(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 103068854 A
(43)申请公布日 2013.04.24

(21)申请号 201180027707.6
(22)申请日 2011.06.07
(30)优先权数据
10-2010-0052719 2010.06.04 KR
(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.12.04
(86)PCT申请的申请数据
PCT/KR2011/004131 2011.06.07
(87)PCT申请的公布数据
WO2011/152694 EN 2011.12.08
(71)申请人 SK化学公司
地址 韩国京畿道
(72)发明人 宋寅瑛 金薰泽 李峰镛 朴万勋 李镐顺 林允挺 李智慧 孙瑞延 金旼善
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
代理人 彭鲲鹏 顾晋伟
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 15/63(2006.01)

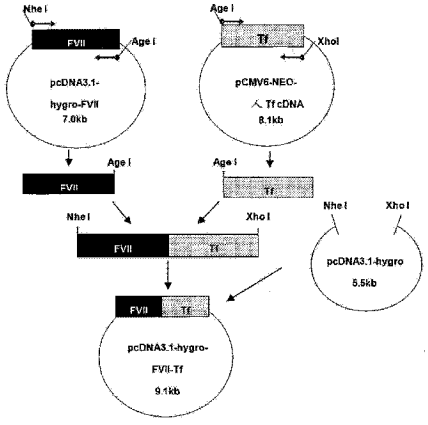
权利要求书1页 说明书14页
序列表46页 附图4页

(54)发明名称

具有因子VII活性的融合蛋白质

(57)摘要

与现有的包含除转铁蛋白之外其他融合伴侣的FVII融合蛋白质相比，根据本发明的包含因子VII(FVII)和转铁蛋白的融合蛋白质具有提高的FVII比活性，并因此可有效地用于使用FVII的治疗。



CN 103068854 A

1. 包含因子 VII(FVII) 和转铁蛋白的融合蛋白质，其中所述转铁蛋白与所述 FVII 的 C 末端相连接。

2. 权利要求 1 的融合蛋白质，其中所述 FVII 是氨基酸序列 SEQ IDNO :1 所示的多肽或其功能等价物。

3. 权利要求 2 的融合蛋白质，其中所述功能等价物具有与所述 FVII 的功能活性基本等价的功能活性，并且在 SEQ ID NO :1 所示的氨基酸序列中具有氨基酸残基的缺失、插入或替换。

4. 权利要求 1 的融合蛋白质，其中所述转铁蛋白是氨基酸序列 SEQID NO :2 所示的多肽或其功能等价物。

5. 权利要求 4 的融合蛋白质，其中所述功能等价物具有与所述 FVII 的功能活性基本等价的功能活性，并且在 SEQ ID NO :2 所示的氨基酸序列中具有氨基酸残基的缺失、插入或替换。

6. 权利要求 1 的融合蛋白质，其在所述 FVII 的 C 末端与所述转铁蛋白之间还包含限制酶识别序列。

7. 权利要求 1 的融合蛋白质，其在所述 FVII 与所述转铁蛋白之间还包含接头。

8. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中所述接头由 1 至 100 个氨基酸组成。

9. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中所述接头由 1 至 75 个氨基酸组成。

10. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中所述接头由 5 至 25 个氨基酸组成。

11. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中翻译自限制酶识别位点的一个或更多个氨基酸存在于所述接头的一端或两端。

12. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中所述接头是 SEQ ID NO :3 至 11 的任一氨基酸序列所示的肽。

13. 权利要求 7 的融合蛋白质，其中所述接头包含蛋白酶切割位点，其能够被选自凝血酶、因子 Xa、因子 IXa 和因子 VIIa 的蛋白酶切割。

14. 权利要求 13 的融合蛋白质，其中所述接头是由 SEQ ID NO :12 的氨基酸序列所示的肽。

15. 权利要求 1 至 14 中任一项的融合蛋白质，其中所述融合蛋白质具有与未融合天然型 FVII 相比不低于 0.7 的 FVII 比活性。

16. 编码权利要求 1 至 14 中任一项的融合蛋白质的 DNA。

17. 权利要求 16 的 DNA，其中所述 DNA 由 SEQ ID NO :13 至 24 的任一核苷酸序列所示。

18. 包含权利要求 16 的 DNA 的重组载体。

19. 包含权利要求 18 的重组载体的宿主细胞。

20. 权利要求 19 的宿主细胞，其选自 :CHO 细胞、BHK21 细胞、HEK293 细胞和 Hep G2 细胞。

具有因子 VII 活性的融合蛋白质

技术领域

[0001] 本发明涉及具有因子 VII(FVII) 活性的融合蛋白质；以及，更特别地，涉及包含 FVII 和转铁蛋白并且与未融合天然型 FVII 相比具有 0.7 或更高的 FVII 比活性 (specific activity) 的融合蛋白质、为其编码的 DNA、包含所述 DNA 的重组载体、以及包含所述重组载体的宿主细胞。

背景技术

[0002] 多种出血性疾病由缺乏凝血因子引发。最常见的疾病是分别由凝血因子 VIII 和 IX 缺乏或异常引发的血友病 A 和 B。

[0003] 血友病 A 是由有缺陷的因子 VIII 基因的 X 连锁隐性特征 (X-linkedrecessive trait) 所引起的遗传性出血性疾病。血浆源性或重组的因子 VIII 的浓缩物已被用于治疗血友病 A。血友病 B 是由因子 IX 缺乏或功能不良而引起的，通过使用血浆源性或重组的因子 IX 的浓缩物对其进行治疗。但是，出现针对替代因子 (replacement factor) 的同种抗体仍是血友病 A 和 B 的治疗中严重的医学问题。在高至 30％的血友病 A 患者中产生针对因子 VIII 的抗体。尽管针对因子 IX 的抗体产生的较少，但它们对免疫耐受诱导治疗较不敏感，导致更严重的结果。

[0004] 凝血由血管壁损伤之后暴露于循环血液的组织因子与激活形式的因子 VII(FVIIa) 之间形成复合物而引发。这样的复合物激活因子 IX 和因子 X，并且所产生的因子 Xa 产生有限量的凝血酶。在正反馈环中，凝血酶激活凝血级联的多种因子 (例如，因子 VIII、因子 V、因子 XI 等)，并且所激活的因子构成因子 X 酶复合物 (factor Xase complex) 或前凝血素酶复合物。这些复合物还扩增其自身的生成并且产生凝血酶。这种被称为“凝血酶爆发 (thrombin burst)”的足够量的凝血酶将出血部位的纤维蛋白原转化为纤维蛋白，从而实现完全止血。但是，在具有针对因子 VIII 或因子 IX 的高浓度中和抗体的血友病患者的情况中，因为不能产生上述因子 X 酶复合物，所以达不到足够的止血。FVIIa 已用作主要的治疗剂，用于具有针对因子 VIII 或因子 IX 的中和抗体的患者，因为 FVIIa 可激活因子 X(甚至在不存在因子 VIII 和因子 IX 时)，从而最终产生足够量的凝血酶以实现期望的治疗效果。

[0005] FVII 是由 406 个氨基酸组成的单链糖蛋白，分子量为 50kDa，并且作为酶原而被分泌到血流中。FVII 由四个不同的结构域组成，即，氨基末端 - 羧基谷氨酸 (Gla) 结构域、两个表皮生长因子 (EGF) 样结构域、以及丝氨酸蛋白酶结构域 (Hagen FS 等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83(8) :2412-2416,1986)。经过蛋白水解位于 Arg152-Ile153 的单个肽键，通过形成由二硫键连接的两个多肽链 (即，N 末端轻链 (24kDa) 和 C 末端重链 (28kDa))，FVII 被转化为其激活形式 FVIIa。FVII 以 500ng/mL 的浓度存在于血浆中，并且 1％ (即，5ng/mL) 的 FVII 作为 FVIIa 而存在。

[0006] 同时，已报道血浆中 FVII 的半衰期为约 4 小时 (3 ～ 6 小时)，而 FVIIa 的半衰期为约 2.5 小时。由于半衰期短，需要通过多次静脉内注射或连续注射来施用 FVIIa。然而，

就高治疗费用和使患者不适而言，这会限制 FVIIa 的治疗应用。

[0007] 为了克服这些问题，已提供方法用于制备包含 FVII 以及与其相连的融合伴侣的融合蛋白质，但是所产生的蛋白质具有丧失其生物活性的问题，尽管与非融合蛋白质相比，较短的体内半衰期有所提高。

[0008] 因此，有需要提供和获得具有提高的体内半衰期同时保持天然型 FVII 的生物活性的 FVII 融合蛋白质。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明的一个目的是提供具有天然型 FVII 的生物活性的融合蛋白质。

[0011] 本发明的另一个目的是提供编码所述融合蛋白质的基因。

[0012] 本发明的另一个目的是提供包含所述基因的重组载体。

[0013] 本发明的另一个目的是提供包含所述重组载体的宿主细胞。

[0014] 问题的解决方案

[0015] 根据本发明的一个方面，提供了包含因子 VII(FVII) 和转铁蛋白的融合蛋白质，其中所述转铁蛋白与所述 FVII 的 C 末端相连接。

[0016] 根据本发明的另一个方面，提供了编码所述融合蛋白质的 DNA。

[0017] 根据本发明的另一个方面，提供了包含所述 DNA 的重组载体。

[0018] 根据本发明的另一个方面，提供了包含所述重组载体的宿主细胞。

[0019] 发明的有益效果

[0020] 根据本发明的融合蛋白质具有与天然型 FVII 相比提高的体内半衰期同时保持 FVII 的高生物活性，因此可有效地用于使用 FVII 的治疗。

[0021] 附图简述

[0022] 当与附图结合时，通过以下对发明的描述，本发明的上述和其他目的及特征将变得显而易见，所述附图分别示出：

[0023] 图 1 是示意图，其示出用于由包含编码 FVII 序列的 cDNA 的载体以及包含编码转铁蛋白 (Tf) 序列的 cDNA 的载体构建 FVII-Tf 表达载体的克隆流程；

[0024] 图 2 是示意图，其示出用于通过重叠 PCR 构建 FVII-GS1(接头)-Tf 表达载体的流程；

[0025] 图 3 是示意图，其示出包含 GS3、GS5、GS7、GS9、GS11、GS13、GS15 或 GS-1-T 作为接头的 FVII-GS 接头 -Tf 表达载体的构建流程；

[0026] 图 4 显示了本发明的 VII-Tf、FVII-GS1-Tf、FVII-GS3-Tf、FVII-GS5-Tf、FVII-GS7-Tf、FVII-GS9-Tf、FVII-GS11-Tf、FVII-GS13-Tf、FVII-GS15-Tf、FVII-GS1-T-Tf 和 FVII- 螺旋 -Tf(FVII-Helix-Tf) 融合蛋白质，FVII- 白蛋白融合蛋白质 (FVII-Alb) 和 FVII(诺其 ™(NovoSeven™)) 的 Western 印迹结果；

[0027] 图 5 是图表，其示出本发明的 FVII-Tf、FVII-GS1-Tf、FVII-GS3-Tf、FVII-GS5-Tf、FVII-GS7-Tf、FVII-GS9-Tf、FVII-GS11-Tf、FVII-GS13-Tf、FVII-GS15-Tf、FVII-GS1-T-Tf 和 FVII- 螺旋 -Tf 融合蛋白质、以及 FVII- 白蛋白融合蛋白质 (FVII-Alb) 的比活性 (specific activity)；

[0028] 图6呈现接头和FVII-GS1-T-Tf融合蛋白质中两个末端处的限制性识别序列的结构；以及

[0029] 图7示出经纯化的本发明FVII-Tf、FVII-GS1-Tf、FVII-GS1-T-Tf、FVII-GS3-Tf以及FVII-GS15-Tf融合蛋白质，NovoSeven™和FVII的western印迹结果。

[0030] 发明的最佳实施方式

[0031] 本发明提供包含因子VII(FVII)和转铁蛋白的融合蛋白质。

[0032] 本发明的融合蛋白质的FVII和转铁蛋白可源自任何哺乳动物，优选人。更具体地，本发明中所使用的FVII和转铁蛋白可分别具有与见于人血液中那些天然型蛋白质不少于95％的序列同源性。最优选地，FVII具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列并且转铁蛋白具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

[0033] 此外，用于本发明的融合蛋白质的FVII或转铁蛋白可以是其天然型的功能等价物或功能衍生物，其具有基本等价的功能活性。示例性的功能等价物包括由分别在SEQ ID NO:1和2所示的氨基酸序列中缺失、插入或者非保守性或保守性替换任何氨基酸残基或者其组合所诱导的突变体，其中这样的改变基本不改变提供对FVII的生物活性的活性位点或结构域。

[0034] 在一些情况中，可例如通过磷酸化(phosphorylation)、硫酸化(sulfation)、丙烯酰化、糖基化、甲基化、法尼基化、乙酰化、酰胺化等来修饰本发明的融合蛋白质，用于提高或降低其物理或化学特性，并且只要基本保持FVII的生物活性，这样的功能衍生物也落入本发明的范围之内。

