菌中。分离克隆,提取质粒 DNA,并通过DNA测序验证VWF序列中的突变。

[0206] 使用上述操作方案和质粒,并且通过应用本领域技术人员已知的分子生物学技术(并且如例如在Current Protocols in Molecular Biology, 同上中所述),可由本领域技术人员制备其他构建体用于突变其它氨基酸残基。

[0207] 实施例3:生成含有T2298残基的白蛋白融合的VWF片段的表达 载体

[0208] 为了产生含有氨基酸残基2276至2326的VWF片段与人白蛋白融合的表达式载体,包含N-末端信号肽和C-末端28氨基酸甘氨酸/丝氨酸 接头的VWF片段的编码序列是通过基因合成(Eurofins MWG Synthesis,Ebersberg,Germany)制备的,其中在5'端具有NheI限制性位点和在3'端具有BamHI位点。将该片段从由NheI和BamHI消化 提供的克隆载体中切下,纯化并克隆到NheI/BamHI消化的表达式载体 pIRESneo3(同上)中。

[0209] 白蛋白编码序列通过PCR扩增。对于该PCR扩增,1 μ l的含有野生型白蛋白cDNA的质粒DNA (50ng)、5 μ l的10 $\times$ 反应缓冲液、各自1 μ l (10pmol/ μ l)的两个PCR引物HA+和HA- (SEQ ID NO:7 和8)、1 μ l的dNTP Mix、1 μ l的Turbo聚合酶 (2,5U/ μ l)和40 μ l 的H₂O混合,并进行聚合酶链式反应,初始变性在95 $^{\circ}$ C下进行2分钟, 25个循环:a)在95 $^{\circ}$ C下变性20秒,b)在61 $^{\circ}$ C退火20秒,c)在68 $^{\circ}$ C 下延伸7分钟,然后在68 $^{\circ}$ C下进行7分钟的单末端延伸阶段。将该片段 纯化,用BamHI和NotI消化,并连接到含有VWF片段的上述载体的 BamHI和NotI位点。将连接混合物转化大肠杆菌。分离克隆,提取质 粒DNA,并通过DNA测序验证序列。表达式构建体的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:9中。

[0210] 实施例4:质粒转染和VWF突变体在CHO细胞中的表达

[0211] 将表达式质粒在大肠杆菌TOP10 (Invitrogen,Carlsbad,CA,USA) 中生长并使用标准操作方案 (Qiagen,Hilden,Germany) 纯化。使用 Lipofectamine 2000试剂 (Invitrogen),用表达式质粒转染CHO K1细 胞。分离单克隆,并在无血清培养基 (CD-CHO, Life Technologies) 中在750 μ g/ml的Genitacin存在下生长。将克隆通过T培养瓶传到摇瓶和生物反应器中,从其中收获上清液以纯化相应的重组VWF蛋白。

[0212] 实施例5:VWF抗原的定量

[0213] 培养上清液中的VWF抗原通过ELISA测定,其性能是本领域技术 人员已知的。简言之,将微孔板与100 μ L每孔的以1:2000稀释于缓冲 液A (Sigma C3041,Sigma-Aldrich, Munich,Germany)中捕获抗体 (兔抗人vWF-IgG,Dako A0082[Dako,Hamburg,Germany])在环 境温度下过夜。用缓冲液B (Sigma P3563)洗涤板三次后,将各孔与 200 μ L缓冲液C (Sigma P3688)在环境温度下一起温育1.5小时(封 闭)。在用缓冲液B进行另外三个洗涤步骤之后,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;20-0.2mU/mL;

Siemens Healthcare Diagnostics, Marburg, Germany) 在缓冲液B中的连续稀释液(每孔体积:100 μ L)在环境温度下孵育1.5小时。在用缓冲液B进行三个洗涤步骤之后,向每个孔中加入100 μ L在缓冲液B中1:16000稀释的检测抗体(兔抗人vWF-IgG, Dako P0226, 过氧化物酶标记的),并在环境温度下孵育1小时。在用缓冲液B进行三个洗涤步骤后,每孔加入100 μ L底物溶液(OUVF, Siemens Healthcare Diagnostics),并在黑暗环境中在环境温度下孵育30分钟。加入100 μ L未稀释的终止稀释液(OSFA, Siemens Healthcare Diagnostics)制备样品,以在合适的酶标仪上在450nm波长进行读数。然后用标准人血浆作为参考的标准曲线,计算测试样品的浓度。

[0214] 实施例6:VWF T2298Q突变体的药代动力学分析

[0215] 实施例4的VWF-T2298Q和重组VWF(野生型)分别静脉内施用于总共4只CD大鼠的每一只。剂量为100U(VWF:Ag)/kg体重,注射体积为4mL/kg。

[0216] 使用交替取样方案,在应用测试物质后5分钟开始以适当的时间间隔后抽取血液样品,得到2只动物/时间点的样品(对于子集Nr.1, $t=0$ 、5、30、90分钟、4小时、1天和对于子集Nr.2, $t=0$ 、15分钟、1、2、8小时和2天)。该方案旨在最大限度地减少血液采样对待定量血浆浓度的潜在影响。将血液加工成血浆并进行深冻储存直到分析。血浆中的VWF:Ag水平随后通过如实施例5所述的ELISA进行定量。平均血浆浓度用于计算药代动力学参数。

[0001] 序列表
 [0002] <110> 瑞士杰特贝林生物制品重组设备股份公司
 [0003] <120> 具有改善的半衰期的经修饰的血管性血友病因子
 [0004] <130> A241
 [0005] <150> EP2015158065.1
 [0006] <151> 2015-03-06
 [0007] <160> 12
 [0008] <170> PatentIn 3.5版
 [0009] <210> 1
 [0010] <211> 8442
 [0011] <212> DNA
 [0012] <213> 智人
 [0013] <220>
 [0014] <221> CDS
 [0015] <222> (1) .. (8442)
 [0016] <400> 1
 [0017] atg att cct gcc aga ttt gcc ggg gtg ctg ctt gct ctg gcc ctc att 48
 [0018] Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 [0019] 1 5 10 15
 [0020] ttg cca ggg acc ctt tgt gca gaa gga act cgc ggc agg tca tcc acg 96
 [0021] Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 [0022] 20 25 30
 [0023] gcc cga tgc agc ctt ttc gga agt gac ttc gtc aac acc ttt gat ggg 144
 [0024] Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 [0025] 35 40 45
 [0026] agc atg tac agc ttt gcg gga tac tgc agt tac ctc ctg gca ggg ggc 192
 [0027] Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 [0028] 50 55 60
 [0029] tgc cag aaa cgc tcc ttc tcg att att ggg gac ttc cag aat ggc aag 240
 [0030] Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 [0031] 65 70 75 80
 [0032] aga gtg agc ctc tcc gtg tat ctt ggg gaa ttt ttt gac atc cat ttg 288
 [0033] Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 [0034] 85 90 95
 [0035] ttt gtc aat ggt acc gtg aca cag ggg gac caa aga gtc tcc atg ccc 336
 [0036] Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 [0037] 100 105 110
 [0038] tat gcc tcc aaa ggg ctg tat cta gaa act gag gct ggg tac tac aag 384

[0039]	Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys	
[0040]	115	120 125
[0041]	ctg tcc ggt gag gcc tat ggc ttt gtg gcc agg atc gat ggc agc ggc	432
[0042]	Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly	
[0043]	130	135 140
[0044]	aac ttt caa gtc ctg ctg tca gac aga tac ttc aac aag acc tgc ggg	480
[0045]	Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly	
[0046]	145	150 155 160
[0047]	ctg tgt ggc aac ttt aac atc ttt gct gaa gat gac ttt atg acc caa	528
[0048]	Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln	
[0049]	165	170 175
[0050]	gaa ggg acc ttg acc tcg gac cct tat gac ttt gcc aac tca tgg gct	576
[0051]	Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala	
[0052]	180	185 190
[0053]	ctg agc agt gga gaa cag tgg tgt gaa cgg gca tct cct ccc agc agc	624
[0054]	Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser	
[0055]	195	200 205
[0056]	tca tgc aac atc tcc tct ggg gaa atg cag aag ggc ctg tgg gag cag	672
[0057]	Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln	
[0058]	210	215 220
[0059]	tgc cag ctt ctg aag agc acc tcg gtg ttt gcc cgc tgc cac cct ctg	720
[0060]	Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu	
[0061]	225	230 235 240
[0062]	gtg gac ccc gag cct ttt gtg gcc ctg tgt gag aag act ttg tgt gag	768
[0063]	Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu	
[0064]	245	250 255
[0065]	tgt gct ggg ggg ctg gag tgc gcc tgc cct gcc ctc ctg gag tac gcc	816
[0066]	Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala	
[0067]	260	265 270
[0068]	cgg acc tgt gcc cag gag gga atg gtg ctg tac ggc tgg acc gac cac	864
[0069]	Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His	
[0070]	275	280 285
[0071]	agc gcg tgc agc cca gtg tgc cct gct ggt atg gag tat agg cag tgt	912
[0072]	Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys	
[0073]	290	295 300
[0074]	gtg tcc cct tgc gcc agg acc tgc cag agc ctg cac atc aat gaa atg	960
[0075]	Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met	
[0076]	305	310 315 320
[0077]	tgt cag gag cga tgc gtg gat ggc tgc agc tgc cct gag gga cag ctc	1008

