(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119192402 A
(43)申请公布日 2024.12.27

(21)申请号 202411408048.6
(22)申请日 2012.07.11
(30)优先权数据
61/599,400 2012.02.15 US
(62)分案原申请数据
201280072346.1 2012.07.11
(71)申请人 比奥贝拉蒂治疗公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 沃尔克·斯彻勒伯格 佩-云·常
伐巴德哈·瓦法杰 丁胜
约胜·斯沃曼 查-威·王
本杰明·斯平克
威廉·P·斯蒂姆 内森·吉森
约翰·库曼 刘童瑶
伽拉贝特·G·托比 江海燕
罗伯特·彼得斯 王德平 梅柏松
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴
(51)Int.Cl.
C07K 19/00(2006.01)
A61K 38/37(2006.01)
A61P 7/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书288页
序列表（电子公布） 附图59页

(54)发明名称

因子VIII组合物及其制备和使用方法

(57)摘要

本发明涉及包含连接于延伸重组多肽(XTEN)的因子VIII凝血因子的组合物、编码所述组合物的分离的核酸以及含有所述分离的核酸的载体和宿主细胞、以及制备所述组合物和使用所述组合物治疗因子VIII相关疾病、病症和病状的方法。

CN 119192402 A

1.重组因子VIII融合蛋白,其包含与至少一个延伸的重组多肽(XTEN)融合的因子VIII多肽,

其中所述因子VIII多肽包含A1结构域、A2结构域、A3结构域、a3结构域、C1结构域、C2结构域、和任选B结构域或所述B结构域的一部分。

2.如权利要求1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在选自所述A1结构域、所述A2结构域、所述A3结构域、所述B结构域、所述a3结构域、所述C1结构域、或所述C2结构域的至少一个结构域内,或者所述至少一个XTEN融合至所述因子VIII多肽的C-末端。

3.如权利要求1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN或插入在所述B结构域或所述B结构域的一部分中,或融合至所述因子VIII多肽的C-末端,或两者都有。

4.如权利要求1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在所述A1结构域、所述A2结构域、所述A3结构域、所述a3结构域或其任意组合中。

5.如权利要求2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A1结构域包含容许环-1(A1-1)区域和容许环-2(A1-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A1-1、A1-2或两者中。

6.如权利要求2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A2结构域包含容许环-1(A2-1)区域和容许环-2(A2-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A2-1、A2-2或两者中。

7.如权利要求2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A3结构域包含容许环-1(A3-1)区域和容许环-2(A3-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A3-1、A3-2或两者中。

8.如权利要求5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A1-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸15至约氨基酸45的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-1中。

9.如权利要求5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A1-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸18至约氨基酸32的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-1中。

10.如权利要求5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A1-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸201至约氨基酸232的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-2中。

因子VIII组合物及其制备和使用方法

[0001] 本申请是申请日为2012年7月11日、中国申请号为201911274326.2、发明名称为“因子VIII组合物及其制备和使用方法”的分案申请的再分案申请(母案原申请号为201280072346.1)。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2012年2月15日提交的美国临时申请序列号61/599,400的优先权,所述申请以引用的方式并入本文。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已通过EFS-Web以ASCII格式提交且据此以引用的方式整体并入本文的序列表。创建于2012年7月11目的所述ASCII拷贝命名为32887346.txt且大小为13,344,768字节。

背景技术

[0006] 因子VIII是内源性凝血级联路径的一种重要组分。在循环中,因子VIII主要与血管性血友病因子(vonWillebrand factor)复合。在由凝血酶(因子IIa)活化后,它自复合物解离以与因子IXa在内源性凝血级联中相互作用,此又会活化因子X。一旦自血管性血友病因子复合物移除,活化的因子VIII即由活化的蛋白质C(APC)、因子Xa及因子IXa蛋白水解失活,且自血流快速清除。当与正常血管性血友病因子蛋白复合时,因子VIII的半衰期是约12小时,而在不存在血管性血友病因子的情况下,因子VIII的半衰期降低至2小时(Tuddenham EG等,Br J Haematol.(1982)52(2):259-267)。