[0035] 在本发明的融合蛋白质中，转铁蛋白优选地与FVII的C末端相连接。采用FVII-转铁蛋白顺序的融合蛋白质优于采用转铁蛋白-FVII顺序的融合蛋白质，可能是由于FVII的N末端的暴露(见表3)。

[0036] 本发明的融合蛋白质还可在FVII与转铁蛋白之间包含限制酶的识别序列以利于插入以下所描述的接头。限制性识别序列可以是本领域技术人员已知的任何限制性识别序列，并且可优选地使用AgeI识别序列(A/CCGGT)。换句话说，融合蛋白质(其中限制性识别序列与FVII的C末端相连接并且转铁蛋白与限制性识别序列相连接)包括在本发明的范围之内。

[0037] 本发明提供在FVII与转铁蛋白之间包含接头的融合蛋白质。

[0038] 所述接头可具有1至100个氨基酸，优选1至75个氨基酸，更优选5至25个氨基酸，并且所述接头可以是可将FVII与转铁蛋白功能性分离的任何肽。所述接头可具有稳定的二级结构(例如螺旋)或者可源自IgG铰链区。优选地，所述接头在水溶液中可自由旋转，并且不具有固定结构，因此，所述接头可以是非免疫原性的并且可通过使两个融合伴侣之间的潜在干扰最小化而提高融合蛋白质的FVII活性。例如，这样的接头可以是氨基酸序列SEQ ID NO:11所示的螺旋接头。此外，这样的柔性接头可包含重复或随机模式的甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。例如，所述接头包含$(GGGGS)_N$(其中N是1至20的整数)，并且优选具有选自SEQ ID NO:3至11的任一氨基酸序列(见表1)。此外，具有与所述接头不低于80％同源性(优选具有不低于85％同源性)的任何氨基酸序列也可用于本发明的融合蛋白质。

[0039] 此外，所述接头还可包括蛋白酶切割位点，其可被损伤组织中丰富的蛋白酶识别。所述切割位点可被选自凝血酶、因子Xa、因子IXa和因子VIIa的蛋白酶切割。具有这种蛋

白酶切割位点的融合蛋白质在工作位点处被切割以产生每种蛋白质（即，FVII 和转铁蛋白），并且所产生的蛋白质作为个体蛋白质而发挥功能。优选地，所述接头具有 SEQ ID NO：12 的氨基酸序列（见表 1）。

[0040] 可更容易地通过位于 FVII 与转铁蛋白之间的限制酶识别序列将所述接头插入到融合蛋白质中。因此，所述限制酶识别序列可存在于所述接头的任一端或两端，并且继而被翻译成由所述序列编码的氨基酸。例如，当使用 AgeI 限制酶识别序列时，Thr 可存在于所述接头的 N 末端，并且 Thr-Gly 可存在于所述接头的 C 末端。即，当使用接头 $(GGGGS)_3$ 时，所述识别序列和接头可以以 $--T(GGGGS)_3TG--$ 的形式存在。在所述接头的 N 末端和 C 末端处翻译的氨基酸可根据所使用的限制酶识别序列而有所不同，但其存在并不影响融合蛋白质的活性（见表 5）。

[0041] 本发明的融合蛋白质表现出不低于 0.7 的与未融合天然型 FVII 相比的 FVII 比活性。

[0042] 在本发明的一个方面中，所述融合蛋白质（其包含由 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列所示的 FVII 和由 SEQ ID NO：2 的氨基酸序列所示的转铁蛋白）具有约 0.82 至约 0.92 的与未融合天然型 FVII 相比的 FVII 比活性（见表 2 和表 3）。

[0043] 此外，所述融合蛋白质（其包含由 SEQ ID NO：1 的氨基酸序列所示的 FVII、由 SEQ ID NO：3 的氨基酸片列所示的接头以及由 SEQ ID NO：2 的氨基酸序列所示的转铁蛋白）具有约 0.97 的与未融合天然型 FVII 相比的 FVII 比活性（见表 2）。

[0044] 根据本发明的融合蛋白质（其中另一些接头插入 FVII 与转铁蛋白之间）也具有约 0.74 至约 1 的与未融合天然型 FVII 相比的 FVII 比活性（见表 2）。

[0045] 此外，本发明的融合蛋白质具有比其上没有连接转铁蛋白的 FVII 长 3 ～ 4 倍的半衰期（见表 6）。

[0046] 本发明还提供编码所述融合蛋白质的 DNA。

[0047] 由于密码子简并性或者考虑生物体中优选的密码子，可对编码融合蛋白质的 DNA 进行多种改变和修改以表达所述融合蛋白质，除非所述融合蛋白质的氨基酸序列实质地改变，经修改的 DNA 也包括在本发明的范围之内。在本发明中，编码所述融合蛋白质的 DNA 可优选地由 SEQ ID NO：13 至 24 的任一核苷酸序列所示。可通过用于表达所述 DNA 的载体来提供本发明编码所述融合蛋白质的 DNA。

[0048] 本发明提供包含编码所述融合蛋白质的 DNA 的重组载体。

[0049] 本文中使用的术语“载体”是指用于将编码所述融合蛋白质的 DNA 引入宿主细胞并在其中表达所述融合蛋白质的工具 (means)。所述载体可包括常规载体，例如质粒载体、粘粒 (cosmid) 载体、噬菌体载体、病毒载体等，优选质粒载体。

[0050] 合适的表达载体包含表达调节元件（例如，启动子、起始密码子、终止密码子、聚腺苷酸化信号和增强子），以及用于膜导向或分泌的信号序列或前导序列，并且可根据目的而多样地制备。应确保所述起始密码子和终止密码子在施用基因构建体的生物体中运作，并且处于编码序列的阅读框中 (in-frame)。此外，所述表达载体包含用于选择含有所述载体的宿主细胞的选择标记，以及复制起点（如果所述表达载体是可复制的）。所述载体可自身复制或可被整合到宿主细胞的 DNA 中。

[0051] 具体地，可通过将编码所述融合蛋白质的 DNA 插入到 pcDNA3.1-hygro 载体而制备

根据本发明的重组表达载体。

[0052] 此外，本发明提供通过用所述重组表达载体转化而产生所述融合蛋白质的宿主细胞。

[0053] 因为，所述蛋白质的表达水平和修饰根据宿主细胞的类型而有所不同，优选选择最适于目的的宿主细胞。宿主细胞的实例包括哺乳动物细胞，例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、人胚肾细胞 (HEK293)、仓鼠肾细胞 (BHK 21)、人肝癌细胞 (Hep G2) 等，但不限于此。

[0054] 为了用根据本发明的重组表达载体转化宿主细胞，可使用本领域技术人员已知的任何方法，此类方法的实例包括但不限于电穿孔、原生质体融合、磷酸钙 ($CaPO_4$) 沉淀、氯化钙 ($CaCl_2$) 沉淀等。

[0055] 发明的实施方式

[0056] 以下实施例仅为举例说明的目的而给出，并不旨在限制本发明的范围。

[0057] 实施例 1 :制备因子 VII(FVII) 质粒载体 (pcDNA3.1-hygro-FVII)

[0058] 将从 Hep G2 细胞 (KCLB No.88065) 纯化的总 RNA 用作模板用于逆转录。通过使用 FVII 基因特异性引物 FVII-F 和 FVII-R(SEQ ID NO :25 和 26) 的 PCR 扩增互补 DNA(cDNA) 以获得人 FVII-F 基因的开放阅读框。在以下条件下通过处理 50μL 的反应溶液 (0.5μL cDNA、0.4μM(10pmol/μL)SEQ ID NO :25 和 26 的引物、0.2mM dNTP、5 单位的 TaqDNA 聚合酶和水) 而进行 PCR :在 94℃下 5 分钟的 1 个变性循环，在 94℃下 1 分钟、60℃下 1 分钟、以及在 72℃下 2.5 分钟的 35 个扩增循环，以及在 72℃下 5 分钟的 1 个最终延伸循环。将经纯化的 PCR 产物克隆到 pGEM-T 易载体 (pGEM-T easy vector)(Promega，Cat# :A1360) 中。通过使用 EcoRI 和 NcoI 的限制性酶切选择阳性克隆。通过 DNA 测序进一步核实所选择的克隆。为了将 FVII 的 ORF(FVII-ORF) 转移至表达载体，通过 T4DNA 聚合酶使以 NotI 切割的 FVII-ORF 成平末端 (blunt)，并与以 HindIII/XbaI 酶切并且成平末端的 pcDNA3.1-hygro 载体 (Invitrogen) 相连接。通过用 ApaI、XbaI、EcoRI、NcoI、PstI 限制性酶切和 DNA 测序而确证经连接的载体。该载体被定名为“pcDNA3.1-hygro-FVII”。

[0059] 实施例 2 :构建 FVII-Tf 表达载体 (pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf)

[0060] 将实施例 1 中制备的 FVII cDNA 与人转铁蛋白 (Tf)cDNA 融合以作为动物细胞中的单一酶原而表达。人转铁蛋白 cDNA 购自 Origene(Cat# :SC322130) 并且核实其与 GenBank 登录号 :NM_001063.2 的序列是否相同。设计融合中所使用的引物以除去 FVII 的终止密码子以及转铁蛋白的信号肽。为了利于在 FVII 与 Tf 之间插入多种大小的接头，向连接引物中添加 AgeI 位点 (ACCGGT)，其将被翻译成苏氨酸 (Thr) 和甘氨酸 (Gly)。所产生的融合蛋白质可具有以下结构 :(前导肽)-(成熟 FVII)-(Thr-Gly)-(成熟 Tf)(其中前导肽由成熟 FVII 中不存在的信号肽 (前肽 (prepeptide)) 和待通过加工酶切割的肽原 (propeptide) 组成，由 38 个氨基酸构成，并且与 SEQ ID NO :1 氨基酸序列中的 1 至 38 位置的氨基酸相对应)。通过使用引物 FVII-S1、FVII-AS1、Tf-S1 和 Tf-AS1(SEQ IDNO :27 至 30) 扩增 FVII 以及 Tf 的 cDNA，并且使用实施例 1 中所描述载体。SEQ ID NO :27 和 30 的引物分别包含 NheI 和 XhoI 位点。

[0061] 图 1 中描述了用于将 FVII cDNA 与 Tf cDNA 相连接的克隆策略。首先，通过 PCR 从 pcDNA3.1-hygro-FVII 载体扩增 FVII cDNA。在以下条件下通过处理 50μL 的反应溶液 (1μL 载体模板、1μL 引物对、FVII-S1 和 FVII-AS1(10μM)、10μL 5x Phusion HF 缓冲液、

200μM dNTP、0.5μLPhusion DNA 聚合酶 (FINNZYMES，#F-530S，2 单位 / μL) 和 35.5μL 水）而进行 PCR：在 98℃下 30 秒的 1 个变性循环，在 98℃下 10 秒、60℃下 45 秒、以及在 72℃下 30 秒的 30 个扩增循环，以及在 72℃下 7 分钟的 1 个最终延伸循环。

[0062] 接下来，使用转铁蛋白 cDNA 作为模板扩增 Tf。重复上述 PCR 操作，不同之处在于使用引物对 (Tf-S1 :10μM ;Tf-AS1 :10μM)。

[0063] 通过一系列的限制性酶切 (restriction) 和连接而将经扩增的 FVII 和 Tf cDNA 相连接。用 AgeI 和 XhoI 或者用 NheI 酶切通过 PCR 扩增的每种 DNA。将经酶切的 DNA 纯化并以 1 ：1 的摩尔比连接。将经连接的 DNA 亚克隆到用 NheI/XhoI 酶切的 pcDNA3.1-hygro 载体 (Invitrogen) 中。通过 DNA 测序进一步核实插入物的大小和序列。

[0064] 实施例 3 ：构建 FVII-GS 接头 -Tf 表达载体

[0065] 使用包含甘氨酸和丝氨酸的由 5 个氨基酸组成的肽作为基本接头单位。所述基本接头单位包含四个甘氨酸和一个丝氨酸，具有以下序列 ：“GGGGS”。应用所述基本接头单位（下文中称为“GS-X 接头”，其中 X 是重复数目的基本 GS 接头单位）以构建更长的 GS 接头。在该实施例中，构建 GS-1 至 GS-15 的接头。

[0066] 1) 构建 FVII-GS-1 接头 -Tf 表达载体

[0067] 合成一组包含基本 GS 接头单位的引物 GS-FV-AS1 和 GS-Tf-S1(SEQ ID NO ：31 和 32)，并通过重叠 PCR 将其插入到 FVII 与 Tf 之间 (见图 2)。