[0078]	Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu
[0079]	325 330 335
[0080]	ctg gat gaa ggc ctc tgc gtg gag agc acc gag tgt ccc tgc gtg cat 1056
[0081]	Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His
[0082]	340 345 350
[0083]	tcc gga aag cgc tac cct ccc ggc acc tcc ctc tct cga gac tgc aac 1104
[0084]	Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn
[0085]	355 360 365
[0086]	acc tgc att tgc cga aac agc cag tgg atc tgc agc aat gaa gaa tgt 1152
[0087]	Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
[0088]	370 375 380
[0089]	cca ggg gag tgc ctt gtc aca ggt caa tca cac ttc aag agc ttt gac 1200
[0090]	Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
[0091]	385 390 395 400
[0092]	aac aga tac ttc acc ttc agt ggg atc tgc cag tac ctg ctg gcc cgg 1248
[0093]	Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
[0094]	405 410 415
[0095]	gat tgc cag gac cac tcc ttc tcc att gtc att gag act gtc cag tgt 1296
[0096]	Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
[0097]	420 425 430
[0098]	gct gat gac cgc gac gct gtg tgc acc cgc tcc gtc acc gtc cgg ctg 1344
[0099]	Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
[0100]	435 440 445
[0101]	cct ggc ctg cac aac agc ctt gtg aaa ctg aag cat ggg gca gga gtt 1392
[0102]	Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
[0103]	450 455 460
[0104]	gcc atg gat ggc cag gac gtc cag ctc ccc ctc ctg aaa ggt gac ctc 1440
[0105]	Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
[0106]	465 470 475 480
[0107]	cgc atc cag cat aca gtg acg gcc tcc gtg cgc ctc agc tac ggg gag 1488
[0108]	Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
[0109]	485 490 495
[0110]	gac ctg cag atg gac tgg gat ggc cgc ggg agg ctg ctg gtg aag ctg 1536
[0111]	Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
[0112]	500 505 510
[0113]	tcc ccc gtc tat gcc ggg aag acc tgc ggc ctg tgt ggg aat tac aat 1584
[0114]	Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
[0115]	515 520 525
[0116]	ggc aac cag ggc gac gac ttc ctt acc ccc tct ggg ctg gcg gag ccc 1632

[0117]	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Pro	
[0118]		530					535					540					
[0119]	cgg	gtg	gag	gac	ttc	ggg	aac	gcc	tgg	aag	ctg	cac	ggg	gac	tgc	cag	1680
[0120]	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	Gly	Asp	Cys	Gln	
[0121]	545					550					555					560	
[0122]	gac	ctg	cag	aag	cag	cac	agc	gat	ccc	tgc	gcc	ctc	aac	ccg	cgc	atg	1728
[0123]	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Met	
[0124]					565					570					575		
[0125]	acc	agg	ttc	tcc	gag	gag	gcg	tgc	gcg	gtc	ctg	acg	tcc	ccc	aca	ttc	1776
[0126]	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe	
[0127]			580						585					590			
[0128]	gag	gcc	tgc	cat	cgt	gcc	gtc	agc	ccg	ctg	ccc	tac	ctg	cgg	aac	tgc	1824
[0129]	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asn	Cys	
[0130]		595					600					605					
[0131]	cgc	tac	gac	gtg	tgc	tcc	tgc	tcg	gac	ggc	cgc	gag	tgc	ctg	tgc	ggc	1872
[0132]	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys	Leu	Cys	Gly	
[0133]	610					615					620						
[0134]	gcc	ctg	gcc	agc	tat	gcc	gcg	gcc	tgc	gcg	ggg	aga	ggc	gtg	cgc	gtc	1920
[0135]	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg	Val	
[0136]	625					630				635					640		
[0137]	gcg	tgg	cgc	gag	cca	ggc	cgc	tgt	gag	ctg	aac	tgc	ccg	aaa	ggc	cag	1968
[0138]	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	Gln	
[0139]			645						650					655			
[0140]	gtg	tac	ctg	cag	tgc	ggg	acc	ccc	tgc	aac	ctg	acc	tgc	cgc	tct	ctc	2016
[0141]	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu	
[0142]			660						665					670			
[0143]	tct	tac	ccg	gat	gag	gaa	tgc	aat	gag	gcc	tgc	ctg	gag	ggc	tgc	ttc	2064
[0144]	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe	
[0145]		675					680						685				
[0146]	tgc	ccc	cca	ggg	ctc	tac	atg	gat	gag	agg	ggg	gac	tgc	gtg	ccc	aag	2112
[0147]	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys	
[0148]	690					695					700						
[0149]	gcc	cag	tgc	ccc	tgt	tac	tat	gac	ggt	gag	atc	ttc	cag	cca	gaa	gac	2160
[0150]	Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp	
[0151]	705					710					715				720		
[0152]	atc	ttc	tca	gac	cat	cac	acc	atg	tgc	tac	tgt	gag	gat	ggc	ttc	atg	2208
[0153]	Ile	Phe	Ser	Asp	His	His	Thr	Met	Cys	Tyr	Cys	Glu	Asp	Gly	Phe	Met	
[0154]			725						730					735			
[0155]	cac	tgt	acc	atg	agt	gga	gtc	ccc	gga	agc	ttg	ctg	cct	gac	gct	gtc	2256

[0156]	His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val	
[0157]	740	745 750
[0158]	ctc agc agt ccc ctg tct cat cgc agc aaa agg agc cta tcc tgt cgg	2304
[0159]	Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg	
[0160]	755	760 765
[0161]	ccc ccc atg gtc aag ctg gtg tgt ccc gct gac aac ctg cgg gct gaa	2352
[0162]	Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu	
[0163]	770	775 780
[0164]	ggg ctc gag tgt acc aaa acg tgc cag aac tat gac ctg gag tgc atg	2400
[0165]	Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met	
[0166]	785	790 795 800
[0167]	agc atg ggc tgt gtc tct ggc tgc ctc tgc ccc ccg ggc atg gtc cgg	2448
[0168]	Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg	
[0169]	805	810 815
[0170]	cat gag aac aga tgt gtg gcc ctg gaa agg tgt ccc tgc ttc cat cag	2496
[0171]	His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln	
[0172]	820	825 830
[0173]	ggc aag gag tat gcc cct gga gaa aca gtg aag att ggc tgc aac act	2544
[0174]	Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr	
[0175]	835	840 845
[0176]	tgt gtc tgt cgg gac cgg aag tgg aac tgc aca gac cat gtg tgt gat	2592
[0177]	Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp	
[0178]	850	855 860
[0179]	gcc acg tgc tcc acg atc ggc atg gcc cac tac ctc acc ttc gac ggg	2640
[0180]	Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly	
[0181]	865	870 875 880
[0182]	ctc aaa tac ctg ttc ccc ggg gag tgc cag tac gtt ctg gtg cag gat	2688
[0183]	Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp	
[0184]	885	890 895
[0185]	tac tgc ggc agt aac cct ggg acc ttt cgg atc cta gtg ggg aat aag	2736
[0186]	Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys	
[0187]	900	905 910
[0188]	gga tgc agc cac ccc tca gtg aaa tgc aag aaa cgg gtc acc atc ctg	2784
[0189]	Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu	
[0190]	915	920 925
[0191]	gtg gag gga gga gag att gag ctg ttt gac ggg gag gtg aat gtg aag	2832
[0192]	Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys	
[0193]	930	935 940
[0194]	agg ccc atg aag gat gag act cac ttt gag gtg gtg gag tct ggc cgg	2880

[0195]	Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg	
[0196]	945	950 955 960
[0197]	tac atc att ctg ctg ctg ggc aaa gcc ctc tcc gtg gtc tgg gac cgc	2928
[0198]	Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg	
[0199]	965	970 975
[0200]	cac ctg agc atc tcc gtg gtc ctg aag cag aca tac cag gag aaa gtg	2976
[0201]	His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val	
[0202]	980	985 990
[0203]	tgt ggc ctg tgt ggg aat ttt gat ggc atc cag aac aat gac ctc acc	3024
[0204]	Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr	
[0205]	995	1000 1005
[0206]	agc agc aac ctc caa gtg gag gaa gac cct gtg gac ttt ggg aac	3069
[0207]	Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn	
[0208]	1010	1015 1020
[0209]	tcc tgg aaa gtg agc tcg cag tgt gct gac acc aga aaa gtg cct	3114
[0210]	Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro	
[0211]	1025	1030 1035
[0212]	ctg gac tca tcc cct gcc acc tgc cat aac aac atc atg aag cag	3159
[0213]	Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln	
[0214]	1040	1045 1050
[0215]	acg atg gtg gat tcc tcc tgt aga atc ctt acc agt gac gtc ttc	3204
[0216]	Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe	
[0217]	1055	1060 1065
[0218]	cag gac tgc aac aag ctg gtg gac ccc gag cca tat ctg gat gtc	3249
[0219]	Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val	
[0220]	1070	1075 1080
[0221]	tgc att tac gac acc tgc tcc tgt gag tcc att ggg gac tgc gcc	3294
[0222]	Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala	
[0223]	1085	1090 1095
[0224]	tgc ttc tgc gac acc att gct gcc tat gcc cac gtg tgt gcc cag	3339
[0225]	Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln	
[0226]	1100	1105 1110
[0227]	cat ggc aag gtg gtg acc tgg agg acg gcc aca ttg tgc ccc cag	3384
[0228]	His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln	
[0229]	1115	1120 1125
[0230]	agc tgc gag gag agg aat ctc cgg gag aac ggg tat gag tgt gag	3429
[0231]	Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu	
[0232]	1130	1135 1140
[0233]	tgg cgc tat aac agc tgt gca cct gcc tgt caa gtc acg tgt cag	3474

[0234]	Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln	
[0235]	1145	1150 1155
[0236]	cac cct gag cca ctg gcc tgc cct gtg cag tgt gtg gag ggc tgc	3519
[0237]	His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys	
[0238]	1160	1165 1170
[0239]	cat gcc cac tgc cct cca ggg aaa atc ctg gat gag ctt ttg cag	3564
[0240]	His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln	
[0241]	1175	1180 1185
[0242]	acc tgc gtt gac cct gaa gac tgt cca gtg tgt gag gtg gct ggc	3609
[0243]	Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly	
[0244]	1190	1195 1200
[0245]	cgg cgt ttt gcc tca gga aag aaa gtc acc ttg aat ccc agt gac	3654
[0246]	Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp	
[0247]	1205	1210 1215
[0248]	cct gag cac tgc cag att tgc cac tgt gat gtt gtc aac ctc acc	3699
[0249]	Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr	
[0250]	1220	1225 1230
[0251]	tgt gaa gcc tgc cag gag ccg gga ggc ctg gtg gtg cct ccc aca	3744
[0252]	Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr	
[0253]	1235	1240 1245
[0254]	gat gcc ccg gtg agc ccc acc act ctg tat gtg gag gac atc tcg	3789
[0255]	Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser	
[0256]	1250	1255 1260
[0257]	gaa ccg ccg ttg cac gat ttc tac tgc agc agg cta ctg gac ctg	3834
[0258]	Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu	
[0259]	1265	1270 1275
[0260]	gtc ttc ctg ctg gat ggc tcc tcc agg ctg tcc gag gct gag ttt	3879
[0261]	Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe	
[0262]	1280	1285 1290
[0263]	gaa gtg ctg aag gcc ttt gtg gtg gac atg atg gag cgg ctg cgc	3924
[0264]	Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg	
[0265]	1295	1300 1305
[0266]	atc tcc cag aag tgg gtc cgc gtg gcc gtg gtg gag tac cac gac	3969
[0267]	Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp	
[0268]	1310	1315 1320
[0269]	ggc tcc cac gcc tac atc ggg ctc aag gac cgg aag cga ccg tca	4014
[0270]	Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser	
[0271]	1325	1330 1335
[0272]	gag ctg cgg cgc att gcc agc cag gtg aag tat gcg ggc agc cag	4059