[0007] 在血友病中,血液凝结受缺乏某些血浆凝血因子干扰。甲型血友病是一种因子VIII缺乏症,且是一种占血友病病例的80%的隐性性连锁X染色体病症。管理甲型血友病的护理标准是用重组因子VIII浓缩物进行的补充疗法。患有重度甲型血友病的受试者具有低于正常值1-2%的循环促凝血因子VIII水平,且通常采用目的在于保持在各剂量之间因子VIII高于1%的防治性疗法,此可通常通过一周给予因子VIII两至三次来达成。患有中等重度血友病(因子VIII水平是正常值的2-5%)的人占25-30%的血友病事件且在轻微创伤之后显现出血。患有轻度甲型血友病(因子VIII水平是正常值的5-40%)的人占全部血友病事件的15-20%,且仅在重大创伤或手术之后发展出血。

[0008] 外源供应的因子VIII的体内活性受限于蛋白质半衰期较短与结合因子VIII且减弱或破坏止血功能的抑制剂两者。

[0009] 多达30%的接受外源供应的因子VIII的甲型血友病患者对因子VIII发动IgG免疫反应(Towfighi,F.等Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity.Acta Haematol(2005)114:84-90),此可导致完全抑制它的促凝血活性和/或促进因子VIII更快速清除(Briët E等High titerinhibitors in severe haemophilia A.A meta-analysis based on eight long-term follow-upstudies conceming inhibitors associated with crude or intermediate purity factor VIII

products.Throm.Haemost.(1994)72:162-164)。称为FVIII抑制剂的IgG抗体主要针对A2、A3及C2结构域(Scandella D等Localization of epitopes for human factor VIII inhibitor antibodies by immunoblotting and antibody neutralization.Blood (1989)74:1618-1626),但也可针对A1、B及C1结构域来产生。因此,用于具有FVIII抑制剂的患者的治疗选项是有限的。

[0010] 通常静脉内给予如因子VIII的大型蛋白质以使药剂在血流中直接可用。先前已证明肌肉内注射的未修饰因子VIII产生的最大循环水平仅为正常血浆水平的1.4%(Pool等,Ineffectiveness of Intramuscularly Injected Factor VIIIConcentrate in Two Hemophilic Patients.New EnglandJ.Medicine(1966)275(10):547-548)。可除通过静脉内途径以外施用的制剂将大大简化它们的使用,增加安全性,且导致大量成本节约。

[0011] 对治疗性蛋白质的化学修饰可改进它的体内清除速率及随后血清半衰期。常见修饰的一个实例是添加聚乙二醇(PEG)部分,其通常通过PEG上的醛或N-羟基丁二酰亚胺(NHS)基团与胺基团(例如赖氨酸侧链或N末端)反应来偶联于蛋白质。然而,缀合步骤可导致形成需要提取、纯化和/或其它进一步过程的异质产物混合物,所述所有过程都不可避免地影响产物产率及质量控制。此外,如果在凝血因子的结合位点附近的氨基酸侧链通过聚乙二醇化过程而变得被修饰,那么凝血因子的药理学功能可受阻碍。其它方法包括使Fc结构域基因融合于治疗性蛋白质,此会增加治疗性蛋白质的尺寸,因此降低通过肾进行清除的速率。在一些情况下,Fc结构域赋予结合FcRn受体,且通过FcRn受体自溶酶体再循环的能力,从而导致药代动力学半衰期增加。不幸的是,Fc结构域在重组表达期间不高效折叠,且倾向于形成称为包涵体的不溶性沉淀。这些包涵体必须被溶解且功能性蛋白质必须自错误折叠的聚集体复性,此为一种耗时、低效且昂贵的过程。

发明内容

[0012] 本发明涉及新型凝血因子VIII融合蛋白组合物及其用途。具体来说,本文提供的组合物特别用于治疗或改善与甲型血友病、因子VIII缺乏症、出血性病症和凝血病变相关的病状。在一方面,本发明提供包含因子VIII(FVIII)和一个或多个延伸重组多肽(XTEN)的分离的融合蛋白的组合物,其中所述融合蛋白展现促凝血活性。适用于构建所述融合蛋白的主题XTEN通常是具有非重复序列和非结构化构象的多肽。在一个实施方案中,一个或多个XTEN连接于选自天然人因子VIII、因子VIII B结构域缺失序列(“FVIII BDD”)及其序列变体(全部前述各者总称为“FVIII”或“CF”)的凝血因子FVIII(“CF”),从而产生重组因子VIII-XTEN融合蛋白(“CFXTEN”)。CFXTEN的因子VIII多肽组分包含A1结构域、A2结构域、C1结构域、C2结构域和任选B结构域或其部分。在一些实施方案中,通过描绘以上提及的结构域以包含酸性a1、a2和a3间隔子来进一步表征FVIII。在另一实施方案中,本公开涉及包含融合蛋白的药物组合物及其在用于治疗因子VIII相关病状的方法和方案中的用途。CFXTEN组合物相较于未连接于XTEN的FVIII具有增强的药代动力学和药理学性质,此可允许更便利的给药和改进功效。