[0068] 通过使用一组引物 FVII-S1 和 GS-FV-AS1(SEQ ID NO ：27 和 31) 以及 Phusion DNA 聚合酶 (FINNZYMES，#F-530S) 的 PCR 将所述 GS-1 接头与 FVII 相连接。通过在以下条件下处理 50μL 的反应溶液 (1μL pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体、1μL FVII-S1(10pmole/1μL)、1μL GS-FV-AS1(10pmole/μL)、1μL 10mM dNTP、10μL 5x Phusion HF 缓冲液、35.5μL 水和 0.5μL Phusion DNA 聚合酶 (2 单位 / μL)) 而进行 PCR ：在 98℃下 30 秒的 1 个变性循环，在 98℃下 10 秒、64℃下 30 秒、以及在 72℃下 45 秒的 35 个扩增循环，以及在 72℃下 7 分钟的 1 个最终延伸循环。同时，为了将 GS-1 接头与 Tf 相连接，重复上述 PCR 操作，不同之处在于使用一组引物 GS-Tf-S1 和 Tf-AS1(SEQ ID NO ：32 和 30)。使用经扩增的 PCR 产物作为重叠 PCR 的模板。通过在以下条件下处理反应溶液 (1μL 经扩增的 PCR 产物、1μL FVII-S1(10pmole/μL，SEQ ID NO ：27)，1μL 反义引物 (Tf-AS1 10pmole/μL，SEQ ID NO ：30)、10μL 5x PhusionHF 缓冲液、1μL 10mM dNTP、34.5μL 水、0.5μL Phusion DNA 聚合酶 (2 单位 / μL)) 而进行重叠 PCR ：在 98℃下 1 分钟的 1 个变性循环，在 98℃下 10 秒、66/68℃下 30 秒、以及在 72℃下 45 秒的 45 个扩增循环，以及在 72℃下 7 分钟的 1 个最终延伸循环。将进扩增的重叠 PCR 产物克隆到用 NheI 和 XhoI 酶切的 pcDNA3.1-hygro-lacZ 中。

[0069] 2) 构建 FVII-GS-3 接头 -Tf 表达载体

[0070] 合成包含 GS-3 和 AgeI 位点的引物对 GS3-S 和 GS3-AS(SEQ ID NO ：33 和 34)。为了制造 GS-3 双链接头，通过在 98℃下加热混合物 (5μL GS3-S(100pmole/μL)、5μL GS3-AS(100pmole/μL)、2μL 10X 退火缓冲液 (100mM Tris-Cl[pH 8.0]、1M NaCl、10mM EDTA) 和 8μL 水)10 分钟并在 25℃下冷却 1 小时而使引物退火。用 AgeI 酶切经退火的接头，并且还用 AgeI 酶切实施例 2 中制备的 pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体。在 37℃下用 1μL CIP(小牛肠磷酸酶 ;NEB，#M0290S) 处理经酶切的载体 1 小时，并对其进行凝胶提取操

作 (QIAGEN,#28704),随后使用 T4DNA 连接酶 (TAKARA,#2011A) 以 1 ： 3 的摩尔比 (载体 : 插入物) 连接。

[0071] 3) 构建 FVII-GS-5 接头 -Tf 至 FVII-GS-15 接头 -Tf 的表达载体

[0072] 为了构建包含 GS-5 接头的融合蛋白质表达载体,实施了新的策略。通过以下两个步骤构建包含接头经延长的 FVII-Tf 融合载体。

[0073] 第一步是向以前获得的接头中添加合成的双链 (ds)GS2 接头。确保延长接头之后,将所述接头切出并将其插入 pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体中的 FVII 基因与 Tf 基因之间。例如,为了将 GS-3 接头延长至 GS-5 接头,用 BglII 酶切 SEQ ID NO :35 的经合成 dsGS-2 接头单位,并与用 BamHI 和 StuI 处理的 pcDNA3.1-hygro-FVII-GS3-Tf 载体连接。接下来,在通过 BamH1 和 AgeI 酶切确证延伸所述接头之后,用 AgeI 将经延长的接头切出,并将其克隆到用 AgeI 和 CIP 处理的 pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体中。通过相同的策略构建包含 GS-7、GS-9、GS-11、GS-13 和 GS-15 接头的 FVII-Tf 融合表达载体 (见图 3)。

[0074] 实施例 4 : 构建含有包含凝血酶切割位点的接头的 FVII-Tf 表达载体 (pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf)

[0075] 通过使 GS-1 单位与凝血酶识别序列 (下文中称为“GS1-T 接头”) 的两端邻接而制备包含凝血酶切割位点的接头。设计并合成 SEQ ID NO :36(有义) 的 dsGS1-T 接头以在两端包含 AgeI 位点。用 AgeI 酶切 dsGS1-T 接头,并使用 PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, cat# : 28104) 进行纯化。将经纯化的接头连接到用 CIP/AgeI 处理的 pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体中。

[0076] 实施例 5 : 构建包含螺旋接头的 FVII-Tf 表达载体 (pcDNA3.1-hygro-FVII- 螺旋 -Tf)

[0077] 通过美国公开 (Laid-open Publication)No.2009/0170163 中公开的方法制备螺旋接头 DNA。通过使用引物向所制备螺旋接头 DNA(螺旋接头 S 和螺旋接头 AS(SEQ ID NO : 37 和 38)) 的两端添加 AgeI 位点。将引物螺旋接头 S 和螺旋接头 AS 退火并用 AgeI 酶切,随后插入用 AgeI 和 CIP 处理的 pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf 载体中。通过 DNA 测序确证所构建的载体。

[0078] 比较例 1 : 构建 FVII- 白蛋白融合表达载体 (FVII-Alb)

[0079] 构建欧洲专利 No.1816201 中所公开的 FVII- 白蛋白融合蛋白质。通过使用人肝 mRNA(Clontech) 作为模板以及白蛋白基因特异性引物白蛋白 -S 和白蛋白 -AS(SEQ ID NO : 39 和 40) 的 RT-PCR 获得人白蛋白 cDNA。根据制造商的说明书通过使用 AccuScript 高保真 RT-PCR 系统试剂盒 (Cat# 600180) 进行 RT-PCR。首先,将 10μL 的逆转录反应溶液 (1μL 10X 逆转录酶缓冲液、0.6μL 寡 -dT 引物、1μL dNTP、0.4μL 水、5μL 人肝 mRNA(10ng/μL)) 在 65℃下保持 5 分钟,并在室温下保持 5 分钟,并在 42℃下与 1μL 100mM DTT 和 1μL 逆转录酶反应 1 小时。通过使用合成 cDNA 作为模板以及引物白蛋白 -S 和白蛋白 -AS 的 PCR 获得人白蛋白序列。在以下条件下通过处理 50μL 的反应溶液 (1μL cDNA 模板、10μL 5x Phusion HF 缓冲液、分别 1μL 引物白蛋白 -S 和白蛋白 -AS、1μL 10mM dNTP、0.5μL Phusion DNA 聚合酶 (FINNZYMES, #F-530S ;2 单位 / μL) 和 35.5μL 水) 而进行 PCR : 在 98℃下 1 分钟的 1 个变性循环,在 98℃下 10 秒、60℃下 30 秒、以及在 72℃下 60 秒的 30 个扩增循环,以及在 72℃下 7 分钟的 1 个最终延伸循环。将合成的 SEQ ID NO :

41 和 42 的寡核苷酸退火至欧洲专利 No.1816201 中所公开的 GS 接头 [SS(GGS)9GS](SEQ ID NO:45)。为了将实施例 1 中制备的 FVII cDNA 连接至上述接头，通过使用引物 mut FVII(XhoI)-S 和 mut FVII(XhoI)-AS(SEQ ID NO:43 和 44) 的基于 PCR 的诱变，用 XhoI 位点替换 pcDNA3.1-hygro-FVII 载体中的 FVII 终止密码子。使用 XhoI/ApaI 位点，将 GS 接头 [SS(GGS)9GS] 融合至 pcDNA3.1-hygro-FVII 载体中 FVIIcDNA 的 3′ 端。最终，将用 BamHI 酶切的人白蛋白 cDNA 插入到 pcDNA3.1-hygro-FVII-GS- 接头载体中。通过 DNA 测序核实所制备的 pcDNA3.1-hygro-FVII-GS- 接头 - 白蛋白表达载体。

[0080] 表 1 中示出实施例 2 至 5 以及比较例 1 中所构建表达载体的特征。

[0081] 表 1

[0082] [表 1]

[0083]

FVII融合蛋白质	FVII的C-末端	接头序列 (SEQ ID NO)	融合伴侣的N-末端	接头中氨基酸的数目
FVII-Tf	APFP		VPDKTV	0
FVII-GS1-Tf	APFP	GGGGS (SEQ ID NO: 3)	VPDKTV	5
FVII-GS3-Tf	APFP	$(GGGGS)_3$ (SEQ ID NO: 4)	VPDKTV	15
FVII-GS5-Tf	APFP	$(GGGGS)_5$ (SEQ ID NO: 5)	VPDKTV	25
FVII-GS7-Tf	APFP	$(GGGGS)_7$ (SEQ ID NO: 6)	VPDKTV	35
FVII-GS9-Tf	APFP	$(GGGGS)_9$ (SEQ ID NO: 7)	VPDKTV	45
FVII-GS11-Tf	APFP	$(GGGGS)_{11}$ (SEQ ID NO: 8)	VPDKTV	55
FVII-GS13-Tf	APFP	$(GGGGS)_{13}$ (SEQ ID NO: 9)	VPDKTV	65
FVII-GS15-Tf	APFP	$(GGGGS)_{15}$ (SEQ ID NO: 10)	VPDKTV	75
FVII-GS1-T-Tf	APFP	GGGGSLVPRGSGGGS (SEQ ID NO: 12)	VPDKTV	15
FVII-螺旋-Tf	APFP	$GA(EAAAK)_4A$ (SEQ ID NO: 11)	VPDKTV	23
FVII-Alb	APFP	$SS(GGS)_9GS$ (SEQ ID NO: 45)	DAHK	31
*对于FVII-Tf，存在源自AgeI的Thr-Gly。*对于SEQ ID NO: 4至12的接头，在N-末端存在源自AgeI的Thr，并且在C-末端存在源自AgeI的Thr-Gly。				

[0084] 实验例 1 :测量 FVII- 融合蛋白质的比活性

[0085] 在稳定表达 VKORC1(维生素 K 环氧化物还原酶复合物亚单位 1) 的 CHO 细胞 (CHO(VK2)) 中表达实施例 2 至 5 以及比较例 1 中所构建的 FVII- 融合蛋白质。

[0086] 通过使用无内毒素质粒大量提取试剂盒 (Endo-free plasmid maxikit)(Qiagen,

#27104) 纯化实施例 2 至 5 以及比较例 1 中所构建的表达载体。使用 β- 半乳糖苷酶作为转染的内对照。在 6 孔板中以 1.5×10^6 个细胞 / 孔的密度接种 CHO(VK2) 细胞。在补充了 10％ FBS(Lonza，#14-501F)、1X HT(Invitrogen，#11067-030)、4mM L- 谷氨酰胺 (Lonza，#17-605E) 和 200μg/mL 潮霉素 (Invitrogen，#10687-010) 的 α-MEM(Lonza，#12-169F) 中孵育细胞 24 小时，随后根据制造商的说明书使用 lipofectamine 2000(Invitrogen) 转染。转染之后四小时，替换为无血清培养基 (OptiMEM)，并补充 5μg/mL 维生素 K。孵育 48 小时之后，对培养基进行取样并贮藏于 -70℃。

[0087] 分别使用 COATEST 因子 VII 测定试剂盒 (Chrmogenix，#821900-63) 和 FVII ELISA 试剂盒 (Cedarlene Lab，#CL20030K) 分析所表达 FVII- 融合蛋白质的发色活性和抗原量。根据制造商的说明书进行所述测定。将相对于 WHO 标准归一化的标准人血浆用作这两种测定中的对照 FVII。通过 western 印迹分析评估蛋白质的表达。基于 ELISA 结果加载等量的 FVII 融合蛋白质。发现所表达的 FVII- 融合蛋白质具有预期的大小，没有可检出的片段化 (见图 4)。

[0088] 同时，FVII- 转铁蛋白融合蛋白质的比活性为 0.74 至 1，这高于 FVII- 白蛋白融合蛋白质的比活性 (0.52)(见表 2)。包含接头的 FVII- 转铁蛋白融合蛋白质还保留了不低于 70％的 FVII 活性。接头长度与比活性之间没有关系，但具有较短 GS 接头的 FVII 融合蛋白质表现出比具有较长 GS 接头的融合蛋白质稍微更高的比活性。尤其是 FVII-GS1-Tf 和 FVII-GS1-T-Tf 融合蛋白质表现出相当的比活性 (见图 5)。

[0089] 表 2

[0090] [表 2]

[0091]

FVII融合蛋白质	抗原 (%)	活性 (%)	比活性 (活性/抗原)
FVII-Tf	53.2 ± 5.0	43.9 ± 0.3	0.82
FVII-GS1-Tf	53.4 ± 3.1	52.0 ± 0.5	0.97
FVII-GS3-Tf	61.9 ± 8.0	57.7 ± 0.2	0.93
FVII-GS5-Tf	69.3 ± 5.6	55.9 ± 1.4	0.81
FVII-GS7-Tf	70.9 ± 8.2	59.3 ± 1.1	0.84
FVII-GS9-Tf	64.2 ± 8.6	47.5 ± 0.7	0.74
FVII-GS11-Tf	59.1 ± 3.9	45.3 ± 0.9	0.77
FVII-GS13-Tf	59.7 ± 5.1	49.1 ± 0.8	0.82
FVII-GS15-Tf	59.2 ± 6.0	50.2 ± 0.5	0.85
FVII-GS1-T-Tf	70.8 ± 8.7	71.0 ± 2.6	1.00
FVII-螺旋-Tf	89.0 ± 5.7	78.9 ± 2.2	0.89
FVII-Alb	106.6 ± 5.4	54.9 ± 3.3	0.52