[0273]	Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln	
[0274]	1340	1345 1350
[0275]	gtg gcc tcc acc agc gag gtc ttg aaa tac aca ctg ttc caa atc	4104
[0276]	Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile	
[0277]	1355	1360 1365
[0278]	ttc agc aag atc gac cgc cct gaa gcc tcc cgc atc gcc ctg ctc	4149
[0279]	Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu	
[0280]	1370	1375 1380
[0281]	ctg atg gcc agc cag gag ccc caa cgg atg tcc cgg aac ttt gtc	4194
[0282]	Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val	
[0283]	1385	1390 1395
[0284]	cgc tac gtc cag ggc ctg aag aag aag aag gtc att gtg atc ccg	4239
[0285]	Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro	
[0286]	1400	1405 1410
[0287]	gtg ggc att ggg ccc cat gcc aac ctc aag cag atc cgc ctc atc	4284
[0288]	Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile	
[0289]	1415	1420 1425
[0290]	gag aag cag gcc cct gag aac aag gcc ttc gtg ctg agc agt gtg	4329
[0291]	Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val	
[0292]	1430	1435 1440
[0293]	gat gag ctg gag cag caa agg gac gag atc gtt agc tac ctc tgt	4374
[0294]	Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys	
[0295]	1445	1450 1455
[0296]	gac ctt gcc cct gaa gcc cct cct cct act ctg ccc ccc cac atg	4419
[0297]	Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met	
[0298]	1460	1465 1470
[0299]	gca caa gtc act gtg ggc ccg ggg ctc ttg ggg gtt tcg acc ctg	4464
[0300]	Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu	
[0301]	1475	1480 1485
[0302]	ggg ccc aag agg aac tcc atg gtt ctg gat gtg gcg ttc gtc ctg	4509
[0303]	Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu	
[0304]	1490	1495 1500
[0305]	gaa gga tcg gac aaa att ggt gaa gcc gac ttc aac agg agc aag	4554
[0306]	Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys	
[0307]	1505	1510 1515
[0308]	gag ttc atg gag gag gtg att cag cgg atg gat gtg ggc cag gac	4599
[0309]	Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp	
[0310]	1520	1525 1530
[0311]	agc atc cac gtc acg gtg ctg cag tac tcc tac atg gtg acc gtg	4644

[0312]	Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val	
[0313]	1535	1540 1545
[0314]	gag tac ccc ttc agc gag gca cag tcc aaa ggg gac atc ctg cag	4689
[0315]	Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln	
[0316]	1550	1555 1560
[0317]	cgg gtg cga gag atc cgc tac cag ggc ggc aac agg acc aac act	4734
[0318]	Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr	
[0319]	1565	1570 1575
[0320]	ggg ctg gcc ctg cgg tac ctc tct gac cac agc ttc ttg gtc agc	4779
[0321]	Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser	
[0322]	1580	1585 1590
[0323]	cag ggt gac cgg gag cag gcg ccc aac ctg gtc tac atg gtc acc	4824
[0324]	Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr	
[0325]	1595	1600 1605
[0326]	gga aat cct gcc tct gat gag atc aag agg ctg cct gga gac atc	4869
[0327]	Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile	
[0328]	1610	1615 1620
[0329]	cag gtg gtg ccc att gga gtg ggc cct aat gcc aac gtg cag gag	4914
[0330]	Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu	
[0331]	1625	1630 1635
[0332]	ctg gag agg att ggc tgg ccc aat gcc cct atc ctc atc cag gac	4959
[0333]	Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp	
[0334]	1640	1645 1650
[0335]	ttt gag acg ctc ccc cga gag gct cct gac ctg gtg ctg cag agg	5004
[0336]	Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg	
[0337]	1655	1660 1665
[0338]	tgc tgc tcc gga gag ggg ctg cag atc ccc acc ctc tcc cct gca	5049
[0339]	Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala	
[0340]	1670	1675 1680
[0341]	cct gac tgc agc cag ccc ctg gac gtg atc ctt ctc ctg gat ggc	5094
[0342]	Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly	
[0343]	1685	1690 1695
[0344]	tcc tcc agt ttc cca gct tct tat ttt gat gaa atg aag agt ttc	5139
[0345]	Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe	
[0346]	1700	1705 1710
[0347]	gcc aag gct ttc att tca aaa gcc aat ata ggg cct cgt ctc act	5184
[0348]	Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr	
[0349]	1715	1720 1725
[0350]	cag gtg tca gtg ctg cag tat gga agc atc acc acc att gac gtg	5229

[0351]	Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val	
[0352]	1730	1735 1740
[0353]	cca tgg aac gtg gtc ccg gag aaa gcc cat ttg ctg agc ctt gtg	5274
[0354]	Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val	
[0355]	1745	1750 1755
[0356]	gac gtc atg cag cgg gag gga ggc ccc agc caa atc ggg gat gcc	5319
[0357]	Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala	
[0358]	1760	1765 1770
[0359]	ttg ggc ttt gct gtg cga tac ttg act tca gaa atg cat ggg gcg	5364
[0360]	Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala	
[0361]	1775	1780 1785
[0362]	cgc ccg gga gcc tca aag gcg gtg gtc atc ctg gtc acg gac gtc	5409
[0363]	Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val	
[0364]	1790	1795 1800
[0365]	tct gtg gat tca gtg gat gca gca gct gat gcc gcc agg tcc aac	5454
[0366]	Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn	
[0367]	1805	1810 1815
[0368]	aga gtg aca gtg ttc cct att gga att gga gat cgc tac gat gca	5499
[0369]	Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala	
[0370]	1820	1825 1830
[0371]	gcc cag cta cgg atc ttg gca ggc cca gca ggc gac tcc aac gtg	5544
[0372]	Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val	
[0373]	1835	1840 1845
[0374]	gtg aag ctc cag cga atc gaa gac ctc cct acc atg gtc acc ttg	5589
[0375]	Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu	
[0376]	1850	1855 1860
[0377]	ggc aat tcc ttc ctc cac aaa ctg tgc tct gga ttt gtt agg att	5634
[0378]	Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile	
[0379]	1865	1870 1875
[0380]	tgc atg gat gag gat ggg aat gag aag agg ccc ggg gac gtc tgg	5679
[0381]	Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp	
[0382]	1880	1885 1890
[0383]	acc ttg cca gac cag tgc cac acc gtg act tgc cag cca gat ggc	5724
[0384]	Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly	
[0385]	1895	1900 1905
[0386]	cag acc ttg ctg aag agt cat cgg gtc aac tgt gac cgg ggg ctg	5769
[0387]	Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu	
[0388]	1910	1915 1920
[0389]	agg cct tcg tgc cct aac agc cag tcc cct gtt aaa gtg gaa gag	5814

[0390]	Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu
[0391]	1925 1930 1935
[0392]	acc tgt ggc tgc cgc tgg acc tgc ccc tgc gtg tgc aca ggc agc 5859
[0393]	Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser
[0394]	1940 1945 1950
[0395]	tcc act cgg cac atc gtg acc ttt gat ggg cag aat ttc aag ctg 5904
[0396]	Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu
[0397]	1955 1960 1965
[0398]	act ggc agc tgt tct tat gtc cta ttt caa aac aag gag cag gac 5949
[0399]	Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp
[0400]	1970 1975 1980
[0401]	ctg gag gtg att ctc cat aat ggt gcc tgc agc cct gga gca agg 5994
[0402]	Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg
[0403]	1985 1990 1995
[0404]	cag ggc tgc atg aaa tcc atc gag gtg aag cac agt gcc ctc tcc 6039
[0405]	Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser
[0406]	2000 2005 2010
[0407]	gtc gag ctg cac agt gac atg gag gtg acg gtg aat ggg aga ctg 6084
[0408]	Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu
[0409]	2015 2020 2025
[0410]	gtc tct gtt cct tac gtg ggt ggg aac atg gaa gtc aac gtt tat 6129
[0411]	Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr
[0412]	2030 2035 2040
[0413]	ggt gcc atc atg cat gag gtc aga ttc aat cac ctt ggt cac atc 6174
[0414]	Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile
[0415]	2045 2050 2055
[0416]	ttc aca ttc act cca caa aac aat gag ttc caa ctg cag ctc agc 6219
[0417]	Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser
[0418]	2060 2065 2070
[0419]	ccc aag act ttt gct tca aag acg tat ggt ctg tgt ggg atc tgt 6264
[0420]	Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys
[0421]	2075 2080 2085
[0422]	gat gag aac gga gcc aat gac ttc atg ctg agg gat ggc aca gtc 6309
[0423]	Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val
[0424]	2090 2095 2100
[0425]	acc aca gac tgg aaa aca ctt gtt cag gaa tgg act gtg cag cgg 6354
[0426]	Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg
[0427]	2105 2110 2115
[0428]	cca ggg cag acg tgc cag ccc atc ctg gag gag cag tgt ctt gtc 6399

[0429]	Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val	
[0430]	2120	2130
[0431]	ccc gac agc tcc cac tgc cag gtc ctc ctc tta cca ctg ttt gct	6444
[0432]	Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala	
[0433]	2135	2145
[0434]	gaa tgc cac aag gtc ctg gct cca gcc aca ttc tat gcc atc tgc	6489
[0435]	Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys	
[0436]	2150	2160
[0437]	cag cag gac agt tgc cac cag gag caa gtg tgt gag gtg atc gcc	6534
[0438]	Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala	
[0439]	2165	2175
[0440]	tct tat gcc cac ctc tgt cgg acc aac ggg gtc tgc gtt gac tgg	6579
[0441]	Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp	
[0442]	2180	2190
[0443]	agg aca cct gat ttc tgt gct atg tca tgc cca cca tct ctg gtt	6624
[0444]	Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val	
[0445]	2195	2205
[0446]	tat aac cac tgt gag cat ggc tgt ccc cgg cac tgt gat ggc aac	6669
[0447]	Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn	
[0448]	2210	2220
[0449]	gtg agc tcc tgt ggg gac cat ccc tcc gaa ggc tgt ttc tgc cct	6714
[0450]	Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro	
[0451]	2225	2235
[0452]	cca gat aaa gtc atg ttg gaa ggc agc tgt gtc cct gaa gag gcc	6759
[0453]	Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala	
[0454]	2240	2250
[0455]	tgc act cag tgc att ggt gag gat gga gtc cag cac cag ttc ctg	6804
[0456]	Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu	
[0457]	2255	2265
[0458]	gaa gcc tgg gtc ccg gac cac cag ccc tgt cag atc tgc aca tgc	6849
[0459]	Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys	
[0460]	2270	2280
[0461]	ctc agc ggg cgg aag gtc aac tgc aca acg cag ccc tgc ccc acg	6894
[0462]	Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr	
[0463]	2285	2295
[0464]	gcc aaa gct ccc acg tgt ggc ctg tgt gaa gta gcc cgc ctc cgc	6939
[0465]	Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg	
[0466]	2300	2310
[0467]	cag aat gca gac cag tgc tgc ccc gag tat gag tgt gtg tgt gac	6984