[0013] 在第一方面,本发明涉及包含因子VIII多肽和一个或多个连接于所述因子VIII的延伸重组多肽(XTEN)的重组因子VIII融合蛋白。在一些实施方案中,本发明提供包含因子VIII多肽和至少一个延伸重组多肽(XTEN)的重组因子VIII融合蛋白,其中所述因子VIII多

肽包含含有a1酸性间隔子区域的A1结构域、含有a2酸性间隔子区域的A2结构域、含有a3酸性间隔子区域的A3结构域、C1结构域、C2结构域和任选B结构域的全部或一部分，且其中所述至少一个XTEN在以下各处连接于所述因子VIII多肽：(i)所述因子VIII多肽的C末端；(ii)如果存在B结构域的全部或一部分，那么在所述因子VIII多肽的B结构域内；(iii)在所述因子VIII多肽的所述A1结构域内；(iv)在所述因子VIII多肽的所述A2结构域内；(v)在所述因子VIII多肽的所述A3结构域内；(vi)在所述因子VIII多肽的所述C1结构域内；(vii)在所述因子VIII多肽的所述C2结构域内；(viii)在所述因子VIII多肽的N末端处，或(ix)在所述因子VIII多肽的两个结构域之间，其中相较于未连接于XTEN的相应因子VIII，当通过体外凝血测定进行测量时，所述融合蛋白保留至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％或500％的促凝血活性。在一个实施方案中，在前述重组因子VIII融合蛋白中，至少一个XTEN在于选自表5、表6、表7、表8和表9的位点的1至6个氨基酸处或内的位点处连接于所述因子VIII多肽。在其它实施方案中，本发明提供包含因子VIII多肽和至少第一延伸重组多肽(XTEN)的重组因子VIII融合蛋白，其中所述因子VIII多肽包含含有a1酸性间隔子区域的A1结构域、含有a2酸性间隔子区域的A2结构域、含有a3酸性间隔子区域的A3结构域、C1结构域、C2结构域和任选B结构域的全部或一部分，且其中所述第一XTEN在以下各处连接于所述因子VIII多肽：(i)所述因子VIII多肽的C末端；(ii)如果存在所述B结构域的全部或一部分，那么在所述因子VIII多肽的所述B结构域内；(iii)在所述因子VIII多肽的所述A1结构域内；(iv)在所述因子VIII多肽的所述A2结构域内；(v)在所述因子VIII多肽的所述A3结构域内；(vi)在所述因子VIII多肽的所述C1结构域内；或(vii)在所述因子VIII多肽的所述C2结构域内；且当相较于未连接于XTEN的相应因子VIII蛋白时，所述融合蛋白(a)在本文所述的体外凝血测定或本领域中已知的其它此类测定中，保留至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％或500％促凝血活性，和/或(b)在本文所述的体外结合测定或本领域中已知的其它此类测定中，展现与抗因子VIII抗体的结合降低。在一个实施方案中，在前述重组因子VIII融合蛋白中，至少一个XTEN在于选自表5、表6、表7、表8和表9的位点的1至6个氨基酸处或内的位点处连接于所述因子VIII多肽。在其它实施方案中，本发明提供包含因子VIII多肽和至少第一延伸重组多肽(XTEN)的重组因子VIII融合蛋白，其中所述因子VIII多肽包含含有a1酸性间隔子区域的A1结构域、含有a2酸性间隔子区域的A2结构域、含有a3酸性间隔子区域的A3结构域、C1结构域、C2结构域和任选B结构域的全部或一部分，且其中所述第一XTEN在选自表6及表7的插入位点处连接于所述因子VIII多肽且其中相较于未连接于XTEN的相应因子VIII蛋白，当通过本文所述的体外凝血测定或本领域中已知的其它此类测定进行测量时，所述融合蛋白保留至少约10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％或500％的促凝血活性。未连接于XTEN的因子VIII蛋白的非限制性实例包括天然FVIII、BDD FVIII、pBC100和来自表1的序列。在重组因子VIII融合蛋白的另一实施方案中，当最优比对时，因子VIII多肽与选自由以下组成的组的序列具有至少约80％序列同一性、或约90％、或约91％、或约92％、或约93％、或约94％、或约95％、或约96％、或约97％、或约98％或约99％至约100％序列同一性：表1的序列、图3中描绘的序列和图4中描绘的序列。在另一实施方案中，融合蛋白包含至少另一在所述因子VIII多肽的C末端处或在所述因子VIII多肽的B结构域内连接于所述因子VIII多肽或任选置换所述因子