[0092] 实施例 6 :根据 Tf 融合方向表征 FVII 融合蛋白质

[0093] 在该实施例中，制备了其中人转铁蛋白 (Tf) 连接至 FVII 的 N 末端的融合蛋白质，

并与其中转铁蛋白连接至FVII的C末端的融合蛋白质相比较，以检测根据融合蛋白质中融合方向的特征的改变。详细的操作如下。

[0094] <6-1>构建Tf-FVII和Tf-GS1-T-FVII表达载体

[0095] Tf连接至FVII的N末端的两种融合蛋白质设计如下：(1)(Tf的前导肽)-(成熟Tf)-(Thr-Gly)-(成熟FVII)；和(2)(Tf的前导肽)-(成熟Tf)-(Thr)-(GS1-T；SEQ ID NO：12)-(Thr-Gly)-(成熟FVII)。

[0096] 首先，为了获得包含前导肽的Tf基因序列，设计正向引物(Nhe-Tf：SEQ ID NO：46)以包含用于克隆的目的的NheI位点，并且设计反向引物(Tf-Age：SEQ ID NO：47)以包含用于除去转铁蛋白终止密码子以及克隆的目的的AgeI位点。对于克隆除去了前导肽的成熟FVII，设计正向引物(Age-FVII：SEQ ID NO：48)以包含AgeI位点，并且设计反向引物以包含XhoI位点。

[0097] 对于Tf基因，cDNA购自Origene(Cat#：SC322130)，在实施例2中用作PCR模板。在以下条件下通过处理50μL的反应溶液(1μL载体模板、2μL引物Nhe-Tf和Tf-AgeI(10μM)、10μL 5×Phusion HF缓冲液、1μL 10mM dNTP、0.5μL Phusion DNA聚合酶(FINNZYMES，#F-530S，2单位/μL)和33.5μL水)而进行PCR：在98℃下30秒的1个变性循环，在98℃下10秒、70℃下30秒、以及在72℃下36秒的25个扩增循环，以及在72℃下10分钟的1个最终延伸循环。如实施例4中那样通过使用pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf载体作为模板的PCR扩增FVII。PCR条件与上述Tf PCR条件相同，不同之处在于施用引物Age-FVII(10μM)和VII-Xho(10μM)。

[0098] 通过使用NheI/AgeI将所扩增的Tf基因插入到pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf载体中以获得pcDNA3.1-hygro-Tf-Tf载体。用AgeI/XhoI酶切并连接pcDNA3.1-hygro-Tf-Tf载体和FVII PCR产物以构建包含pcDNA3.1-hygro-Tf-FVII融合蛋白质的表达载体。通过经由AgeI将插入实施例4中所合成的dsGS1-T序列而构建pcDNA3.1-hygro-Tf-GS1-T-FVII表达载体。通过限制酶切作图和DNA测序确证所构建的表达载体。

[0099] <6-2>表达融合蛋白质并表征

[0100] 为了表征具有连接至FVII N末端的Tf的融合蛋白质，将其表达载体(即，pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf、pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-Tf-VII、pcDNA3.1-hygro-Tf-FVII和pcDNA3.1-hygro-Tf-GS1-T-FVII)瞬时表达于CHO细胞中。

[0101] 使用无内毒素质粒大量提取试剂盒分离所构建的4种质粒DNA。转染前一天，通过胰蛋白酶分离在T75瓶中培养的CHO(DG44)细胞，并以1.5×10^6个细胞/孔的密度接种在6孔板中。24小时之后，根据制造商的说明书转染细胞。转染四小时之后，除去每孔中的培养基并替换为2mL补充有5μg/mL维生素K的培养基。转染之后，在37℃、5% CO_2的培养箱中孵育6孔板，并在48小时之后收获培养基。将所收获的上清液转移至1.5mL管中并在-70℃下贮藏，用于FVII的发色测定和ELISA。用每孔2mL HBSS清洗除去了培养基的板并用250μL裂解液(Tropix，#ABX210LM，添加1mM DTT)裂解，随后贮藏在-70℃，用于β-半乳糖苷酶测定。

[0102] 按照实验例1进行发色测定和FVII ELISA。通过在实验之前融化转染之后冷冻贮藏的培养基并通过离心获得上清液而制备用于分析的样品。在测定中使用标准人血浆

(Dade Behring,#ORKL13,Lot#503216F) 作为标准物。

[0103] 测量结果示于表3中。对于Tf连接至FVII N末端的Tf-FVII和Tf-GS1-T-Tf,未测量出活性,不同于Tf连接至FVII C末端的FVII-Tf和FVII-GS1-T-Tf。此外,在FVII ELISA中检出了少量Tf连接至N末端的融合蛋白质。但是,在使用Tf的多克隆抗体的western印迹结果中,无论融合方向如何,所述融合蛋白质表现出了相似的检测灵敏度。结果表明,当将Tf连接至FVII的N末端时,即便正常地进行了氨基酸的翻译,也生成没有FVII活性的融合蛋白质。

[0104] 表3

[0105] [表3]

[0106]

融合蛋白质	FVII活性 (%)	FVII抗原 (%)	比活性 (活性/抗原)
FVII-Tf	33.8 ± 0.73	37.0 ± 2.17	0.92
Tf-FVII	未检出	8.0 ± 1.51	-
FVII-GS-1-T-Tf	46.6 ±0.29	43.0 ± 4.75	1.08
Tf-GS-1-T-Tf	未检出	13.5 ± 1.01	-

[0107] 实施例7:根据融合中使用的限制酶识别序列缺失而表征融合蛋白质

[0108] 在实施例2中,使用限制酶 (AgeI) 识别序列以利于在FVII与Tf之间插入多种接头。结果,一些融合蛋白质变得在接头的两端具有由上述限制酶多编码的Thr和Gly。在该实施例中,检测了融合蛋白质的特性是否通过存在限制酶 (AgeI) 识别序列而改变。

[0109] 通过使用诱变引物的基于PCR的位点定向诱变,使限制酶识别序列从包含GS1-T接头的FVII-GS1-T-Tf融合蛋白质中缺失。如图6所示,设计该实验以在N末端缺失“Thr”并且在C末端缺失“Thr-Gly”,实验中使用的引物列在表4中。

[0110] 表4

[0111] [表4]

[0112]

引物	序列 (5'→3')	SEQ ID NO
TG del-S	CAG CGG AGG CGG TTC AGT CCC TGA TAA AAC TG	50
TG del-AS	CAG TTT TAT CAG GGA CTG AAC CGC CTC CGC TG	51
T del-S	CGA GCC CCA TTT CCC GGT GGA GGC GGA TC	52
T del-AS	GAT CCG CCT CCA CCG GGA AAT GGG GCT CG	53

[0113] <7-1>缺失Thr-Gly

[0114] 进行基于PCR的诱变。在以下条件下通过处理50μL的反应溶液 (1μL pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf载体、0.2μL有义引物 (TG del-S 10μM)、0.2μL反义引物 (TG del-AS 10μM)、1μL 10mM dNTP、4μL 5XPCR缓冲液、14μL水和0.2μL Phusion DNA聚合酶 (FINNZYMES,#F-530S)) 而进行PCR:在98℃下30秒的1个变性循环,在98℃下

10 秒、58℃下 30 秒、以及在 72℃下 3 分钟的 18 个扩增循环，以及在 72℃下 7 分钟的 1 个最终延伸循环。为了除去初始的模板 DNA，用 1μL DpnI(NEB,#R0176S) 处理经扩增的 PCR 产物，并在 37℃下孵育 1 小时。使用 10μL 经 DpnI- 处理的 DNA 转化 50μL HIT 感受态细胞 (DH5α，RH617)，并在 LB+amp(10mg/mL) 固体培养基中过夜孵育。通过 DNA 测序分析如此获得的 4 个克隆，并且核实了两个克隆为突变体。

[0115] <7-2> 缺失 Thr

[0116] 为了缺失 Thr，通过使用不同引物而进行与 <7-1> 中类似的方法。简单地说，在相同的条件下通过使用 1μL 克隆的质粒 DNA 作为模板（其中在实施例 <7-1> 中确证突变）和 1μL 有义引物 (T del-S ;10pmole) 以及 1μL 反义引物 (T del-AS ;10pmole) 而进行基于 PCR 的诱变。通过对所选择的四个克隆进行 DNA 测序，确证了三个克隆具有突变。将所获得的表达载体命名为“pcDNA3.1-hygro-FVII-GS1-T-Tf(M3)”。

[0117] <7-3> 表征具有限制酶识别序列缺失的融合蛋白质

[0118] 用 FVII-GS1-T-Tf 和 FVII-GS1-T-Tf(M3) 表达载体转染 CHO 细胞，并以 FVII-Alb 表达载体作为对照，获得培养基的上清液。对所获得的上清液进行 FVII 发色测定 (Chromogenix) 和 FVII ELISA(cedarlane) 以核实活性 / 抗原比值的改变。如表 5 所示，FVII-GS1-T-Tf 和 FVII-GS1-T-Tf(M3) 融合蛋白质的抗原量和活性几乎彼此相等，并且比值（比活性）也没有改变。此外，确证了比活性显著高于 FVII-Alb 融合蛋白质的比活性。

[0119] 表 5

[0120] [表 5]

[0121]

	FVII 抗原 (%)	FVII 活性 (%)	比活性 (活性/抗原)
FVII-GS1-T-Tf	34.1 ± 2.1	39.6 ±2.2	1.16
FVII-GS1-T-Tf(M3)	33.5 ±4.7	38.0 ±0.7	1.14
FVII-Alb	50.1 ±1.2	26.3 ±0.8	0.53

[0122] 实施例 8 :测量融合蛋白质的半衰期

[0123] 为了测定根据本发明的融合蛋白质半衰期的提高，将 FVII-Tf、FVII-GS1-Tf、FVII-GS3-Tf、FVII-GS15-Tf 和 FVII-GS1-T-Tf 用作实验组，并将野生型 FVII 和市售的 FVIIa(**NovoSeven®**;Novo Nordisk) 用作对照组。

[0124] <8-1> 样品制备

[0125] 1) 获得表达培养基

[0126] 在 FreeStyle™ CHO-S 细胞系 (Invitrogen,Cat.no.R800-07) 中表达野生型 FVII 蛋白质和五种融合了 Tf 的 FVII 融合蛋白质。在具有补充有 8mM L-glu(GIBCO，L- 谷氨酰胺 200mM(100X)，Cat.No.25030-081) 的 freestyle CHO 表达培养基的旋转瓶 (spinner flask) 中悬浮培养 CHO-S 细胞。在转染前 24 小时，以 4×10^5 个细胞 /mL 的密度接种所培养的细胞，并且当密度变为 1×10^6 个细胞 /mL 时进行转染。通过使用无内毒素大量制备试剂盒 (Endo-free maxi prep kit)(QIAGEN，Cat.No.12362) 或无内毒素质粒宏量制备试剂盒 (Endo-free plasmid mega prep kit)(QIAGEN,12381) 制备转染中使用的 DNA，并且参照 FreeStyle MAX 试剂 (Invitrogen，Cat.No.16447-100) 的转染方案进行转染。向 8mL

OptiPRO SFM(Invitrogen,Cat.No.12309-019)中添加500μg DNA并混合。向另一管中添加8mL OptiPRO SFM(Invitrogen,Cat.No.12309-019)和500μLFreeStyle Max试剂,随后将上述两种混合物缓慢混合并在室温下贮藏10分钟。10分钟之后,用所述混合物转染FreeStyle™ CHO-S细胞。在37℃,5% CO_2的培养箱中孵育经转染的细胞3～5天,随后获得上清液。

[0127] 2)纯化表达培养基

[0128] 将通过旋转瓶获得的培养基过滤通过0.22μm滤器(Corning)以除去剩余的细胞和碎片。通过使用切向流动式膜(tangential-flowmembrane)(satorious,30KDa)的超滤将经过滤的培养基浓缩10倍。将经浓缩的培养基加至装有陶瓷羟磷灰石(Ceramic Hydroxyapatite)(BIO-RAD,157-0040)树脂的XK16/20柱(GE healthcare)。用超过10个柱体积的平衡缓冲液(25mM咪唑、0.02%吐温80和150mM NaCl,pH6.5)平衡该陶瓷羟磷灰石柱。加载了经浓缩培养基之后,用平衡缓冲液和清洗缓冲液-1(25mM咪唑、0.02%吐温80、100mM磷酸钠,pH 6.3)和清洗缓冲液-2(25mM咪唑、0.02%吐温80、100mM磷酸钠、1M NaCl,pH 6.3)清洗所述柱。清洗之后,用洗脱缓冲液(25mM咪唑、0.02%吐温80、500mM磷酸钠,pH 6.3)洗脱捕获至所述柱的融合蛋白质。通过FVII-发色测定、FVII ELISA测定和SDS-PAGE/western印迹分析经洗脱的蛋白质。