[0468]	Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp	
[0469]	2315	2320 2325
[0470]	cca gtg agc tgt gac ctg ccc cca gtg cct cac tgt gaa cgt ggc	7029
[0471]	Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly	
[0472]	2330	2335 2340
[0473]	ctc cag ccc aca ctg acc aac cct ggc gag tgc aga ccc aac ttc	7074
[0474]	Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe	
[0475]	2345	2350 2355
[0476]	acc tgc gcc tgc agg aag gag gag tgc aaa aga gtg tcc cca ccc	7119
[0477]	Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro	
[0478]	2360	2365 2370
[0479]	tcc tgc ccc ccg cac cgt ttg ccc acc ctt cgg aag acc cag tgc	7164
[0480]	Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys	
[0481]	2375	2380 2385
[0482]	tgt gat gag tat gag tgt gcc tgc aac tgt gtc aac tcc aca gtg	7209
[0483]	Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val	
[0484]	2390	2395 2400
[0485]	agc tgt ccc ctt ggg tac ttg gcc tca acc gcc acc aat gac tgt	7254
[0486]	Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys	
[0487]	2405	2410 2415
[0488]	ggc tgt acc aca acc acc tgc ctt ccc gac aag gtg tgt gtc cac	7299
[0489]	Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His	
[0490]	2420	2425 2430
[0491]	cga agc acc atc tac cct gtg ggc cag ttc tgg gag gag ggc tgc	7344
[0492]	Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys	
[0493]	2435	2440 2445
[0494]	gat gtg tgc acc tgc acc gac atg gag gat gcc gtg atg ggc ctc	7389
[0495]	Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu	
[0496]	2450	2455 2460
[0497]	cgc gtg gcc cag tgc tcc cag aag ccc tgt gag gac agc tgt cgg	7434
[0498]	Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg	
[0499]	2465	2470 2475
[0500]	tcg ggc ttc act tac gtt ctg cat gaa ggc gag tgc tgt gga agg	7479
[0501]	Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg	
[0502]	2480	2485 2490
[0503]	tgc ctg cca tct gcc tgt gag gtg gtg act ggc tca ccg cgg ggg	7524
[0504]	Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly	
[0505]	2495	2500 2505
[0506]	gac tcc cag tct tcc tgg aag agt gtc ggc tcc cag tgg gcc tcc	7569

[0507]	Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser	
[0508]	2510	2515 2520
[0509]	ccg gag aac ccc tgc ctc atc aat gag tgt gtc cga gtg aag gag	7614
[0510]	Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu	
[0511]	2525	2530 2535
[0512]	gag gtc ttt ata caa caa agg aac gtc tcc tgc ccc cag ctg gag	7659
[0513]	Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu	
[0514]	2540	2545 2550
[0515]	gtc cct gtc tgc ccc tcg ggc ttt cag ctg agc tgt aag acc tca	7704
[0516]	Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser	
[0517]	2555	2560 2565
[0518]	gcg tgc tgc cca agc tgt cgc tgt gag cgc atg gag gcc tgc atg	7749
[0519]	Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met	
[0520]	2570	2575 2580
[0521]	ctc aat ggc act gtc att ggg ccc ggg aag act gtg atg atc gat	7794
[0522]	Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp	
[0523]	2585	2590 2595
[0524]	gtg tgc acg acc tgc cgc tgc atg gtg cag gtg ggg gtc atc tct	7839
[0525]	Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser	
[0526]	2600	2605 2610
[0527]	gga ttc aag ctg gag tgc agg aag acc acc tgc aac ccc tgc ccc	7884
[0528]	Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro	
[0529]	2615	2620 2625
[0530]	ctg ggt tac aag gaa gaa aat aac aca ggt gaa tgt tgt ggg aga	7929
[0531]	Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg	
[0532]	2630	2635 2640
[0533]	tgt ttg cct acg gct tgc acc att cag cta aga gga gga cag atc	7974
[0534]	Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile	
[0535]	2645	2650 2655
[0536]	atg aca ctg aag cgt gat gag acg ctc cag gat ggc tgt gat act	8019
[0537]	Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr	
[0538]	2660	2665 2670
[0539]	cac ttc tgc aag gtc aat gag aga gga gag tac ttc tgg gag aag	8064
[0540]	His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys	
[0541]	2675	2680 2685
[0542]	agg gtc aca ggc tgc cca ccc ttt gat gaa cac aag tgt ctg gct	8109
[0543]	Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala	
[0544]	2690	2695 2700
[0545]	gag gga ggt aaa att atg aaa att cca ggc acc tgc tgt gac aca	8154

[0546]	Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr		
[0547]	2705	2710	2715
[0548]	tgt gag gag cct gag tgc aac gac atc act gcc agg ctg cag tat	8199	
[0549]	Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr		
[0550]	2720	2725	2730
[0551]	gtc aag gtg gga agc tgt aag tct gaa gta gag gtg gat atc cac	8244	
[0552]	Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His		
[0553]	2735	2740	2745
[0554]	tac tgc cag ggc aaa tgt gcc agc aaa gcc atg tac tcc att gac	8289	
[0555]	Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp		
[0556]	2750	2755	2760
[0557]	atc aac gat gtg cag gac cag tgc tcc tgc tgc tct ccg aca cgg	8334	
[0558]	Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg		
[0559]	2765	2770	2775
[0560]	acg gag ccc atg cag gtg gcc ctg cac tgc acc aat ggc tct gtt	8379	
[0561]	Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val		
[0562]	2780	2785	2790
[0563]	gtg tac cat gag gtt ctc aat gcc atg gag tgc aaa tgc tcc ccc	8424	
[0564]	Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro		
[0565]	2795	2800	2805
[0566]	agg aag tgc agc aag tga	8442	
[0567]	Arg Lys Cys Ser Lys		
[0568]	2810		
[0569]	<210> 2		
[0570]	<211> 2813		
[0571]	<212> PRT		
[0572]	<213> 智人		
[0573]	<400> 2		
[0574]	Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile		
[0575]	1	5	10
[0576]	Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr		
[0577]	20	25	30
[0578]	Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly		
[0579]	35	40	45
[0580]	Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly		
[0581]	50	55	60
[0582]	Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys		
[0583]	65	70	75
[0584]	Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu		

[0585]					85					90					95				
[0586]	Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Gln	Arg	Val	Ser	Met	Pro			
[0587]					100					105					110				
[0588]	Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Leu	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Lys			
[0589]					115					120					125				
[0590]	Leu	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly	Ser	Gly			
[0591]					130					135					140				
[0592]	Asn	Phe	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Cys	Gly			
[0593]					145					150					155				160
[0594]	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	Ile	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Phe	Met	Thr	Gln			
[0595]					165					170					175				
[0596]	Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala			
[0597]					180					185					190				
[0598]	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	Trp	Cys	Glu	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser			
[0599]					195					200					205				
[0600]	Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln			
[0601]					210					215					220				
[0602]	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu			
[0603]					225					230					235				240
[0604]	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu			
[0605]					245					250					255				
[0606]	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala			
[0607]					260					265					270				
[0608]	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Asp	His			
[0609]					275					280					285				
[0610]	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys			
[0611]					290					295					300				
[0612]	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Asn	Glu	Met			
[0613]					305					310					315				320
[0614]	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu			
[0615]					325					330					335				
[0616]	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	Pro	Cys	Val	His			
[0617]					340					345					350				
[0618]	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Cys	Asn			
[0619]					355					360					365				
[0620]	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	Asn	Glu	Glu	Cys			
[0621]					370					375					380				
[0622]	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	Lys	Ser	Phe	Asp			
[0623]					385					390					395				400

[0624]	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	Leu	Leu	Ala	Arg
[0625]					405					410					415	
[0626]	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu	Thr	Val	Gln	Cys
[0627]				420					425					430		
[0628]	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val	Thr	Val	Arg	Leu
[0629]			435					440					445			
[0630]	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His	Gly	Ala	Gly	Val
[0631]		450					455					460				
[0632]	Ala	Met	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu
[0633]	465					470					475				480	
[0634]	Arg	Ile	Gln	His	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	Ser	Tyr	Gly	Glu
[0635]				485					490					495		
[0636]	Asp	Leu	Gln	Met	Asp	Trp	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Lys	Leu
[0637]			500					505					510			
[0638]	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Tyr	Asn
[0639]			515					520					525			
[0640]	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Pro
[0641]		530					535					540				
[0642]	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	Gly	Asp	Cys	Gln
[0643]	545					550					555				560	
[0644]	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	Asn	Pro	Arg	Met
[0645]				565					570				575			
[0646]	Thr	Arg	Phe	Ser	Glu	Glu	Ala	Cys	Ala	Val	Leu	Thr	Ser	Pro	Thr	Phe
[0647]			580						585				590			
[0648]	Glu	Ala	Cys	His	Arg	Ala	Val	Ser	Pro	Leu	Pro	Tyr	Leu	Arg	Asn	Cys
[0649]		595					600					605				
[0650]	Arg	Tyr	Asp	Val	Cys	Ser	Cys	Ser	Asp	Gly	Arg	Glu	Cys	Leu	Cys	Gly
[0651]		610					615					620				
[0652]	Ala	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ala	Ala	Ala	Cys	Ala	Gly	Arg	Gly	Val	Arg	Val
[0653]	625					630					635				640	
[0654]	Ala	Trp	Arg	Glu	Pro	Gly	Arg	Cys	Glu	Leu	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly	Gln
[0655]				645					650				655			
[0656]	Val	Tyr	Leu	Gln	Cys	Gly	Thr	Pro	Cys	Asn	Leu	Thr	Cys	Arg	Ser	Leu
[0657]			660						665				670			
[0658]	Ser	Tyr	Pro	Asp	Glu	Glu	Cys	Asn	Glu	Ala	Cys	Leu	Glu	Gly	Cys	Phe
[0659]			675						680				685			
[0660]	Cys	Pro	Pro	Gly	Leu	Tyr	Met	Asp	Glu	Arg	Gly	Asp	Cys	Val	Pro	Lys
[0661]		690						695				700				
[0662]	Ala	Gln	Cys	Pro	Cys	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Glu	Ile	Phe	Gln	Pro	Glu	Asp