VIII多肽的B结构域的XTEN。在一特定实施方案中,融合蛋白包含至少一个位于所述因子VIII多肽的B结构域内或任选置换所述因子VIII多肽的B结构域的XTEN序列。在另一特定实施方案中,融合蛋白包含至少一个在所述因子VIII多肽的C末端处连接于所述因子VIII多肽的XTEN序列。在一个实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含人因子VIII的B结构域缺失的变体,其中关于如图3中阐述的全长人因子VIII序列,所述B结构域缺失自在约氨基酸残基编号741至约750处的第一位置开始且在于氨基酸残基编号1635至约1648处的第二位置处结束。在另一实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含在所述因子VIII多肽的C末端处连接于所述因子VIII多肽的第一XTEN序列,和在所述因子VIII多肽的B结构域内或置换所述因子VIII多肽的B结构域的至少第二XTEN,其中关于如图3中阐述的全长人因子VIII序列,所述第二XTEN连接于约氨基酸残基编号741至约750的C末端和氨基酸残基编号1635至约1648的N末端,其中所述XTEN的累积长度是至少约100个氨基酸残基。在一个实施方案中,在前述融合蛋白中,第二XTEN在N745至P1640之间、或在S743至Q1638之间、或在P747至V1642之间、或在N745与Q1656之间、或在N745与S1657之间、或在N745与T1667之间、或在N745与Q1686之间、或在R747与V1642之间、或在T751与T1667之间连接因子VIII氨基酸。在一个实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含当最优比对时,相较于选自表21的具有类似长度的序列具有至少约80%序列同一性、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%至约100%序列同一性的序列。在另一实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含至少第二XTEN、任选第三XTEN、任选第四XTEN、任选第五XTEN和任选第六XTEN,其中所述第二、第三、第四、第五或第六XTEN各自在选自由以下组成的组的第二、第三、第四、第五或第六位点处连接于所述因子VIII多肽:来自表5、表6、表7、表8和表9的插入位点;在成熟因子VIII的氨基酸残基32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910的6个氨基酸内的位置;在所述因子VIII多肽的任何两个邻近结构域之间的位置,其中所述两个邻近结构域选自由A1和A2结构域、A2和B结构域、B和A3结构域、A3和C1结构域、以及C1和C2结构域组成的组;在所述因子VIII多肽的B结构域内的位置,其中所述第二XTEN连接于天然因子VIII序列的约氨基酸残基编号741至约750的C末端和氨基酸残基编号1635至约1648的N末端;和所述因子VIII多肽的C末端。在一个实施方案中,第一XTEN与第二XTEN相隔至少10个氨基酸、至少50个氨基酸、至少100个氨基酸、至少200个氨基酸、至少300个氨基酸或至少400个氨基酸。在包含至少第二XTEN、任选第三XTEN、任选第四XTEN、任选第五XTEN和任选第六XTEN的重组因子VIII融合蛋白的一个实施方案中,当最优比对时,各XTEN相较于选自由表4、表13、表14、表15、表16和表17中的序列组成的组的具有类似长度的XTEN,具有至少约80%序列同一性、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%、或约100%序列同一性。在重组因子VIII融合蛋白的另一实施方案中,所述重组因子VIII融合蛋白包含至少第二XTEN、任选第三XTEN、任选第四XTEN、任选第五XTEN和任选第六XTEN。在优选实施方案中,当向受试者施用时,重组因子VIII融合蛋白展现终末半衰期至少约3小时、或4小时、或6小时、或12小时、或13小时、或14小时、或16小时、或24小时、或48小时、或72小时、或96小时、或120小时、或144小时、或7天、或14天、或21天,其中所述受试者选自人和因子VIII/血管性血友病因子双重敲除小鼠。另外,在这个段落的实施方案中,相较于未连接