[0129] <8-2>Western印迹测定

[0130] 通过SDS-PAGE/考马斯蓝染色确证了通过两步柱而部分纯化的FVII和FVII/Tf融合蛋白质具有45%或更高的纯度。通过western印迹评估经纯化蛋白质中源自FVII的片段的存在,因为经纯化的融合蛋白质中的片段化FVII可能具有比完整FVII融合蛋白质更短的半衰期,并且误导对每种FVII融合蛋白质的半衰期的测定。以0.1IU(FVII活性)/10μL制备**NovoSeven®**(Novo Nordisk,1.2mg/小瓶,60KIU)和经纯化样品,随后通过使用NuPage 4-12% bis-Tri凝胶(Invitrogen)进行SDS-PAGE。完成电泳之后,将凝胶转移至PVDF膜,并在室温下通过添加10mL封闭缓冲液(25mM Tris、150mM NaCl(pH 7.2)、5%脱脂乳和0.1%吐温80)而封闭1小时。倾泻掉封闭液,以1∶5000和1∶500的比例添加抗FVII抗体(Cat.No.F8146,Sigma)或小鼠抗转铁蛋白抗体(sc52256,santa cruz),并在翘板摇床(rocking shaker)中孵育1小时。用清洗溶液(25mM Tris、150mM NaCl,pH 7.2)将所述膜清洗四次,并在10mL(PBS-T中的5%脱脂乳)溶液(其中已添加比例为1∶50,000的山羊抗小鼠IgG-HRP抗体(Cat.No.G21040,Invitrogen)作为二抗)中孵育1小时。用清洗溶液(25mM Tris、150mM NaCl,pH 7.2)将所述膜清洗四次之后,向其上添加2ml Super-signal west Femto mix(Thermo)5分钟。反应完成之后,使膜显影。

[0131] 图7中显示western印迹的结果。如图7所示,在经纯化的蛋白质中未检出源自FVII的片段。在所探查的印迹上通过抗转铁蛋白抗体未检出片段化的转铁蛋白。

[0132] <8-3>测量半衰期

[0133] 在大鼠中测量以下蛋白质的半衰期并彼此比较:不具有接头的融合蛋白质,具有四种接头(GS1、GS1-T、GS3和GS15)的融合蛋白质,以及表达的和在相同条件下纯化的野生型FVII,并且用市售的NovoSeven作为对照。根据制造商的说明书,通过人FVII ELISA(Cedarlane,用于对因子VII进行ELISA的成对抗体,#CL20030K)进行对待施用样品以及从动物实验中所采集样品中的FVII量进行定量分析。通过对来自三个不同稀释度的

样品的值求平均值而测定待施用样品的浓度。施用稀释溶液(administration dilution solution)(NaCl 3mg/mL、$CaCl_2$ 二水合物 1.5mg/mL、甘氨酰甘氨酸 1.3mg/mL、聚山梨酯 800.1mg/mL 和甘露醇 30mg/mL，pH 5.5)被用作稀释剂。FVII ELISA 定量之后，用施用稀释溶液稀释每种蛋白质，通过尾静脉以基于实验当天所测量的大鼠体重 150IU/kg 向大鼠(250 ～ 300g 的 Sprague Dawley，每组三只大鼠)静脉内施用经稀释的样品。在总共 11 个时间点取血，即施用药物之后 0 分钟、5 分钟、15 分钟、30 分钟、60 分钟、1.5 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时和 24 小时。将 225μL 血液与 25μL 3.2%柠檬酸钠混合，并在 4℃下以 13,000rpm 离心 1 分钟，随后将上清液贮藏在 -70℃。通过用 FVII ELISA 试剂盒(cedarlane)中使用的清洗缓冲液稀释 1/50 或 1/100 而分析大鼠血浆。通过对人 FVII 抗原浓度的对数相对于取样时间点进行作图而获得回归曲线。通过根据公式“半衰期＝ ln2/回归曲线的斜率”计算而确定每种 FVII 的半衰期。如表 6 所示，与野生型 FVII 相比，本发明的融合蛋白质显示出 3 ～ 4 倍提高的半衰期。

[0134] 表 6

[0135] [表 6]

[0136]

类型	半衰期(分钟)
FVII-GS1-Tf	254.2±19.1
FVII-GS3-Tf	227.4±23.5
FVII-GS1-T-Tf	235.4±27.4
FVII-GS15-Tf	257.0±23.9
FVII-Tf	277.0±24.5
诺其(NovoSeven)	80.3±27.4
天然型 FVII	59.6±2.9

[0001]

序列表

<110> SK化学公司

<120> 具有因子VII活性的融合蛋白质

<130> PCB105030

<150> KR 10-2010-0052719
<151> 2010-06-04

<160> 53

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 444
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(444)
<223> 因子VII蛋白

<400> 1

```
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln
  1               5                  10                  15

Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val
             20                  25                  30

Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro
         35                  40                  45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu
     50                  55                  60

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

Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly
                 85                  90                  95

Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro
            100                 105                 110

Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile
        115                 120                 125

Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr
```

[0002]

130 135 140

Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala
145 150 155 160

Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile
165 170 175

Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val
180 185 190

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu
195 200 205

Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile
210 215 220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg
225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly
245 250 255

Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr
260 265 270

Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln
275 280 285

Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg
290 295 300

Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser
305 310 315 320

Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met
325 330 335

Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser
340 345 350

Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala
355 360 365

Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly
370 375 380

Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val
385 390 395 400

Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr
405 410 415

[0003]

Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu
420 425 430

Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro
435 440

<210> 2
<211> 679
<212> PRT
<213> 人

<220>
<221> 肽
<222> (1)..(679)
<223> 转铁蛋白

<400> 2
Val Pro Asp Lys Thr Val Arg Trp Cys Ala Val Ser Glu His Glu Ala
1 5 10 15

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

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

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

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

Val Ala Glu Phe Tyr Gly Ser Lys Glu Asp Pro Gln Thr Phe Tyr Tyr
85 90 95

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Asp Ser Gly Phe Gln Met Asn Gln Leu
100 105 110

Arg Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp
115 120 125

Asn Ile Pro Ile Gly Leu Leu Tyr Cys Asp Leu Pro Glu Pro Arg Lys
130 135 140

Pro Leu Glu Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser Gly Ser Cys Ala Pro
145 150 155 160

Cys Ala Asp Gly Thr Asp Phe Pro Gln Leu Cys Gln Leu Cys Pro Gly
165 170 175

[0004]

Cys Gly Cys Ser Thr Leu Asn Gln Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe
180 185 190

Lys Cys Leu Lys Asp Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Ser
195 200 205

Thr Ile Phe Glu Asn Leu Ala Asn Lys Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu
210 215 220

Leu Leu Cys Leu Asp Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Glu Tyr Lys Asp
225 230 235 240

Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His Thr Val Val Ala Arg Ser Met
245 250 255

Gly Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Glu Leu Leu Asn Gln Ala Gln Glu
260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0005]

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Cys Thr Phe Arg Arg Pro
675

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

[0006]

<223> 接头 GS-1

<400> 3
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-3

<400> 4
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-5

<400> 5
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25

<210> 6
<211> 35
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-7

<400> 6
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

[0007]

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser
35

<210> 7
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-9

<400> 7
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
35 40 45

<210> 8
<211> 55
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-11

<400> 8
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
50 55

<210> 9
<211> 65

[0008]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-13

<400> 9
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Ser
65

<210> 10
<211> 75
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS-15

<400> 10
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
35 40 45

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
50 55 60

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
65 70 75

<210> 11
<211> 23

[0009]

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头螺旋

<400> 11
Gly Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala
1 5 10 15

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Ala
20

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头 GS1-T

<400> 12
Gly Gly Gly Gly Ser Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 13
<211> 3378
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-Tf蛋白质的基因序列

<400> 13
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

[0010]

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgt ccctgataaa actgtgagat ggtgtgcagt gtcggagcat 1380

gaggccacta agtgccagag tttccgcgac catatgaaaa gcgtcattcc atccgatggt 1440

cccagtgttg cttgtgtgaa gaaagcctcc taccttgatt gcatcagggc cattgcggca 1500

aacgaagcgg atgctgtgac actggatgca ggtttggtgt atgatgctta cctggctccc 1560

aataacctga agcctgtggt ggcagagttc tatgggtcaa aagaggatcc acagactttc 1620

tattatgctg ttgctgtggt gaagaaggat agtggcttcc agatgaacca gcttcgaggc 1680

aagaagtcct gccacacggg tctaggcagg tccgctgggt ggaacatccc cataggctta 1740

ctttactgtg acttacctga gccacgtaaa cctcttgaga aagcagtggc caatttcttc 1800

tcgggcagct gtgccccttg tgcggatggg acggacttcc cccagctgtg tcaactgtgt 1860

ccagggtgtg gctgctccac ccttaaccaa tacttcggct actcaggagc cttcaagtgt 1920

ctgaaggatg gtgctgggga tgtggccttt gtcaagcact cgactatatt tgagaacttg 1980

[0011]

gcaaacaagg ctgacaggga ccagtatgag ctgctttgcc tggacaacac ccggaagccg 2040

gtagatgaat acaaggactg ccacttggcc caggtccctt ctcataccgt cgtggcccga 2100

agtatgggcg gcaaggagga cttgatctgg gagcttctca accaggccca ggaacatttt 2160

ggcaaagaca aatcaaaaga attccaacta ttcagctctc ctcatgggaa ggacctgctg 2220

tttaaggact ctgcccacgg gtttttaaaa gtccccccca ggatggatgc caagatgtac 2280

ctgggctatg agtatgtcac tgccatccgg aatctacggg aaggcacatg cccagaagcc 2340

ccaacagatg aatgcaagcc tgtgaagtgg tgtgcgctga gccaccacga gaggctcaag 2400

tgtgatgagt ggagtgttaa cagtgtaggg aaaatagagt gtgtatcagc agagaccacc 2460

gaagactgca tcgccaagat catgaatgga gaagctgatg ccatgagctt ggatggaggg 2520

tttgtctaca tagcgggcaa gtgtggtctg gtgcctgtct tggcagaaaa ctacaataag 2580

agcgataatt gtgaggatac accagaggca gggtattttg ctgtagcagt ggtgaagaaa 2640

tcagcttctg acctcacctg ggacaatctg aaaggcaaga agtcctgcca tacggcagtt 2700

ggcagaaccg ctggctggaa catccccatg ggcctgctct acaataagat caaccactgc 2760

agatttgatg aatttttcag tgaaggttgt gcccctgggt ctaagaaaga ctccagtctc 2820

tgtaagctgt gtatgggctc aggcctaaac ctgtgtgaac ccaacaacaa agagggatac 2880

tacggctaca caggcgcttt caggtgtctg gttgagaagg gagatgtggc ctttgtgaaa 2940

caccagactg tcccacagaa cactggggga aaaaaccctg atccatgggc taagaatctg 3000

aatgaaaaag actatgagtt gctgtgcctt gatggtacca ggaaacctgt ggaggagtat 3060

gcgaactgcc acctggccag agccccgaat cacgctgtgg tcacacggaa agataaggaa 3120

gcttgcgtcc acaagatatt acgtcaacag cagcacctat ttggaagcaa cgtaactgac 3180

tgctcgggca acttttgttt gttccggtcg gaaaccaagg accttctgtt cagagatgac 3240

acagtatgtt tggccaaact tcatgacaga aacacatatg aaaaatactt aggagaagaa 3300

tatgtcaagg ctgttggtaa cctgagaaaa tgctccacct catcactcct ggaagcctgc 3360

actttccgta gaccttaa 3378

<210> 14
<211> 3387

[0012]

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS1-Tf蛋白质的基因序列

<400> 14
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

[0013]

gccccatttc ccggtggagg cggatccgtc cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg 1380

tcggagcatg aggccactaa gtgccagagt ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca 1440

tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag aaagcctcct accttgattg catcagggcc 1500

attgcggcaa acgaagcgga tgctgtgaca ctggatgcag gtttggtgta tgatgcttac 1560

ctggctccca ataacctgaa gcctgtggtg gcagagttct atgggtcaaa agaggatcca 1620

cagactttct attatgctgt tgctgtggtg aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag 1680

cttcgaggca agaagtcctg ccacacgggt ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc 1740

ataggcttac tttactgtga cttacctgag ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc 1800

aatttcttct cgggcagctg tgcccttgt gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt 1860

caactgtgtc cagggtgtgg ctgctccacc cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc 1920

ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat gtggcctttg tcaagcactc gactatattt 1980

gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac cagtatgagc tgctttgcct ggacaacacc 2040

cggaagccgg tagatgaata caaggactgc cacttggccc aggtcccttc tcataccgtc 2100

gtggcccgaa gtatgggcgg caaggaggac ttgatctggg agcttctcaa ccaggcccag 2160

gaacattttg gcaaagacaa atcaaaagaa ttccaactat tcagctctcc tcatgggaag 2220

gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg ttttttaaaag tccccccccag gatggatgcc 2280

aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact gccatccgga atctacggga aggcacatgc 2340

ccagaagccc caacagatga atgcaagcct gtgaagtggt gtgcgctgag ccaccacgag 2400

aggctcaagt gtgatgagtg gagtgttaac agtgtaggga aaatagagtg tgtatcagca 2460

gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc atgaatggag aagctgatgc catgagcttg 2520

gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag tgtggtctgg tgcctgtctt ggcagaaaac 2580

tacaataaga gcgataattg tgaggataca ccagaggcag ggtattttgc tgtagcagtg 2640

gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg gacaatctga aaggcaagaa gtcctgccat 2700

acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac atccccatgg gcctgctcta caataagatc 2760

aaccactgca gatttgatga atttttcagt gaaggttgtg cccctgggtc taagaaagac 2820

tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa 2880

[0014]

gagggatact acggctacac aggcgctttc aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc 2940

tttgtgaaac accagactgt cccacagaac actgggggaa aaaaccctga tccatgggct 3000

aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg 3060

gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga gccccgaatc acgctgtggt cacacggaaa 3120

gataaggaag cttgcgtcca caagatatta cgtcaacagc agcacctatt tggaagcaac 3180

gtaactgact gctcgggcaa cttttgtttg ttccggtcgg aaaccaagga ccttctgttc 3240

agagatgaca cagtatgttt ggccaaactt catgacagaa acacatatga aaaatactta 3300

ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg 3360

gaagcctgca ctttccgtag accttaa 3387

<210> 15
<211> 3426
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS3-Tf蛋白质的基因序列

<400> 15
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

[0015]

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1380

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1440

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1500

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1560

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1620

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1680

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1740

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1800

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1860

gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1920

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 1980

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2040

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2100

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2160

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2220

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2280

[0016]

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2340

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2400

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2460

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2520

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2580

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2640

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2700

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2760

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2820

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2880

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 2940

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3000

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3060

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3120

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3180

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3240

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3300

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3360

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3420

ccttaa 3426

<210> 16
<211> 3456
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS5-Tf蛋白质的基因序列

<400> 16

[0017]

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1440

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1500

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1560

[0018]

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1620

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1680

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1740

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1800

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1860

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gcccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 1920

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 1980

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2040

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2100

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2160

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2220

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2280

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2340

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2400

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2460

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2520

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2580

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2640

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2700

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2760

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2820

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 2880

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 2940

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3000

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3060

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3120

[0019]

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3180

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3240

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3300

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3360

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3420

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3456

<210> 17
<211> 3486
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS7-Tf蛋白质的基因序列

<400> 17
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

[0020]

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1440

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1500

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1560

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1620

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1680

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1740

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1800

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1860

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1920

gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1980

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 2040

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2100

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2160

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2220

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2280

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2340

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2400

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2460

[0021]

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2520

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2580

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2640

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2700

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2760

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2820

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2880

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2940

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3000

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3060

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3120

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3180

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3240

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3300

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3360

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3420

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3480

ccttaa 3486

<210> 18
<211> 3516
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS9-Tf蛋白质的基因序列

<400> 18
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

[0022]

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1500

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1560

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1620

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1680

[0023]

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1740

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1800

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1860

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1920

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 1980

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 2040

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2100

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2160

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2220

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2280

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2340

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2400

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2460

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2520

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2580

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2640

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2700

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2760

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2820

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2880

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 2940

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 3000

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3060

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3120

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3180

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3240

[0024]

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3300

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3360

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3420

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3480

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3516

<210> 19
<211> 3546
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS11-Tf蛋白质的基因序列

<400> 19
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

[0025]

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1500

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1560

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1620

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1680

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1740

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1800

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1860

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1920

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1980

gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 2040

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 2100

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2160

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2220

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2280

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2340

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2400

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2460

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2520

[0026]

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2580

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2640

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2700

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2760

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2820

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2880

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2940

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 3000

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3060

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3120

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3180

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3240

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3300

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3360

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3420

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3480

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3540

ccttaa 3546

<210> 20
<211> 3576
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS13-Tf蛋白质的基因序列

<400> 20
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

[0027]

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1500

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg 1560

tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc 1620

gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc 1680

[0028]

atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat 1740

gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa 1800

gaggatccac agactttcta ttatgctgtt gctgtggtga agaaggatag tggcttccag 1860

atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg 1920

aacatcccca taggcttact ttactgtgac ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa 1980

gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt gccccttgtg cggatgggac ggacttcccc 2040

cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac 2100

tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt gctggggatg tggcctttgt caagcactcg 2160

actatatttg agaacttggc aaacaaggct gacagggacc agtatgagct gctttgcctg 2220

gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac aaggactgcc acttggccca ggtcccttct 2280

cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc aaggaggact tgatctggga gcttctcaac 2340

caggcccagg aacattttgg caaagacaaa tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct 2400

catgggaagg acctgctgtt taaggactct gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg 2460

atggatgcca agatgtacct gggctatgag tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa 2520

ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc 2580

caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt 2640

gtatcagcag agaccaccga agactgcatc gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc 2700

atgagcttgg atggagggtt tgtctacata gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg 2760

gcagaaaact acaataagag cgataattgt gaggatacac cagaggcagg gtattttgct 2820

gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag 2880

tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct ggctggaaca tccccatggg cctgctctac 2940

aataagatca accactgcag atttgatgaa tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct 3000

aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc 3060

aacaacaaag agggatacta cggctacaca ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga 3120

gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat 3180

ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg 3240

[0029]

aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc 3300

acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac aagatattac gtcaacagca gcacctattt 3360

ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac 3420

cttctgttca gagatgacac agtatgtttg gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa 3480

aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca 3540

tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga ccttaa 3576

<210> 21
<211> 3606
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS15-Tf蛋白质的基因序列

<400> 21
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

[0030]

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggttca ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1380

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1440

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct 1500

ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc 1560

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1620

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1680

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1740

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1800

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1860

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1920

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1980

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 2040

gcccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 2100

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 2160

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2220

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2280

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2340

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2400

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2460

[0031]

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2520

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2580

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2640

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2700

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2760

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2820

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2880

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2940

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 3000

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 3060

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 3120

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3180

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3240

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3300

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3360

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3420

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3480

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3540

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3600

ccttaa 3606

<210> 22
<211> 3450
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-Helix-Tf蛋白质的基因序列

<400> 22

[0032]

atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgc tgaagctgca gccaaagaag ctgcagccaa agaggccgca 1380

gctaaggaag ccgcagcaaa agctaccggt gtccctgata aaactgtgag atggtgtgca 1440

gtgtcggagc atgaggccac taagtgccag agtttccgcg accatatgaa aagcgtcatt 1500

ccatccgatg gtcccagtgt tgcttgtgtg aagaaagcct cctaccttga ttgcatcagg 1560

[0033]

gccattgcgg caaacgaagc ggatgctgtg acactggatg caggtttggt gtatgatgct 1620

tacctggctc ccaataacct gaagcctgtg gtggcagagt tctatgggtc aaaagaggat 1680

ccacagactt tctattatgc tgttgctgtg gtgaagaagg atagtggctt ccagatgaac 1740

cagcttcgag gcaagaagtc ctgccacacg ggtctaggca ggtccgctgg gtggaacatc 1800

cccataggct tactttactg tgacttacct gagccacgta aacctcttga gaaagcagtg 1860

gccaatttct tctcgggcag ctgtgcccct tgtgcggatg ggacggactt cccccagctg 1920

tgtcaactgt gtccagggtg tggctgctcc acccttaacc aatacttcgg ctactcagga 1980

gccttcaagt gtctgaagga tggtgctggg gatgtggcct ttgtcaagca ctcgactata 2040

tttgagaact tggcaaacaa ggctgacagg gaccagtatg agctgctttg cctggacaac 2100

acccggaagc cggtagatga atacaaggac tgccacttgg cccaggtccc ttctcatacc 2160

gtcgtggccc gaagtatggg cggcaaggag gacttgatct gggagcttct caaccaggcc 2220

caggaacatt ttggcaaaga caaatcaaaa gaattccaac tattcagctc tcctcatggg 2280

aaggacctgc tgtttaagga ctctgcccac gggtttttaa aagtcccccc caggatggat 2340

gccaagatgt acctgggcta tgagtatgtc actgccatcc ggaatctacg ggaaggcaca 2400

tgcccagaag ccccaacaga tgaatgcaag cctgtgaagt ggtgtgcgct gagccaccac 2460

gagaggctca agtgtgatga gtggagtgtt aacagtgtag ggaaaataga gtgtgtatca 2520

gcagagacca ccgaagactg catcgccaag atcatgaatg gagaagctga tgccatgagc 2580

ttggatggag ggtttgtcta catagcgggc aagtgtggtc tggtgcctgt cttggcagaa 2640

aactacaata agagcgataa ttgtgaggat acaccagagg cagggtattt tgctgtagca 2700

gtggtgaaga aatcagcttc tgacctcacc tgggacaatc tgaaaggcaa gaagtcctgc 2760

catacggcag ttggcagaac cgctggctgg aacatcccca tgggcctgct ctacaataag 2820

atcaaccact gcagatttga tgaatttttc agtgaaggtt gtgcccctgg gtctaagaaa 2880

gactccagtc tctgtaagct gtgtatgggc tcaggcctaa acctgtgtga acccaacaac 2940

aaagagggat actacggcta cacaggcgct ttcaggtgtc tggttgagaa gggagatgtg 3000

gcctttgtga aacaccagac tgtcccacag aacactgggg gaaaaaaccc tgatccatgg 3060

gctaagaatc tgaatgaaaa agactatgag ttgctgtgcc ttgatggtac caggaaacct 3120

[0034]

gtggaggagt atgcgaactg ccacctggcc agagccccga atcacgctgt ggtcacacgg 3180

aaagataagg aagcttgcgt ccacaagata ttacgtcaac agcagcacct atttggaagc 3240

aacgtaactg actgctcggg caacttttgt ttgttccggt cggaaaccaa ggaccttctg 3300

ttcagagatg acacagtatg tttggccaaa cttcatgaca gaaacacata tgaaaaatac 3360

ttaggagaag aatatgtcaa ggctgttggt aacctgagaa aatgctccac ctcatcactc 3420

ctggaagcct gcactttccg tagaccttaa 3450

<210> 23
<211> 3426
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS1-T-Tf蛋白质的基因序列

<400> 23
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

[0035]

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccaccggtgg aggcggatcc ctggtgccgc gcggcagcgg aggcggttca 1380

accggtgtcc ctgataaaac tgtgagatgg tgtgcagtgt cggagcatga ggccactaag 1440

tgccagagtt tccgcgacca tatgaaaagc gtcattccat ccgatggtcc cagtgttgct 1500

tgtgtgaaga aagcctccta ccttgattgc atcagggcca ttgcggcaaa cgaagcggat 1560

gctgtgacac tggatgcagg tttggtgtat gatgcttacc tggctcccaa taacctgaag 1620

cctgtggtgg cagagttcta tgggtcaaaa gaggatccac agactttcta ttatgctgtt 1680

gctgtggtga agaaggatag tggcttccag atgaaccagc ttcgaggcaa gaagtcctgc 1740

cacacgggtc taggcaggtc cgctgggtgg aacatcccca taggcttact ttactgtgac 1800

ttacctgagc cacgtaaacc tcttgagaaa gcagtggcca atttcttctc gggcagctgt 1860

gcccccttgtg cggatgggac ggacttcccc cagctgtgtc aactgtgtcc agggtgtggc 1920

tgctccaccc ttaaccaata cttcggctac tcaggagcct tcaagtgtct gaaggatggt 1980

gctggggatg tggcctttgt caagcactcg actatatttg agaacttggc aaacaaggct 2040

gacagggacc agtatgagct gctttgcctg gacaacaccc ggaagccggt agatgaatac 2100

aaggactgcc acttggccca ggtcccttct cataccgtcg tggcccgaag tatgggcggc 2160

aaggaggact tgatctggga gcttctcaac caggcccagg aacattttgg caaagacaaa 2220

tcaaaagaat tccaactatt cagctctcct catgggaagg acctgctgtt taaggactct 2280

gcccacgggt ttttaaaagt ccccccccagg atggatgcca agatgtacct gggctatgag 2340

tatgtcactg ccatccggaa tctacgggaa ggcacatgcc cagaagcccc aacagatgaa 2400

tgcaagcctg tgaagtggtg tgcgctgagc caccacgaga ggctcaagtg tgatgagtgg 2460

[0036]

agtgttaaca gtgtagggaa aatagagtgt gtatcagcag agaccaccga agactgcatc 2520

gccaagatca tgaatggaga agctgatgcc atgagcttgg atggagggtt tgtctacata 2580

gcgggcaagt gtggtctggt gcctgtcttg gcagaaaact acaataagag cgataattgt 2640

gaggatacac cagaggcagg gtattttgct gtagcagtgg tgaagaaatc agcttctgac 2700

ctcacctggg acaatctgaa aggcaagaag tcctgccata cggcagttgg cagaaccgct 2760

ggctggaaca tccccatggg cctgctctac aataagatca accactgcag atttgatgaa 2820

tttttcagtg aaggttgtgc ccctgggtct aagaaagact ccagtctctg taagctgtgt 2880

atgggctcag gcctaaacct gtgtgaaccc aacaacaaag agggatacta cggctacaca 2940

ggcgctttca ggtgtctggt tgagaaggga gatgtggcct ttgtgaaaca ccagactgtc 3000

ccacagaaca ctgggggaaa aaaccctgat ccatgggcta agaatctgaa tgaaaaagac 3060

tatgagttgc tgtgccttga tggtaccagg aaacctgtgg aggagtatgc gaactgccac 3120

ctggccagag ccccgaatca cgctgtggtc acacggaaag ataaggaagc ttgcgtccac 3180

aagatattac gtcaacagca gcacctattt ggaagcaacg taactgactg ctcgggcaac 3240

ttttgtttgt tccggtcgga aaccaaggac cttctgttca gagatgacac agtatgtttg 3300

gccaaacttc atgacagaaa cacatatgaa aaatacttag gagaagaata tgtcaaggct 3360

gttggtaacc tgagaaaatg ctccacctca tcactcctgg aagcctgcac tttccgtaga 3420

ccttaa 3426

<210> 24
<211> 3417
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 编码FVII-GS1-T-Tf(M3)蛋白质的基因序列