[0663]	705	710	715	720
[0664]	Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met			
[0665]		725	730	735
[0666]	His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val			
[0667]		740	745	750
[0668]	Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg			
[0669]		755	760	765
[0670]	Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu			
[0671]		770	775	780
[0672]	Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met			
[0673]	785	790	795	800
[0674]	Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg			
[0675]		805	810	815
[0676]	His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln			
[0677]		820	825	830
[0678]	Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr			
[0679]		835	840	845
[0680]	Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp			
[0681]		850	855	860
[0682]	Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly			
[0683]	865	870	875	880
[0684]	Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp			
[0685]		885	890	895
[0686]	Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys			
[0687]		900	905	910
[0688]	Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu			
[0689]		915	920	925
[0690]	Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys			
[0691]		930	935	940
[0692]	Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg			
[0693]	945	950	955	960
[0694]	Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg			
[0695]		965	970	975
[0696]	His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val			
[0697]		980	985	990
[0698]	Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr			
[0699]		995	1000	1005
[0700]	Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn			
[0701]		1010	1015	1020

[0702]	Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro
[0703]	1025 1030 1035
[0704]	Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln
[0705]	1040 1045 1050
[0706]	Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe
[0707]	1055 1060 1065
[0708]	Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
[0709]	1070 1075 1080
[0710]	Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala
[0711]	1085 1090 1095
[0712]	Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln
[0713]	1100 1105 1110
[0714]	His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln
[0715]	1115 1120 1125
[0716]	Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu
[0717]	1130 1135 1140
[0718]	Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
[0719]	1145 1150 1155
[0720]	His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
[0721]	1160 1165 1170
[0722]	His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln
[0723]	1175 1180 1185
[0724]	Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly
[0725]	1190 1195 1200
[0726]	Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp
[0727]	1205 1210 1215
[0728]	Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr
[0729]	1220 1225 1230
[0730]	Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr
[0731]	1235 1240 1245
[0732]	Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser
[0733]	1250 1255 1260
[0734]	Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu
[0735]	1265 1270 1275
[0736]	Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe
[0737]	1280 1285 1290
[0738]	Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg
[0739]	1295 1300 1305
[0740]	Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp

[0741]	1310	1315	1320
[0742]	Gly Ser His Ala Tyr Ile	Gly Leu Lys Asp Arg	Lys Arg Pro Ser
[0743]	1325	1330	1335
[0744]	Glu Leu Arg Arg Ile Ala	Ser Gln Val Lys Tyr	Ala Gly Ser Gln
[0745]	1340	1345	1350
[0746]	Val Ala Ser Thr Ser Glu	Val Leu Lys Tyr Thr	Leu Phe Gln Ile
[0747]	1355	1360	1365
[0748]	Phe Ser Lys Ile Asp Arg	Pro Glu Ala Ser Arg	Ile Ala Leu Leu
[0749]	1370	1375	1380
[0750]	Leu Met Ala Ser Gln Glu	Pro Gln Arg Met Ser	Arg Asn Phe Val
[0751]	1385	1390	1395
[0752]	Arg Tyr Val Gln Gly Leu	Lys Lys Lys Lys Val	Ile Val Ile Pro
[0753]	1400	1405	1410
[0754]	Val Gly Ile Gly Pro His	Ala Asn Leu Lys Gln	Ile Arg Leu Ile
[0755]	1415	1420	1425
[0756]	Glu Lys Gln Ala Pro Glu	Asn Lys Ala Phe Val	Leu Ser Ser Val
[0757]	1430	1435	1440
[0758]	Asp Glu Leu Glu Gln Gln	Arg Asp Glu Ile Val	Ser Tyr Leu Cys
[0759]	1445	1450	1455
[0760]	Asp Leu Ala Pro Glu Ala	Pro Pro Pro Thr Leu	Pro Pro His Met
[0761]	1460	1465	1470
[0762]	Ala Gln Val Thr Val Gly	Pro Gly Leu Leu Gly	Val Ser Thr Leu
[0763]	1475	1480	1485
[0764]	Gly Pro Lys Arg Asn Ser	Met Val Leu Asp Val	Ala Phe Val Leu
[0765]	1490	1495	1500
[0766]	Glu Gly Ser Asp Lys Ile	Gly Glu Ala Asp Phe	Asn Arg Ser Lys
[0767]	1505	1510	1515
[0768]	Glu Phe Met Glu Glu Val	Ile Gln Arg Met Asp	Val Gly Gln Asp
[0769]	1520	1525	1530
[0770]	Ser Ile His Val Thr Val	Leu Gln Tyr Ser Tyr	Met Val Thr Val
[0771]	1535	1540	1545
[0772]	Glu Tyr Pro Phe Ser Glu	Ala Gln Ser Lys Gly	Asp Ile Leu Gln
[0773]	1550	1555	1560
[0774]	Arg Val Arg Glu Ile Arg	Tyr Gln Gly Gly Asn	Arg Thr Asn Thr
[0775]	1565	1570	1575
[0776]	Gly Leu Ala Leu Arg Tyr	Leu Ser Asp His Ser	Phe Leu Val Ser
[0777]	1580	1585	1590
[0778]	Gln Gly Asp Arg Glu Gln	Ala Pro Asn Leu Val	Tyr Met Val Thr
[0779]	1595	1600	1605

[0780]	Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile
[0781]	1610 1615 1620
[0782]	Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu
[0783]	1625 1630 1635
[0784]	Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp
[0785]	1640 1645 1650
[0786]	Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg
[0787]	1655 1660 1665
[0788]	Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala
[0789]	1670 1675 1680
[0790]	Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly
[0791]	1685 1690 1695
[0792]	Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe
[0793]	1700 1705 1710
[0794]	Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr
[0795]	1715 1720 1725
[0796]	Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val
[0797]	1730 1735 1740
[0798]	Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val
[0799]	1745 1750 1755
[0800]	Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala
[0801]	1760 1765 1770
[0802]	Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala
[0803]	1775 1780 1785
[0804]	Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
[0805]	1790 1795 1800
[0806]	Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn
[0807]	1805 1810 1815
[0808]	Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala
[0809]	1820 1825 1830
[0810]	Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val
[0811]	1835 1840 1845
[0812]	Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu
[0813]	1850 1855 1860
[0814]	Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile
[0815]	1865 1870 1875
[0816]	Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp
[0817]	1880 1885 1890
[0818]	Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly

[0819]	1895	1900	1905
[0820]	Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu		
[0821]	1910	1915	1920
[0822]	Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu		
[0823]	1925	1930	1935
[0824]	Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr Gly Ser		
[0825]	1940	1945	1950
[0826]	Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe Lys Leu		
[0827]	1955	1960	1965
[0828]	Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu Gln Asp		
[0829]	1970	1975	1980
[0830]	Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly Ala Arg		
[0831]	1985	1990	1995
[0832]	Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala Leu Ser		
[0833]	2000	2005	2010
[0834]	Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly Arg Leu		
[0835]	2015	2020	2025
[0836]	Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn Val Tyr		
[0837]	2030	2035	2040
[0838]	Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly His Ile		
[0839]	2045	2050	2055
[0840]	Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln Leu Ser		
[0841]	2060	2065	2070
[0842]	Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys		
[0843]	2075	2080	2085
[0844]	Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val		
[0845]	2090	2095	2100
[0846]	Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg		
[0847]	2105	2110	2115
[0848]	Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys Leu Val		
[0849]	2120	2125	2130
[0850]	Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala		
[0851]	2135	2140	2145
[0852]	Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys		
[0853]	2150	2155	2160
[0854]	Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala		
[0855]	2165	2170	2175
[0856]	Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp		
[0857]	2180	2185	2190

[0858]	Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val
[0859]	2195 2200 2205
[0860]	Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn
[0861]	2210 2215 2220
[0862]	Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro
[0863]	2225 2230 2235
[0864]	Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala
[0865]	2240 2245 2250
[0866]	Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu
[0867]	2255 2260 2265
[0868]	Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys
[0869]	2270 2275 2280
[0870]	Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr
[0871]	2285 2290 2295
[0872]	Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg
[0873]	2300 2305 2310
[0874]	Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
[0875]	2315 2320 2325
[0876]	Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly
[0877]	2330 2335 2340
[0878]	Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe
[0879]	2345 2350 2355
[0880]	Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro
[0881]	2360 2365 2370
[0882]	Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys
[0883]	2375 2380 2385
[0884]	Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val
[0885]	2390 2395 2400
[0886]	Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys
[0887]	2405 2410 2415
[0888]	Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His
[0889]	2420 2425 2430
[0890]	Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys
[0891]	2435 2440 2445
[0892]	Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu
[0893]	2450 2455 2460
[0894]	Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg
[0895]	2465 2470 2475
[0896]	Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg

[0897]	2480	2485	2490
[0898]	Cys Leu Pro Ser Ala Cys	Glu Val Val Thr Gly	Ser Pro Arg Gly
[0899]	2495	2500	2505
[0900]	Asp Ser Gln Ser Ser Trp	Lys Ser Val Gly Ser	Gln Trp Ala Ser
[0901]	2510	2515	2520
[0902]	Pro Glu Asn Pro Cys Leu	Ile Asn Glu Cys Val	Arg Val Lys Glu
[0903]	2525	2530	2535
[0904]	Glu Val Phe Ile Gln Gln	Arg Asn Val Ser Cys	Pro Gln Leu Glu
[0905]	2540	2545	2550
[0906]	Val Pro Val Cys Pro Ser	Gly Phe Gln Leu Ser	Cys Lys Thr Ser
[0907]	2555	2560	2565
[0908]	Ala Cys Cys Pro Ser Cys	Arg Cys Glu Arg Met	Glu Ala Cys Met
[0909]	2570	2575	2580
[0910]	Leu Asn Gly Thr Val Ile	Gly Pro Gly Lys Thr	Val Met Ile Asp
[0911]	2585	2590	2595
[0912]	Val Cys Thr Thr Cys Arg	Cys Met Val Gln Val	Gly Val Ile Ser
[0913]	2600	2605	2610
[0914]	Gly Phe Lys Leu Glu Cys	Arg Lys Thr Thr Cys	Asn Pro Cys Pro
[0915]	2615	2620	2625
[0916]	Leu Gly Tyr Lys Glu Glu	Asn Asn Thr Gly Glu	Cys Cys Gly Arg
[0917]	2630	2635	2640
[0918]	Cys Leu Pro Thr Ala Cys	Thr Ile Gln Leu Arg	Gly Gly Gln Ile
[0919]	2645	2650	2655
[0920]	Met Thr Leu Lys Arg Asp	Glu Thr Leu Gln Asp	Gly Cys Asp Thr
[0921]	2660	2665	2670
[0922]	His Phe Cys Lys Val Asn	Glu Arg Gly Glu Tyr	Phe Trp Glu Lys
[0923]	2675	2680	2685
[0924]	Arg Val Thr Gly Cys Pro	Pro Phe Asp Glu His	Lys Cys Leu Ala
[0925]	2690	2695	2700
[0926]	Glu Gly Gly Lys Ile Met	Lys Ile Pro Gly Thr	Cys Cys Asp Thr
[0927]	2705	2710	2715
[0928]	Cys Glu Glu Pro Glu Cys	Asn Asp Ile Thr Ala	Arg Leu Gln Tyr
[0929]	2720	2725	2730
[0930]	Val Lys Val Gly Ser Cys	Lys Ser Glu Val Glu	Val Asp Ile His
[0931]	2735	2740	2745
[0932]	Tyr Cys Gln Gly Lys Cys	Ala Ser Lys Ala Met	Tyr Ser Ile Asp
[0933]	2750	2755	2760
[0934]	Ile Asn Asp Val Gln Asp	Gln Cys Ser Cys Cys	Ser Pro Thr Arg
[0935]	2765	2770	2775

[0936]	Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val
[0937]	2780 2785 2790
[0938]	Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
[0939]	2795 2800 2805
[0940]	Arg Lys Cys Ser Lys
[0941]	2810
[0942]	<210> 3
[0943]	<211> 30
[0944]	<212> DNA
[0945]	<213> 人工序列
[0946]	<220>
[0947]	<223> PCR引物VWF+
[0948]	<400> 3
[0949]	ttcgaattcc cgcagccctc atttgcagg 30
[0950]	<210> 4
[0951]	<211> 31
[0952]	<212> DNA
[0953]	<213> Artificial Sequence
[0954]	<220>
[0955]	<223> PCR引物VWF-
[0956]	<400> 4
[0957]	tccgaattcc ggcagcagca ggcacccatg c 31
[0958]	<210> 5
[0959]	<211> 30
[0960]	<212> DNA
[0961]	<213> 人工序列
[0962]	<220>
[0963]	<223> PCR引物 VWFT2298Q+
[0964]	<400> 5
[0965]	gcagccctgc ccccaggcca aagctccac 30
[0966]	<210> 6
[0967]	<211> 30
[0968]	<212> DNA
[0969]	<213> 人工序列
[0970]	<220>
[0971]	<223> PCR引物VWFT2298Q-
[0972]	<400> 6
[0973]	gtgggagctt tggcctgggg gcagggctgc 30
[0974]	<210> 7

[0975]	<211>	28
[0976]	<212>	DNA
[0977]	<213>	人工序列
[0978]	<220>	
[0979]	<223>	PCR引物HA+
[0980]	<400>	7
[0981]	ggatccgatg cacacaagag tgaggttg	28
[0982]	<210>	8
[0983]	<211>	31
[0984]	<212>	DNA
[0985]	<213>	人工序列
[0986]	<220>	
[0987]	<223>	PCR引物HA-
[0988]	<400>	8
[0989]	gcggccgcct ataagcctaa ggcagcttga c	31
[0990]	<210>	9
[0991]	<211>	686
[0992]	<212>	PRT
[0993]	<213>	人工序列
[0994]	<220>	
[0995]	<223>	信号肽(1-22); VWF片段aa 2276至2326 (23 - 73); 甘氨酸/丝氨酸接头(74 - 101); 白蛋白(102 - 686)
[0996]	<400>	9
[0997]	Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile	
[0998]	1 5 10 15	
[0999]	Leu Pro Gly Thr Leu Cys Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser	
[1000]	20 25 30	
[1001]	Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala	
[1002]	35 40 45	
[1003]	Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp	
[1004]	50 55 60	
[1005]	Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly	
[1006]	65 70 75 80	
[1007]	Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser	
[1008]	85 90 95	
[1009]	Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe	
[1010]	100 105 110	
[1011]	Lys Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe	
[1012]	115 120 125	

[1013]	Ala	Gln	Tyr	Leu	Gln	Gln	Cys	Pro	Phe	Glu	Asp	His	Val	Lys	Leu	Val
[1014]	130						135							140		
[1015]	Asn	Glu	Val	Thr	Glu	Phe	Ala	Lys	Thr	Cys	Val	Ala	Asp	Glu	Ser	Ala
[1016]	145						150					155				160
[1017]	Glu	Asn	Cys	Asp	Lys	Ser	Leu	His	Thr	Leu	Phe	Gly	Asp	Lys	Leu	Cys
[1018]					165					170					175	
[1019]	Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Gly	Glu	Met	Ala	Asp	Cys	Cys
[1020]					180					185					190	
[1021]	Ala	Lys	Gln	Glu	Pro	Glu	Arg	Asn	Glu	Cys	Phe	Leu	Gln	His	Lys	Asp
[1022]			195					200						205		
[1023]	Asp	Asn	Pro	Asn	Leu	Pro	Arg	Leu	Val	Arg	Pro	Glu	Val	Asp	Val	Met
[1024]	210						215					220				
[1025]	Cys	Thr	Ala	Phe	His	Asp	Asn	Glu	Glu	Thr	Phe	Leu	Lys	Lys	Tyr	Leu
[1026]	225					230					235					240
[1027]	Tyr	Glu	Ile	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Tyr	Phe	Tyr	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu
[1028]					245					250					255	
[1029]	Phe	Phe	Ala	Lys	Arg	Tyr	Lys	Ala	Ala	Phe	Thr	Glu	Cys	Cys	Gln	Ala
[1030]				260					265						270	
[1031]	Ala	Asp	Lys	Ala	Ala	Cys	Leu	Leu	Pro	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg	Asp
[1032]			275						280					285		
[1033]	Glu	Gly	Lys	Ala	Ser	Ser	Ala	Lys	Gln	Arg	Leu	Lys	Cys	Ala	Ser	Leu
[1034]	290						295						300			
[1035]	Gln	Lys	Phe	Gly	Glu	Arg	Ala	Phe	Lys	Ala	Trp	Ala	Val	Ala	Arg	Leu
[1036]	305					310					315					320
[1037]	Ser	Gln	Arg	Phe	Pro	Lys	Ala	Glu	Phe	Ala	Glu	Val	Ser	Lys	Leu	Val
[1038]					325					330					335	
[1039]	Thr	Asp	Leu	Thr	Lys	Val	His	Thr	Glu	Cys	Cys	His	Gly	Asp	Leu	Leu
[1040]				340						345					350	
[1041]	Glu	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Cys	Glu	Asn
[1042]			355						360					365		
[1043]	Gln	Asp	Ser	Ile	Ser	Ser	Lys	Leu	Lys	Glu	Cys	Cys	Glu	Lys	Pro	Leu
[1044]	370						375						380			
[1045]	Leu	Glu	Lys	Ser	His	Cys	Ile	Ala	Glu	Val	Glu	Asn	Asp	Glu	Met	Pro
[1046]	385					390						395				400
[1047]	Ala	Asp	Leu	Pro	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Phe	Val	Glu	Ser	Lys	Asp	Val
[1048]					405					410					415	
[1049]	Cys	Lys	Asn	Tyr	Ala	Glu	Ala	Lys	Asp	Val	Phe	Leu	Gly	Met	Phe	Leu
[1050]				420					425					430		
[1051]	Tyr	Glu	Tyr	Ala	Arg	Arg	His	Pro	Asp	Tyr	Ser	Val	Val	Leu	Leu	Leu

[1052]	435	440	445
[1053]	Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala		
[1054]	450	455	460
[1055]	Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro		
[1056]	465	470	475 480
[1057]	Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe		
[1058]	485	490	495
[1059]	Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr		
[1060]	500	505	510
[1061]	Thr Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser		
[1062]	515	520	525
[1063]	Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala		
[1064]	530	535	540
[1065]	Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln		
[1066]	545	550	555 560
[1067]	Leu Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys		
[1068]	565	570	575
[1069]	Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu		
[1070]	580	585	590
[1071]	Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe		
[1072]	595	600	605
[1073]	Thr Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile		
[1074]	610	615	620
[1075]	Lys Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala		
[1076]	625	630	635 640
[1077]	Thr Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val		
[1078]	645	650	655
[1079]	Glu Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu		
[1080]	660	665	670
[1081]	Gly Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu		
[1082]	675	680	685
[1083]	<210> 10		
[1084]	<211> 74		
[1085]	<212> PRT		
[1086]	<213> 人工序列		
[1087]	<220>		
[1088]	<223> 在T2298具有突变的经修饰的VWF的C1结构域		
[1089]	<220>		
[1090]	<221> MISC_FEATURE		

[1091]	<222> (44) .. (44)
[1092]	<223> Xaa不存在或是除了苏氨酸和丝氨酸之外的氨基酸
[1093]	<400> 10
[1094]	Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala
[1095]	1 5 10 15
[1096]	Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly
[1097]	20 25 30
[1098]	Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Xaa Ala Lys Ala Pro
[1099]	35 40 45
[1100]	Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln
[1101]	50 55 60
[1102]	Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp
[1103]	65 70
[1104]	<210> 11
[1105]	<211> 2050
[1106]	<212> PRT
[1107]	<213> 人工序列
[1108]	<220>
[1109]	<223> 在T2298具有突变的经修饰的VWF的成熟形式
[1110]	<220>
[1111]	<221> MISC_FEATURE
[1112]	<222> (1535) .. (1535)
[1113]	<223> Xaa不存在或是除了苏氨酸和丝氨酸之外的氨基酸
[1114]	<400> 11
[1115]	Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
[1116]	1 5 10 15
[1117]	Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
[1118]	20 25 30
[1119]	Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
[1120]	35 40 45
[1121]	Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
[1122]	50 55 60
[1123]	Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
[1124]	65 70 75 80
[1125]	Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
[1126]	85 90 95
[1127]	Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
[1128]	100 105 110
[1129]	Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr

[1130]	115	120	125
[1131]	Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile		
[1132]	130	135	140
[1133]	Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys		
[1134]	145	150	155
[1135]	Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly		
[1136]	165	170	175
[1137]	Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val		
[1138]	180	185	190
[1139]	Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser		
[1140]	195	200	205
[1141]	Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr		
[1142]	210	215	220
[1143]	Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln		
[1144]	225	230	235
[1145]	Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val		
[1146]	245	250	255
[1147]	Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg		
[1148]	260	265	270
[1149]	Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met		
[1150]	275	280	285
[1151]	Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val		
[1152]	290	295	300
[1153]	Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val		
[1154]	305	310	315
[1155]	Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys		
[1156]	325	330	335
[1157]	Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly		
[1158]	340	345	350
[1159]	Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu		
[1160]	355	360	365
[1161]	Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn		
[1162]	370	375	380
[1163]	Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu		
[1164]	385	390	395
[1165]	Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro		
[1166]	405	410	415
[1167]	Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp		
[1168]	420	425	430

[1169]	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly	Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys
[1170]				435				440					445			
[1171]	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile	Cys	His	Cys
[1172]			450				455				460					
[1173]	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro	Gly	Gly	Leu
[1174]	465					470				475						480
[1175]	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro	Thr	Thr	Leu	Tyr	Val
[1176]					485					490					495	
[1177]	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp	Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu
[1178]				500					505					510		
[1179]	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala
[1180]			515					520				525				
[1181]	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe	Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu
[1182]		530					535				540					
[1183]	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val	Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp
[1184]	545					550				555						560
[1185]	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile	Gly	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys	Arg	Pro	Ser	Glu
[1186]				565						570					575	
[1187]	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala	Ser	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ser	Gln	Val	Ala
[1188]				580						585				590		
[1189]	Ser	Thr	Ser	Glu	Val	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu	Phe	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys
[1190]			595					600				605				
[1191]	Ile	Asp	Arg	Pro	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile	Ala	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Ser
[1192]		610						615				620				
[1193]	Gln	Glu	Pro	Gln	Arg	Met	Ser	Arg	Asn	Phe	Val	Arg	Tyr	Val	Gln	Gly
[1194]	625					630				635						640
[1195]	Leu	Lys	Lys	Lys	Lys	Val	Ile	Val	Ile	Pro	Val	Gly	Ile	Gly	Pro	His
[1196]				645						650					655	
[1197]	Ala	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Arg	Leu	Ile	Glu	Lys	Gln	Ala	Pro	Glu	Asn
[1198]				660						665				670		
[1199]	Lys	Ala	Phe	Val	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Glu	Leu	Glu	Gln	Gln	Arg	Asp
[1200]			675					680				685				
[1201]	Glu	Ile	Val	Ser	Tyr	Leu	Cys	Asp	Leu	Ala	Pro	Glu	Ala	Pro	Pro	Pro
[1202]		690						695				700				
[1203]	Thr	Leu	Pro	Pro	His	Met	Ala	Gln	Val	Thr	Val	Gly	Pro	Gly	Leu	Leu
[1204]	705					710				715						720
[1205]	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Gly	Pro	Lys	Arg	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Asp	Val
[1206]				725						730				735		
[1207]	Ala	Phe	Val	Leu	Glu	Gly	Ser	Asp	Lys	Ile	Gly	Glu	Ala	Asp	Phe	Asn

[1208]	740	745	750
[1209]	Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly		
[1210]	755	760	765
[1211]	Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr		
[1212]	770	775	780
[1213]	Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln		
[1214]	785	790	795
[1215]	Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly		
[1216]	805	810	815
[1217]	Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly		
[1218]	820	825	830
[1219]	Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro		
[1220]	835	840	845
[1221]	Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro		
[1222]	850	855	860
[1223]	Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly		
[1224]	865	870	875
[1225]	Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg		
[1226]	885	890	895
[1227]	Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu		
[1228]	900	905	910
[1229]	Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp		
[1230]	915	920	925
[1231]	Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe		
[1232]	930	935	940
[1233]	Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile		
[1234]	945	950	955
[1235]	Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr		
[1236]	965	970	975
[1237]	Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu		
[1238]	980	985	990
[1239]	Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly		
[1240]	995	1000	1005
[1241]	Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His		
[1242]	1010	1015	1020
[1243]	Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr		
[1244]	1025	1030	1035
[1245]	Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg		
[1246]	1040	1045	1050

[1247]	Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr
[1248]	1055 1060 1065
[1249]	Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser
[1250]	1070 1075 1080
[1251]	Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val
[1252]	1085 1090 1095
[1253]	Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val
[1254]	1100 1105 1110
[1255]	Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp
[1256]	1115 1120 1125
[1257]	Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro
[1258]	1130 1135 1140
[1259]	Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg
[1260]	1145 1150 1155
[1261]	Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val
[1262]	1160 1165 1170
[1263]	Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr
[1264]	1175 1180 1185
[1265]	Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe
[1266]	1190 1195 1200
[1267]	Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu
[1268]	1205 1210 1215
[1269]	Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly
[1270]	1220 1225 1230
[1271]	Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala
[1272]	1235 1240 1245
[1273]	Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly
[1274]	1250 1255 1260
[1275]	Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn
[1276]	1265 1270 1275
[1277]	Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly
[1278]	1280 1285 1290
[1279]	His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln
[1280]	1295 1300 1305
[1281]	Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly
[1282]	1310 1315 1320
[1283]	Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly
[1284]	1325 1330 1335
[1285]	Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val

[1286]	1340	1345	1350
[1287]	Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys		
[1288]	1355	1360	1365
[1289]	Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu		
[1290]	1370	1375	1380
[1291]	Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala		
[1292]	1385	1390	1395
[1293]	Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val		
[1294]	1400	1405	1410
[1295]	Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val		
[1296]	1415	1420	1425
[1297]	Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser		
[1298]	1430	1435	1440
[1299]	Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp		
[1300]	1445	1450	1455
[1301]	Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe		
[1302]	1460	1465	1470
[1303]	Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu		
[1304]	1475	1480	1485
[1305]	Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln		
[1306]	1490	1495	1500
[1307]	Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys		
[1308]	1505	1510	1515
[1309]	Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys		
[1310]	1520	1525	1530
[1311]	Pro Xaa Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg		
[1312]	1535	1540	1545
[1313]	Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val		
[1314]	1550	1555	1560
[1315]	Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu		
[1316]	1565	1570	1575
[1317]	Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro		
[1318]	1580	1585	1590
[1319]	Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser		
[1320]	1595	1600	1605
[1321]	Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr		
[1322]	1610	1615	1620
[1323]	Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser		
[1324]	1625	1630	1635

[1325]	Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn
[1326]	1640 1645 1650
[1327]	Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys
[1328]	1655 1660 1665
[1329]	Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu
[1330]	1670 1675 1680
[1331]	Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met
[1332]	1685 1690 1695
[1333]	Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser
[1334]	1700 1705 1710
[1335]	Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys
[1336]	1715 1720 1725
[1337]	Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro
[1338]	1730 1735 1740
[1339]	Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp
[1340]	1745 1750 1755
[1341]	Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val
[1342]	1760 1765 1770
[1343]	Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln
[1344]	1775 1780 1785
[1345]	Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys
[1346]	1790 1795 1800
[1347]	Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala
[1348]	1805 1810 1815
[1349]	Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met
[1350]	1820 1825 1830
[1351]	Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val
[1352]	1835 1840 1845
[1353]	Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro
[1354]	1850 1855 1860
[1355]	Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys
[1356]	1865 1870 1875
[1357]	Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly
[1358]	1880 1885 1890
[1359]	Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys
[1360]	1895 1900 1905
[1361]	Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp
[1362]	1910 1915 1920
[1363]	Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys

[1364]	1925	1930	1935
[1365]	Leu Ala Glu Gly Gly Lys	Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys	
[1366]	1940	1945	1950
[1367]	Asp Thr Cys Glu Glu Pro	Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu	
[1368]	1955	1960	1965
[1369]	Gln Tyr Val Lys Val Gly	Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp	
[1370]	1970	1975	1980
[1371]	Ile His Tyr Cys Gln Gly	Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser	
[1372]	1985	1990	1995
[1373]	Ile Asp Ile Asn Asp Val	Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro	
[1374]	2000	2005	2010
[1375]	Thr Arg Thr Glu Pro Met	Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly	
[1376]	2015	2020	2025
[1377]	Ser Val Val Tyr His Glu	Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys	
[1378]	2030	2035	2040
[1379]	Ser Pro Arg Lys Cys Ser	Lys	
[1380]	2045	2050	
[1381]	<210> 12		
[1382]	<211> 1444		
[1383]	<212> PRT		
[1384]	<213> 人工序列		
[1385]	<220>		
[1386]	<223> 单链FVIII		
[1387]	<400> 12		
[1388]	Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr	Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr	
[1389]	1	5	10
[1390]	Met Gln Ser Asp Leu Gly	Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro	
[1391]	20	25	30
[1392]	Arg Val Pro Lys Ser Phe	Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys	
[1393]	35	40	45
[1394]	Thr Leu Phe Val Glu Phe	Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro	
[1395]	50	55	60
[1396]	Arg Pro Pro Trp Met Gly	Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val	
[1397]	65	70	75
[1398]	Tyr Asp Thr Val Val Ile	Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val	
[1399]	85	90	95
[1400]	Ser Leu His Ala Val Gly	Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala	
[1401]	100	105	110
[1402]	Glu Tyr Asp Asp Gln Thr	Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val	