于XTEN的相应因子VIII,融合蛋白展现与抗因子VIII抗体的结合降低或保留的促凝血活性更大或两者。在一个实施方案中,当各自通过体外凝血测定加以测定时,相较于未连接于XTEN的相应因子VIII,在抗FVIII抗体存在下,重组因子VIII融合蛋白的促凝血活性大至少30%、或40%、50%、80%、100%、200%、300%、400%或500%。在一个实施方案中,使用毕提斯达(Bethesda)测定,利用选自由表10的抗体和来自具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者的多克隆抗体组成的组的抗因子VIII抗体测定融合蛋白与抗因子VIII抗体的降低的结合,其中融合蛋白的结合降低和促凝血活性保留是由相较于未连接于XTEN的因子VIII的毕提斯达效价,融合蛋白的毕提斯达效价降低至少约2、4、6、8、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、100或200个毕提斯达单位所证明。

[0014] 在一个实施方案中,重组因子VIII融合蛋白可例如包含一个或多个XTEN,其中当最优比对时,所述XTEN相较于一个或多个选自表4、表13、表14、表15、表16和表17的具有类似长度的XTEN具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性。

[0015] 在另一方面,本发明涉及包含呈特定N末端至C末端构型的FVIII和一个或多个XTEN的重组因子VIII融合蛋白。在CFXTEN组合物的一个实施方案中,本发明提供一种式I的重组因子VIII融合蛋白:

[0016] $(XTEN)_x$-CF-$(XTEN)_y$ I

[0017] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与来自表1的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。因此,CFXTEN融合组合物可具有XTEN-CF、XTEN-CF-XTEN或CF-XTEN构型。

[0018] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式II的重组因子VIII融合蛋白:

[0019] $(XTEN)_x$-$(S)_x$-(CF)-$(XTEN)_y$ II

[0020] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与表1中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。

[0021] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种重组因子VIII融合蛋白,其中所述融合蛋白具有式III:

[0022] $(XTEN)_x$-$(S)_x$-(CF)-$(S)_y$-$(XTEN)_y$ III

[0023] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与表1中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约

98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。

[0024] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式IV的重组因子VIII融合蛋白:

[0025] $(A1)-(XTEN)_u-(A2)-(XTEN)_v-(B)-(XTEN)_w-(A3-(XTEN)_x-(C1)-(XTEN)_y-(C2)-(XTEN)_z$

[0026] IV

[0027] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;B是FVIII的B结构域,其可为所述B结构域的片段或剪接变体;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;v是0或1;w是0或1;x是0或1;y是0或1;y是0或1,前提是u+v+x+y+z≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。

[0028] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式V的重组因子VIII融合蛋白:

[0029] $(XTEN)_t-(S)_a-(A1)-(S)_b-(XTEN)_a-(S)_b-(A2)-(S)_c-(XTEN)_v-(S)_c-(B)-(S)_d-(XTEN)_w-(S)_d-(A3)-(S)_e-(XTEN)_x-(S)_e-(C1)-(S)_f-(XTEN)_y-(S)_f-(C2)-(S)_g-(XTEN)_2$ V

[0030] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;B是FVIII的B结构域,其可为所述B结构域的片段或剪接变体;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;g是0或1;t是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是t+u+v+w+x+y+z≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0031] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VI的重组因子VIII融合蛋白:

[0032] $(XTEN)_u-(S)_a-(A1)-(S)_b-(XTEN)_y-(S)_b-(A2)-(S)_c-(XTEN)_w-(S)_c-(A3)-(S)_d-(XTEN)_x(S)_d-(C1)-(S)_c-(XTEN)_y-(S)_c-(C2)-(S)_f-(XTEN)_z$ VI

[0033] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是u+v+w+x+y+z≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或

至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0034] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VII的重组因子VIII融合蛋白:

[0035] $(SP)-(XTEN)_x-(CS)_x-(S)_x-(FVIII_1-745)-(S)_y-(XTEN)_y-(S)_y-FVIII_1640-2332)-(S)_z-(CS)_z-(XTEN)_z$ VII

[0036] 其中就各次出现独立而言,SP是信号肽,优选具有序列MQIELSTCFFLCLLRFCFS(SEQ ID NO:1611),CS是表12中所列的裂解序列,S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的氨基酸的间隔子序列,“FVIII 1-745”是因子FVIII的残基1-745且“FVIII_1640-2332”是FVIII的残基1640-2332,x是0或1,y是0或1,且z是0或1,其中x+y+z>2;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。在式VII的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0037] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VIII重组因子VIII融合蛋白:

[0038] $(A1)-(S)_a-(XTEN)_v-(S)_a-(A2)-(B1)-(S)_b-(XTEN)_w-(S)_b-(B2)-(A3)-(S)_c-(XTEN)_x-(S)_e-(C1)-(S)_d-(XTEN)_y-(S)_d-(C2)-(S)_e-(XTEN)_z$ VIII

[0039] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;B1是B结构域的可具有FVIII的残基741至743-750或者FVIII的约残基741至约残基745的片段;B2是B结构域的可具有FVIII的残基1635-1686至1689或者FVIII的约残基1640至约残基1689的片段;A3是FVIII的A3结构域;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是$u+v+w+x+y+z\geq 1$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。在式VIII的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0040] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式IX的重组因子VIII融合蛋白:

[0041] $(A1_N)-(S)_a-(XTEN)_t-(S)_b-(A1_C)-(A2_N)-(S)_c-(XTEN)_u-(S)_d-(A2_C)-(B_N)-(S)_e-(XTEN)_v-(S)_t-(B_C)-(A3_N)-(S)_g-(XTEN)_w-(S)_h-(A3_C)-(C1_N-(S)_i-(XTEN)_x-(S)_j-(C1_C)-(C2_N)-(S)_k-(XTEN)_y-(S)_l-(C2_C)-(S)_m-(XTEN)_x$

[0042] IX

[0043] 其中就各次出现独立而言,$A1_N$是A1结构域的自至少残基编号1(相对于天然成熟FVIII加以编号)至至多残基编号371的片段,$A1_c$是A1结构域的自至少残基编号2至至多残基编号372的片段,前提是所述$A1_N$片段的序列在所述$A1_c$片段中不重复;$A2_N$是A2结构域的自

至少残基编号373至至多残基编号739的片段,$A2_c$是A2结构域的自至少残基编号374至至多残基编号740的片段,前提是所述$A2_N$片段的序列在所述$A2_c$片段中不重复;B_N是B结构域的自至少残基编号741至至多残基编号1647的片段,B_c是B结构域的自至少残基编号742至至多残基编号1648的片段,前提是所述B_N片段的序列在所述B_c片段中不重复;$A3_N$是A3结构域的自至少残基编号1649至至多残基编号2019的片段,$A3_c$是A3结构域的自至少残基编号1650至至多残基编号2019的片段,前提是所述$A3_N$片段的序列在所述$A3_c$片段中不重复;$C1_N$是C1结构域的自至少残基编号2020至至多残基编号2171的片段,$C1_c$是C1结构域的自至少残基编号2021至至多残基编号2172的片段,前提是所述$C1_N$片段的序列在所述$C1_c$片段中不重复;$C2_N$是C2结构域的自至少残基编号2173至至多残基编号2331的片段,$C2_c$是C2结构域的自至少残基编号2174至至多残基编号2332片段,前提是所述$C2_N$片段的序列在所述$C2_c$片段中不重复;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;g是0或1;h是0或1;i是0或1;j是0或1;k是0或1;l是0或1;m是0或1;t是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是$t+u+v+w+x+y+z \geq 1$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于相较于一个或多个选自表4的具有类似长度的XTEN,具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性的序列。在式IX的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。在式IX的另一实施方案中,Z是1。在式IX的融合蛋白的另一实施方案中,V是1且关于如图3中阐述的全长人因子VIII序列,XTEN连接于约氨基酸残基编号741至约750的C末端和氨基酸残基编号1635至约1648的N末端。在式IX的融合蛋白的另一实施方案中,t、u、v、w、x、y和z的总和等于2、3、4、5或6。在式IX的另一实施方案中,t、u、v、w、x、y和z的总和等于2,且v是1且z是1。在式IX的融合蛋白的另一实施方案中,t、u、v、w、x、y和z的总和等于3,v和z各自等于1,且t、u、w、x或y的任一者是1。在式IX的另一实施方案中,t、u、v、w、x、y和z的总和等于4,v和w和z各自等于1,且t、u、x或y的两者是1。在式的IX融合蛋白的另一实施方案中,XTEN的累积长度在约84个至约3000个氨基酸残基之间。在式IX的另一实施方案中,至少一个XTEN是紧靠对应于成熟天然人因子VIII中选自由以下组成的组的氨基酸的氨基酸的下游插入:氨基酸残基编号32、220、224、336、339、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910。在式IX的融合蛋白的另一实施方案中,各XTEN在选自表5、表6、表7、表8和表9的位点处连接于所述融合蛋白。在式IX的融合蛋白的另一实施方案中,当最优比对时,各XTEN相较于选自由表4、表13、表14、表15、表16和表17中的序列组成的组的具有类似长度的XTEN具有至少约80%、或约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%、或约100%序列同一性。