<400> 24
atggtctccc aggccctcag gctcctctgc cttctgcttg ggcttcaggg ctgcctggct 60

gcagtcttcg taacccagga ggaagcccac ggcgtcctgc accggcgccg gcgcgccaac 120

gcgttcctgg aggagctgcg gccgggctcc ctggagaggg agtgcaagga ggagcagtgc 180

[0037]

tccttcgagg aggcccggga gatcttcaag gacgcggaga ggacgaagct gttctggatt 240

tcttacagtg atggggacca gtgtgcctca agtccatgcc agaatggggg ctcctgcaag 300

gaccagctcc agtcctatat ctgcttctgc ctccctgcct tcgagggccg gaactgtgag 360

acgcacaagg atgaccagct gatctgtgtg aacgagaacg gcggctgtga gcagtactgc 420

agtgaccaca cgggcaccaa gcgctcctgt cggtgccacg aggggtactc tctgctggca 480

gacggggtgt cctgcacacc cacagttgaa tatccatgtg gaaaaatacc tattctagaa 540

aaaagaaatg ccagcaaacc ccaaggccga attgtggggg gcaaggtgtg ccccaaaggg 600

gagtgtccat ggcaggtcct gttgttggtg aatggagctc agttgtgtgg ggggaccctg 660

atcaacacca tctgggtggt ctccgcggcc cactgtttcg acaaaatcaa gaactggagg 720

aacctgatcg cggtgctggg cgagcacgac ctcagcgagc acgacgggga tgagcagagc 780

cggcgggtgg cgcaggtcat catccccagc acgtacgtcc cgggcaccac caaccacgac 840

atcgcgctgc tccgcctgca ccagcccgtg gtcctcactg accatgtggt gcccctctgc 900

ctgcccgaac ggacgttctc tgagaggacg ctggccttcg tgcgcttctc attggtcagc 960

ggctggggcc agctgctgga ccgtggcgcc acggccctgg agctcatggt cctcaacgtg 1020

ccccggctga tgacccagga ctgcctgcag cagtcacgga aggtgggaga ctccccaaat 1080

atcacggagt acatgttctg tgccggctac tcggatggca gcaaggactc ctgcaagggg 1140

gacagtggag gcccacatgc cacccactac cggggcacgt ggtacctgac gggcatcgtc 1200

agctggggcc agggctgcgc aaccgtgggc cactttgggg tgtacaccag ggtctcccag 1260

tacatcgagt ggctgcaaaa gctcatgcgc tcagagccac gcccaggagt cctcctgcga 1320

gccccatttc ccggtggagg cggatccctg gtgccgcgcg gcagcggagg cggttcagtc 1380

cctgataaaa ctgtgagatg gtgtgcagtg tcggagcatg aggccactaa gtgccagagt 1440

ttccgcgacc atatgaaaag cgtcattcca tccgatggtc ccagtgttgc ttgtgtgaag 1500

aaagcctcct accttgattg catcagggcc attgcggcaa acgaagcgga tgctgtgaca 1560

ctggatgcag gtttggtgta tgatgcttac ctggctccca ataacctgaa gcctgtggtg 1620

gcagagttct atgggtcaaa agaggatcca cagactttct attatgctgt tgctgtggtg 1680

aagaaggata gtggcttcca gatgaaccag cttcgaggca agaagtcctg ccacacgggt 1740

[0038]

ctaggcaggt ccgctgggtg gaacatcccc ataggcttac tttactgtga cttacctgag 1800

ccacgtaaac ctcttgagaa agcagtggcc aatttcttct cgggcagctg tgcccttgt 1860

gcggatggga cggacttccc ccagctgtgt caactgtgtc cagggtgtgg ctgctccacc 1920

cttaaccaat acttcggcta ctcaggagcc ttcaagtgtc tgaaggatgg tgctggggat 1980

gtggcctttg tcaagcactc gactatattt gagaacttgg caaacaaggc tgacagggac 2040

cagtatgagc tgctttgcct ggacaacacc cggaagccgg tagatgaata caaggactgc 2100

cacttggccc aggtcccttc tcataccgtc gtggcccgaa gtatgggcgg caaggaggac 2160

ttgatctggg agcttctcaa ccaggcccag gaacattttg gcaaagacaa atcaaaagaa 2220

ttccaactat tcagctctcc tcatgggaag gacctgctgt ttaaggactc tgcccacggg 2280

tttttaaaag tccccccccag gatggatgcc aagatgtacc tgggctatga gtatgtcact 2340

gccatccgga atctacggga aggcacatgc ccagaagccc caacagatga atgcaagcct 2400

gtgaagtggt gtgcgctgag ccaccacgag aggctcaagt gtgatgagtg gagtgttaac 2460

agtgtaggga aaatagagtg tgtatcagca gagaccaccg aagactgcat cgccaagatc 2520

atgaatggag aagctgatgc catgagcttg gatggagggt ttgtctacat agcgggcaag 2580

tgtggtctgg tgcctgtctt ggcagaaaac tacaataaga gcgataattg tgaggataca 2640

ccagaggcag ggtattttgc tgtagcagtg gtgaagaaat cagcttctga cctcacctgg 2700

gacaatctga aaggcaagaa gtcctgccat acggcagttg gcagaaccgc tggctggaac 2760

atccccatgg gcctgctcta caataagatc aaccactgca gatttgatga atttttcagt 2820

gaaggttgtg cccctgggtc taagaaagac tccagtctct gtaagctgtg tatgggctca 2880

ggcctaaacc tgtgtgaacc caacaacaaa gagggatact acggctacac aggcgctttc 2940

aggtgtctgg ttgagaaggg agatgtggcc tttgtgaaac accagactgt cccacagaac 3000

actgggggaa aaaaccctga tccatgggct aagaatctga atgaaaaaga ctatgagttg 3060

ctgtgccttg atggtaccag gaaacctgtg gaggagtatg cgaactgcca cctggccaga 3120

gccccgaatc acgctgtggt cacacggaaa gataaggaag cttgcgtcca caagatatta 3180

cgtcaacagc agcacctatt tggaagcaac gtaactgact gctcgggcaa cttttgtttg 3240

ttccggtcgg aaaccaagga ccttctgttc agagatgaca cagtatgttt ggccaaactt 3300

[0039]

catgacagaa acacatatga aaaatactta ggagaagaat atgtcaaggc tgttggtaac 3360

ctgagaaaat gctccacctc atcactcctg gaagcctgca ctttccgtag accttaa 3417

<210> 25
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-F 引物

<400> 25
aggggcagca ctgcagagat ttcat 25

<210> 26
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-R 引物

<400> 26
tatgggattt ggtgccagga cagtt 25

<210> 27
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-S1 引物

<400> 27
aattgctagc atggtctccc aggccctcag g 31

<210> 28
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> FVII-AS1 引物

[0040]

<400> 28
aattaccggt gggaaatggg gctcgcagga g 31

<210> 29
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Tf-S1 引物

<400> 29
atataccggt gtccctgata aaactgtgag atg 33

<210> 30
<211> 34
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Tf-AS1 引物

<400> 30
aattctcgag ttaaggtcta cggaaagtgc aggc 34

<210> 31
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GS-FV-AS1 引物

<400> 31
ggatccgcct ccaccgggaa atggggctcg caggag 36

<210> 32
<211> 40
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GS-Tf-S1 引物

[0041]

<400> 32
ggtggaggcg gatccgtccc tgataaaact gtgagatggt 40

<210> 33
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GS3-S 引物

<400> 33
ccggtggagg cggttcaggc ggaggtggct ctggcggtgg cggatcca 48

<210> 34
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GS3-AS 引物

<400> 34
acctccgcca agtccgcctc caccgagacc gccaccgcct aggtggcc 48

<210> 35
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> GS-2 接头单位

<400> 35
tattagatct ggcggaggtg gctctggcgg tggcggatcc accggtatta 50

<210> 36
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> dsGS1-T 接头

[0042]

<400> 36
aattaccggt ggaggcggat ccctggtgcc gcgcggcagc ggaggcggtt caaccggtat 60

60

<210> 37
<211> 58
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 螺旋接头 S 引物

<400> 37
aattaccggt gctgaagctg cagccaaaga agctgcagcc aaagaggccg cagctaag 58

<210> 38
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 螺旋接头 AS 引物

<400> 38
ttataccggt agcttttgct gcggcttcct tagctgcggc ctcttt 46

<210> 39
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 白蛋白-S 引物

<400> 39
gtgggatccg atgcacacaa gagtgaggtt g 31

<210> 40
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

[0043]

<223> 白蛋白-AS 引物

<400> 40
cacggatccc tataagccta aggcagcttg acttg 35

<210> 41
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸 1

<400> 41
gtgctcgagc gggggatctg gcgggtctgg aggctctgga gggtcgggag gctct 55

<210> 42
<211> 74
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 寡核苷酸 2

<400> 42
caagggccct tatcaggatc ccgaccctcc agacccgcca gatcccccag agcctccaga 60

gcctcccgac cctc 74

<210> 43
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> mut FVII(XhoI)-S 引物

<400> 43
gagccccatt tccctcgagc ccagcagccc tgg 33

<210> 44
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

[0044]

<220>
<223> mut FVII(XhoI)-AS 引物

<400> 44
ccagggctgc tgggctcgag ggaaatgggg ctc 33

<210> 45
<211> 31
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GS 接头 (EP1816201)

<400> 45
Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
20 25 30

<210> 46
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 Nhe-Tf

<400> 46
aattgctagc atgaggctcg ccgtg 25

<210> 47
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 Tf-Age

<400> 47
aattaccggt aggtctacgg aaagtgca 28

[0045]

<210> 48
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 Age-VII

<400> 48
aattaccggt gccaacgcgt tcctg 25

<210> 49
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 VII-Xho

<400> 49
aattctcgag ttagggaaat ggggctcg 28

<210> 50
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TG del-S

<400> 50
cagcggaggc ggttcagtcc ctgataaaac tg 32

<210> 51
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 TG del-AS

<400> 51
cagttttatc agggactgaa ccgcctccgc tg 32

[0046]