[1403]	115	120	125
[1404]	Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn		
[1405]	130	135	140
[1406]	Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser		
[1407]	145	150	155
[1408]	His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu		
[1409]	165	170	175
[1410]	Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu		
[1411]	180	185	190
[1412]	His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp		
[1413]	195	200	205
[1414]	His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser		
[1415]	210	215	220
[1416]	Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg		
[1417]	225	230	235
[1418]	Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His		
[1419]	245	250	255
[1420]	Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu		
[1421]	260	265	270
[1422]	Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile		
[1423]	275	280	285
[1424]	Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly		
[1425]	290	295	300
[1426]	Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met		
[1427]	305	310	315
[1428]	Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg		
[1429]	325	330	335
[1430]	Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp		
[1431]	340	345	350
[1432]	Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe		
[1433]	355	360	365
[1434]	Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His		
[1435]	370	375	380
[1436]	Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu		
[1437]	385	390	395
[1438]	Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro		
[1439]	405	410	415
[1440]	Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr		
[1441]	420	425	430

[1442]	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile
[1443]				435				440					445			
[1444]	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile
[1445]			450					455					460			
[1446]	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile
[1447]	465						470					475				480
[1448]	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys
[1449]					485					490					495	
[1450]	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys
[1451]				500					505					510		
[1452]	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys
[1453]			515					520					525			
[1454]	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala
[1455]		530					535					540				
[1456]	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp
[1457]	545					550					555					560
[1458]	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe
[1459]				565						570					575	
[1460]	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln
[1461]			580						585					590		
[1462]	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe
[1463]		595					600						605			
[1464]	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser
[1465]		610				615						620				
[1466]	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu
[1467]	625					630					635					640
[1468]	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr
[1469]				645					650					655		
[1470]	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro
[1471]			660						665					670		
[1472]	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp
[1473]			675					680					685			
[1474]	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala
[1475]		690					695					700				
[1476]	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu
[1477]	705					710					715					720
[1478]	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala
[1479]				725					730					735		
[1480]	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg

[1481]		740		745		750													
[1482]	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Thr	Thr	Leu	Gln			
[1483]			755						760					765					
[1484]	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met			
[1485]			770						775					780					
[1486]	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro			
[1487]		785					790					795				800			
[1488]	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu			
[1489]					805					810					815				
[1490]	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn			
[1491]					820					825				830					
[1492]	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln			
[1493]					835					840				845					
[1494]	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu			
[1495]					850					855				860					
[1496]	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu			
[1497]		865					870					875				880			
[1498]	Asp	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser			
[1499]					885					890				895					
[1500]	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala			
[1501]					900					905				910					
[1502]	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe			
[1503]					915					920				925					
[1504]	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys			
[1505]			930					935				940							
[1506]	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His			
[1507]		945					950					955				960			
[1508]	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn			
[1509]					965					970				975					
[1510]	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe			
[1511]					980					985				990					
[1512]	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu			
[1513]					995					1000				1005					
[1514]	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr				
[1515]					1010					1015				1020					
[1516]	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met				
[1517]					1025					1030				1035					
[1518]	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg				
[1519]					1040					1045				1050					

[1520]	Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile		
[1521]	1055	1060	1065
[1522]	His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr		
[1523]	1070	1075	1080
[1524]	Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val		
[1525]	1085	1090	1095
[1526]	Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu		
[1527]	1100	1105	1110
[1528]	Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val		
[1529]	1115	1120	1125
[1530]	Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His		
[1531]	1130	1135	1140
[1532]	Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp		
[1533]	1145	1150	1155
[1534]	Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala		
[1535]	1160	1165	1170
[1536]	Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu		
[1537]	1175	1180	1185
[1538]	Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln		
[1539]	1190	1195	1200
[1540]	Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser		
[1541]	1205	1210	1215
[1542]	Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly		
[1543]	1220	1225	1230
[1544]	Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys		
[1545]	1235	1240	1245
[1546]	His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu		
[1547]	1250	1255	1260
[1548]	His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu		
[1549]	1265	1270	1275
[1550]	Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu		
[1551]	1280	1285	1290
[1552]	Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe		
[1553]	1295	1300	1305
[1554]	Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His		
[1555]	1310	1315	1320
[1556]	Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro		
[1557]	1325	1330	1335
[1558]	Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr		

[1559]	1340	1345	1350
[1560]	Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr		
[1561]	1355	1360	1365
[1562]	Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp		
[1563]	1370	1375	1380
[1564]	Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn		
[1565]	1385	1390	1395
[1566]	Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu		
[1567]	1400	1405	1410
[1568]	Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln		
[1569]	1415	1420	1425
[1570]	Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu		
[1571]	1430	1435	1440
[1572]	Tyr		

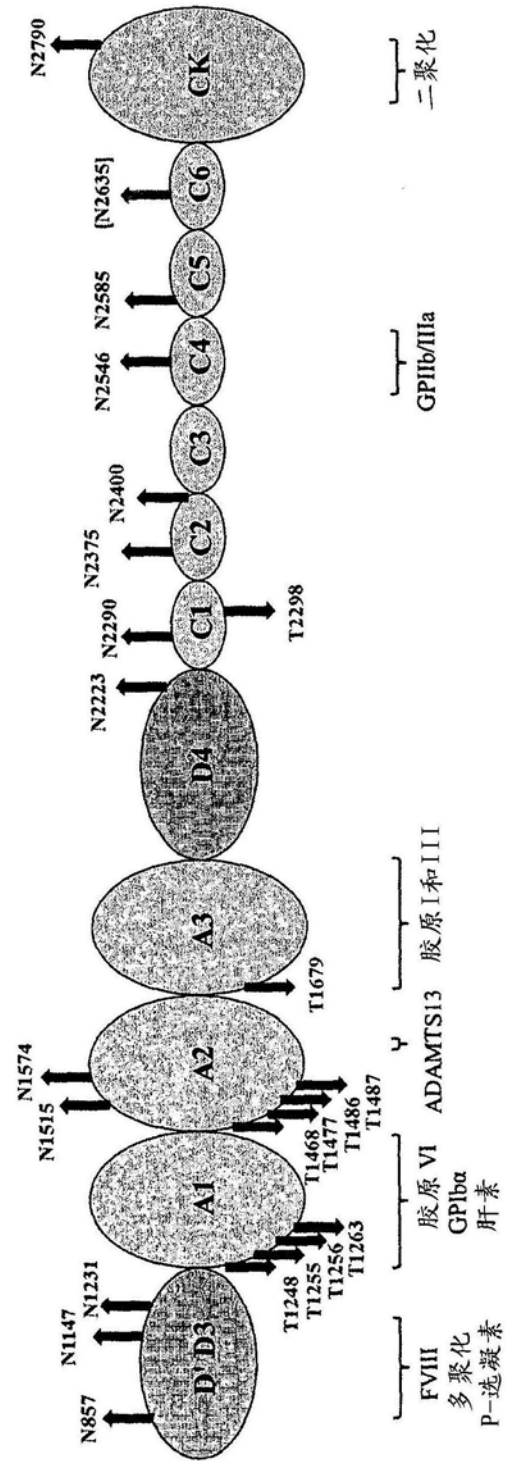


图1

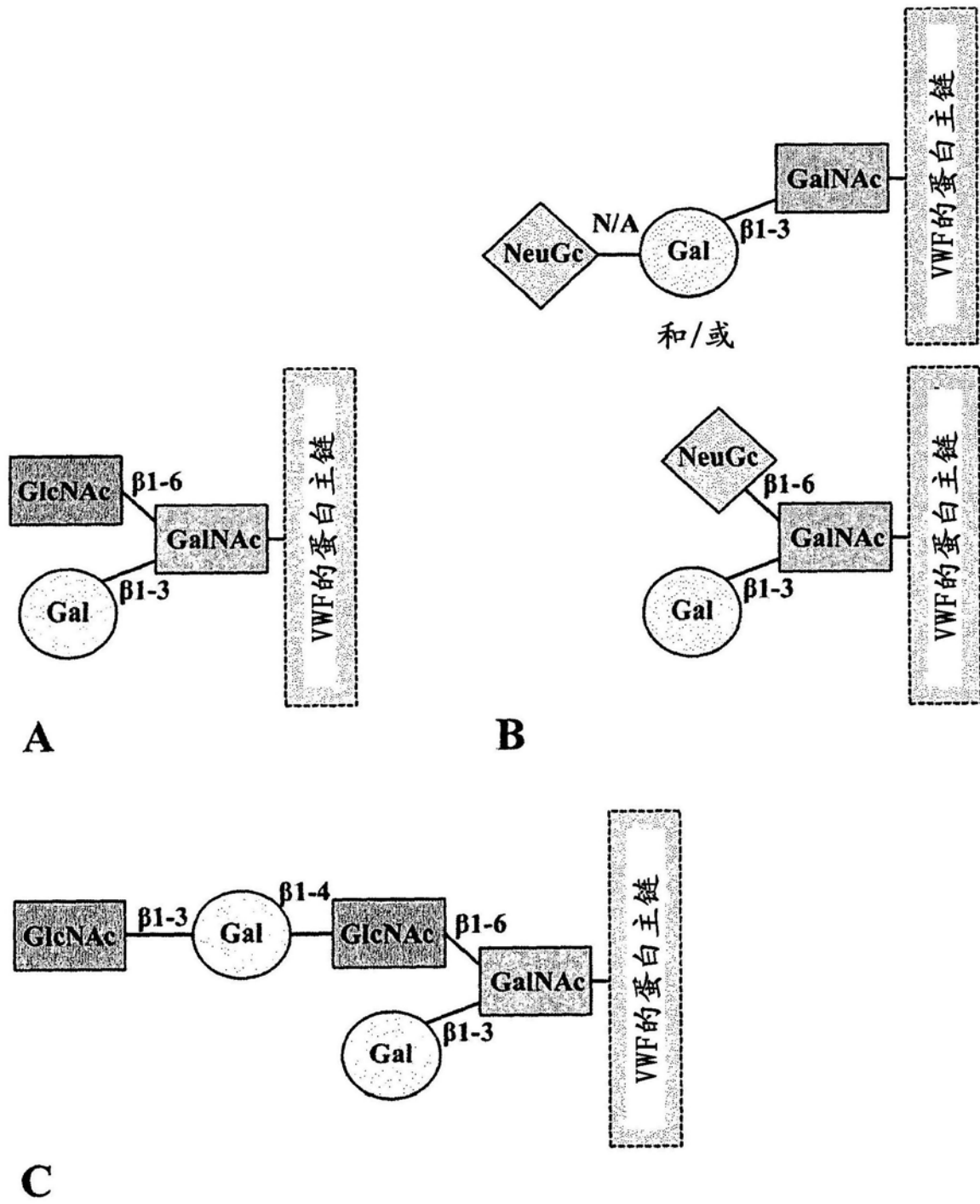


图2