[0044] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式X的第一重组因子VIII多肽:

[0045] (A1)-a1-(A2)-a2-[B] X

[0046] 和一种包含式XI的第二多肽:

[0047] a3-(A3)-(C1)-(C2) XI

[0048] 其中所述第一多肽和所述第二多肽融合或以异二聚体形式存在;其中A1是因子VIII的A1结构域;A2是因子VIII的A2结构域;[B]是因子VIII的B结构域、其片段或被缺失;A3是因子VIII的A3结构域;C1是因子VIII的C1结构域;C2是因子VIII的C2结构域;a1、a2和a3是酸性间隔子区域;其中所述A1结构域包含XTEN容许环-1(A1-1)区域和XTEN容许环-2(A1-2)区域;其中所述A2结构域包含XTEN容许环-1(A2-1)区域和XTEN容许环-2(A2-2)区域;其中所述A3结构域包含XTEN容许环-1(A3-1)区域和XTEN容许环-2(A3-2)区域;其中XTEN序列插入区域A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2的至少一者中;且其中所述重组因子VIII蛋白展现促凝血活性。在异二聚体的一个实施方案中,第一多肽和第二多肽形成包含式(A1)-a1-(A2)-a2-[B]-[a3]-(A3)-(C1)-(C2)的单一多肽链。在一个前述实施方案中,"融合"是指肽键。

[0049] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式X的第一重组因子VIII多肽:

[0050] (A1)-a1-(A2)-a2-[B] X

[0051] 和一种包含式XI的第二多肽:

[0052] a3-(A3)-(C1)-(C2) XI

[0053] 其中所述第一多肽和所述第二多肽融合或以异二聚体形式存在;其中A1是因子VIII的A1结构域;A2是因子VIII的A2结构域;[B]是因子VIII的B结构域、其片段或被缺失;A3是因子VIII的A3结构域;C1是因子VIII的C1结构域;C2是因子VIII的C2结构域;a1、a2和a3是酸性间隔子区域;其中XTEN序列插入a3中;且其中所述重组因子VIII蛋白展现促凝血活性。在异二聚体的一个实施方案中,第一多肽和第二多肽形成包含式(A1)-a1-(A2)-a2-[B]-[a3]-(A3)-(C1)-(C2)的单一多肽链。在一个前述实施方案中,"融合"是指肽键。

[0054] 在前述式X和XI多肽的实施方案中,XTEN容许环包含在表面暴露的可挠性环结构内,且其中根据以DSSP数据库的登录号2R7E储存的成熟因子VIII的二级结构,A1-1位于β链1与β链2之间,A1-2位于β链11与β链12之间,A2-1位于β链22与β链23之间,A2-2位于β链32与β链33之间,A3-1位于β链38与β链39之间且A3-2位于β链45与β链46之间。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A1-1的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸15至约氨基酸45的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A1-1对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸18至约氨基酸41的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A1-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸201至约氨基酸232的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A1-2对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸218至约氨基酸229的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A2-1的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸395至约氨基酸421的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A2-1对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸397至约氨基酸418的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A2-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸577至约氨基酸635的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A2-2对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸595至约氨基酸607的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A3-1的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸1705至约氨基酸1732的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A3-1对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸

1711至约氨基酸1725的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,包含A3-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然人成熟人因子VIII中自约氨基酸1884至约氨基酸1917的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A3-2对应于天然成熟人因子VIII中自约氨基酸1899至约氨基酸1911的区域。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,XTEN序列插入区域A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2的至少两者中。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,XTEN序列是紧靠对应于成熟天然人因子VIII中选自由以下组成的组的氨基酸的氨基酸的下游插入:氨基酸残基编号32、220、224、336、339、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,另一XTEN序列插入a3酸性间隔子区域中。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,另一XTEN序列插入紧靠对应于氨基酸1656的氨基酸的下游的a3酸性间隔子中。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,A1结构域包含XTEN容许环-1(A1-1)区域和XTEN容许环-2(A1-2)区域,其中A2结构域包含XTEN容许环-1(A2-1)区域和XTEN容许环-2(A2-2)区域,且其中A3结构域包含XTEN容许环-1(A3-1)区域和XTEN容许环-2(A3-2)区域,且其中另一XTEN序列插入区域A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2的至少一者中。在前述式X和XI多肽的其它实施方案中,另一XTEN序列是紧靠对应于成熟天然人因子VIII中选自由以下组成的组的氨基酸的氨基酸的下游插入:氨基酸残基编号32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910。在式X和XI多肽的前述实施方案中,融合蛋白展现未连接于XTEN的相应因子VIII的促凝血活性的至少约30%、40%、50%、60%、70%或80%或90%,其中所述促凝血活性是通过体外凝血测定加以测定。