<210> 52
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 T del-S

<400> 52
cgagccccat ttcccggtgg aggcggatc 29

<210> 53
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物 T del-AS

<400> 53
gatccgcctc caccgggaaa tggggctcg 29

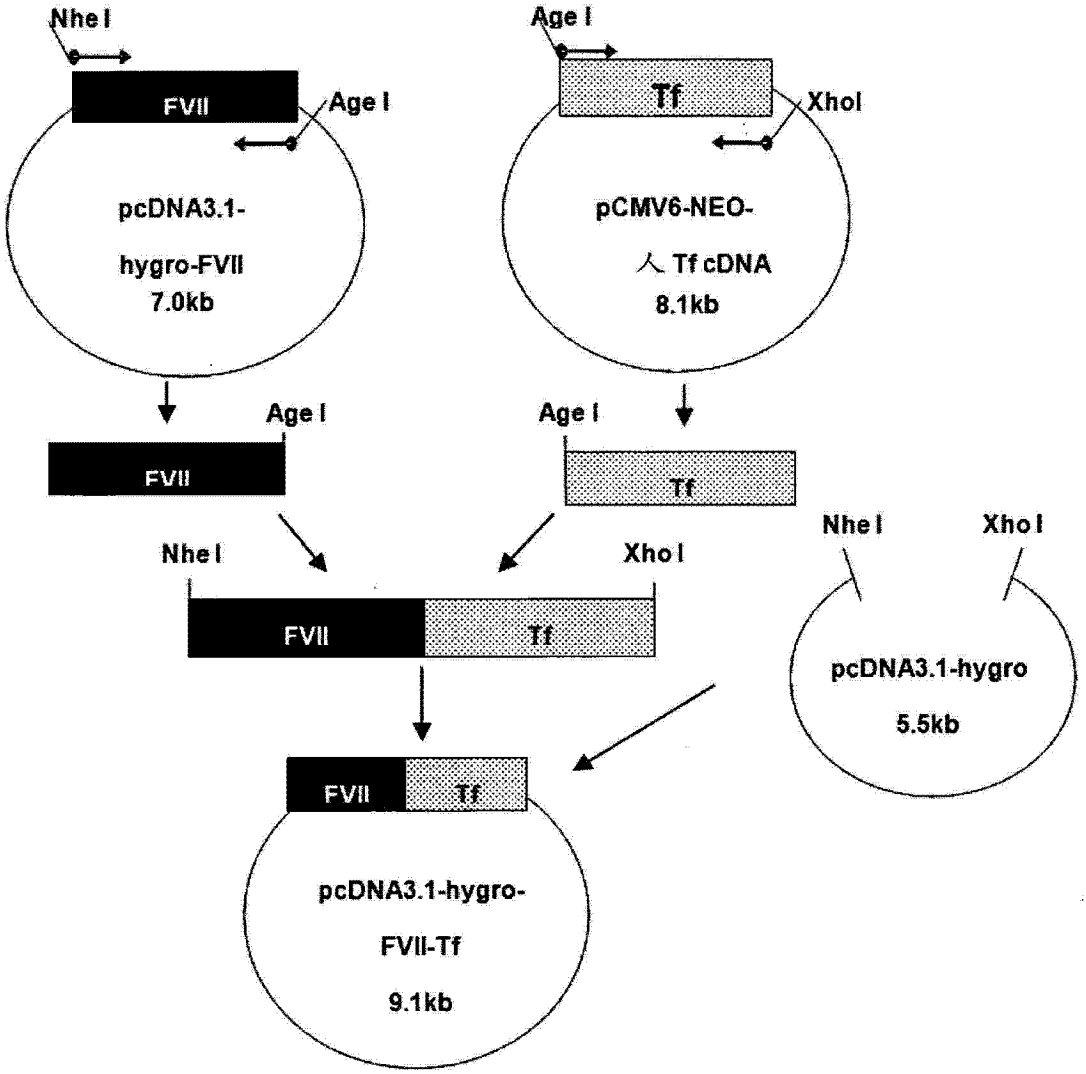

Nhe I
FVII
Age I
pcDNA3.1-
hygro-FVII
7.0kb
Age I
Tf
Xhol
pCMV6-NEO-
人 Tf cDNA
8.1kb
Age I
FVII
Age I
Tf
Nhe I
Xho I
FVII
Tf
Nhe I
Xho I
pcDNA3.1-hygro
5.5kb
FVII
Tf
pcDNA3.1-hygro-
FVII-Tf
9.1kb

图 1

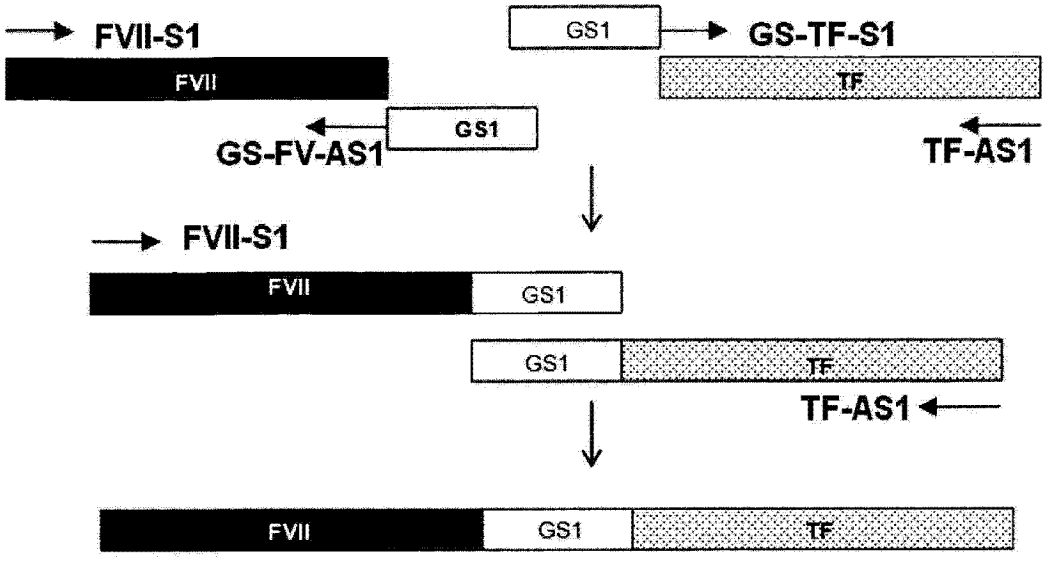

FVII-S1
FVII
GS1
GS-TF-S1
TF
GS1
GS-FV-AS1
TF-AS1
FVII-S1
FVII
GS1
GS1
TF
TF-AS1
FVII
GS1
TF

图 2

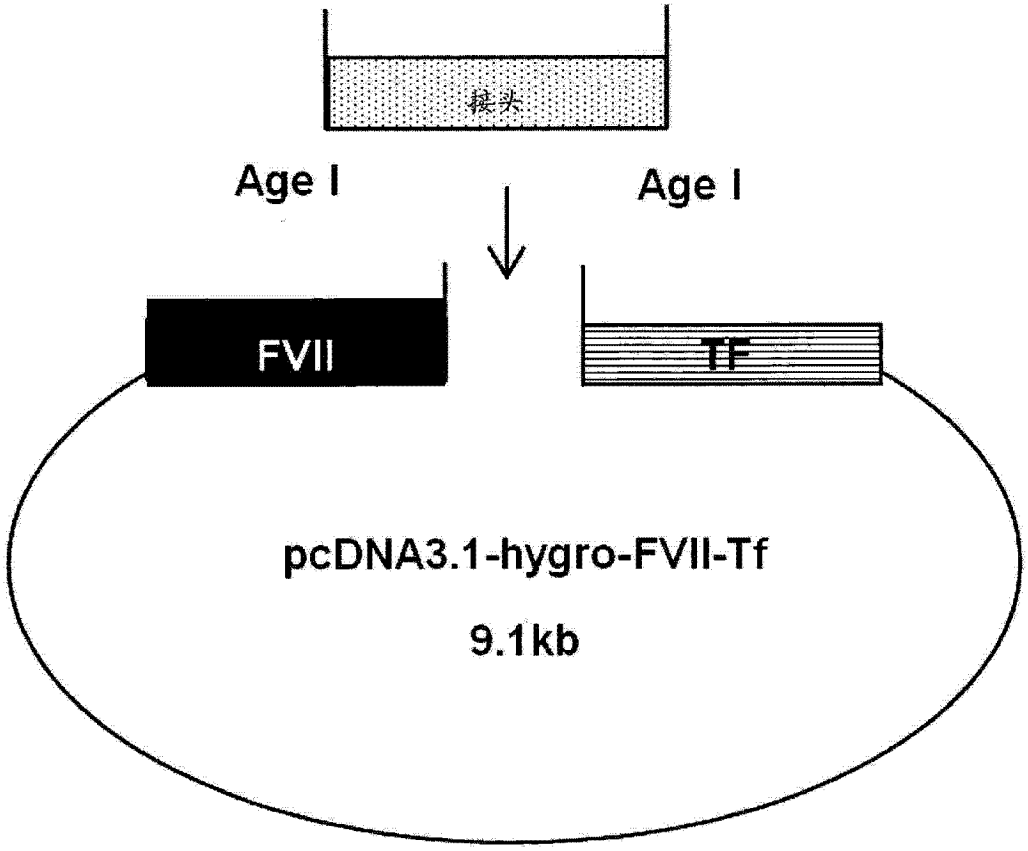

接头
Age I
Age I
FVII
TF
pcDNA3.1-hygro-FVII-Tf
9.1kb

图 3

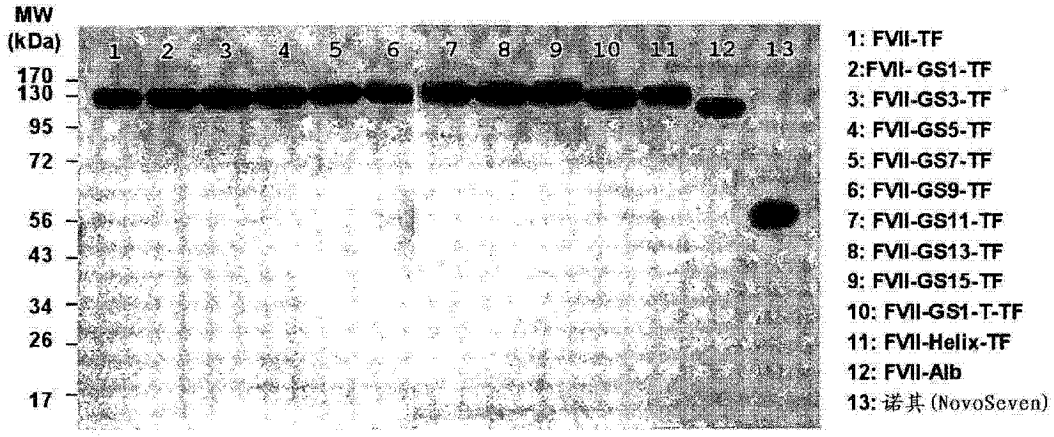

MW
(kDa)
170
130
95
72
56
43
34
26
17
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13
1: FVII-TF
2:FVII- GS1-TF
3: FVII-GS3-TF
4: FVII-GS5-TF
5: FVII-GS7-TF
6: FVII-GS9-TF
7: FVII-GS11-TF
8: FVII-GS13-TF
9: FVII-GS15-TF
10: FVII-GS1-T-TF
11: FVII-Helix-TF
12: FVII-Alb
13: 诺其 (NovoSeven)

图 4

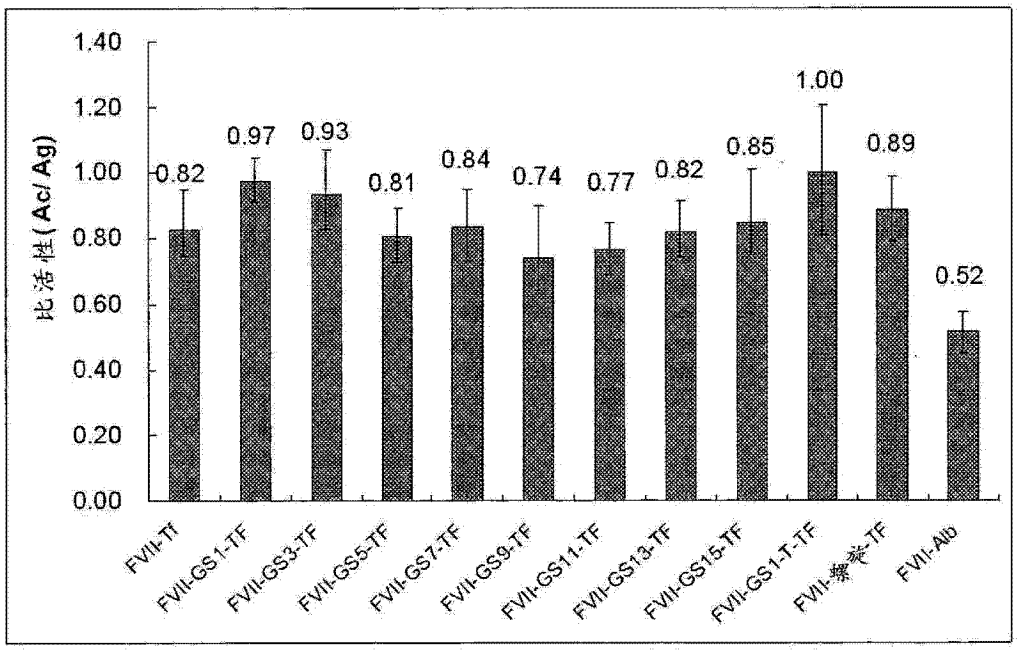

比活性(Ac/ Ag)
1.40
1.20
1.00
0.80
0.60
0.40
0.20
0.00
0.82
0.97
0.93
0.81
0.84
0.74
0.77
0.82
0.85
1.00
0.89
0.52
FVII-Tf
FVII-GS1-TF
FVII-GS3-TF
FVII-GS5-TF
FVII-GS7-TF
FVII-GS9-TF
FVII-GS11-TF
FVII-GS13-TF
FVII-GS15-TF
FVII-GS1-T-TF
FVII-螺旋-TF
FVII-Alb

图 5

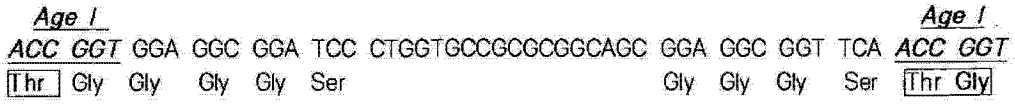

Age I
ACC GGT GGA GGC GGA TCC CTGGTGCCGCGCGGCAGC GGA GGC GGT TCA ACC GGT
Thr Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Thr Gly
Age I

图 6



1: 诺其（NovoSeven）
2: FVII
3: FVII-Tf
4: FVII-GS1-Tf
5: FVII-GS1-T-Tf
6: FVII-GS3-Tf
7: FVII-GS15-Tf

图 7