[0055] 在所有实施方案中,当在细胞培养基中表达且通过体外凝血测定加以测定时,多肽可例如展现体外促凝血活性超过0.5IU/ml或1.0或1.5或2.0IU/ml。促凝血活性可通过显色测定、单级凝结测定(例如aPTT)或两者测量。

[0056] 在一些实施方案中,其中重组因子VIII融合蛋白包含因子VIII以及至少第一和第二XTEN,所述至少第一XTEN与所述至少第二XTEN相隔至少10个氨基酸、至少50个氨基酸、至少100个氨基酸、至少200个氨基酸、至少300个氨基酸或至少400个氨基酸。

[0057] 在优选实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含因子VIII以及至少第一XTEN和任选至少第二、或任选至少第三、或任选至少第四XTEN,所述融合蛋白相较于未连接于XTEN的相应因子VIII展现与抗因子VIII抗体的结合降低。可体内或通过体外测定评估降低的结合。在一个实施方案中,体外测定是ELISA测定,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,抗FVIII抗体与融合蛋白的结合降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或至少约40%或更多。在另一实施方案中,体外测定是毕提斯达测定,其中融合蛋白的结合降低是由相较于未连接于XTEN的因子VIII的毕提斯达效价,融合蛋白的毕提斯达效价降低至少约2、4、6、8、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、100或200个毕提斯达单位所证明。在体外测定中,抗因子VIII抗体选自表10的抗体和来自具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者的多克隆抗体。在展现与因子VIII抑制剂抗体的结合降低的包含因子VIII以及至少第一和第二XTEN的重组因子VIII融合蛋白的特定实施方案中,所述第一XTEN在所述因子VIII多肽的C2结构域内连接于所述因子VIII多肽,且所述第二XTEN在所述因子VIII多肽的A1或A2结构域内连接于所述因子VIII多肽,其中相较于未连接于XTEN的相应因子VIII,所述融合蛋白展现与因子VIII抑制剂抗体的结合降低,其中所述因子VIII抑制剂抗体能够结合位于所述A1、A2或C2结构域内的表位,且此外,其中所述融合蛋白展现促凝血活性。在前述融合蛋白的一个实施

方案中,第二XTEN在因子VIII多肽的A2结构域内连接于所述因子VIII多肽且因子VIII抑制剂抗体结合因子VIII多肽的A2结构域。在前述融合蛋白的另一实施方案中,第二XTEN在因子VIII多肽的C2结构域内连接于所述因子VIII多肽且因子VIII抑制剂抗体结合因子VIII多肽的C2结构域。相较于未连接于XTEN的相应因子VIII,当通过ELISA测定加以测定时,抗因子VIII抗体与融合蛋白的结合降低至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%或40%,其中所述抗因子VIII抗体选自由表10中的抗体和来自具有因子VIII抑制剂的甲型血友病受试者的多克隆抗体组成的组。前述融合蛋白可进一步包含至少三个XTEN,其中至少第三XTEN在选自以下的位点处连接于因子VIII:在B结构域内或置换B结构域、在C末端处、以及在选自表7或表9的插入位点的1、2、3、4、5或6个氨基酸处或内。在与抗因子VIII抗体的结合降低的实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应因子VIII,当通过体外凝血测定(例如显色或单级凝结测定)加以测定时,融合蛋白在抗FVIII抗体存在下的促凝血活性大至少10%、20%、30%、40%、50%、80%、100%、200%、300%、400%或500%或更多。

[0058] 在所有实施方案中,融合蛋白的XTEN的特征可例如在于XTEN包含至少36、或至少42、或至少72、或至少96、或至少144、或至少288、或至少400、或至少500、或至少576、或至少600、或至少700、或至少800、或至少864、或至少900、或至少1000、或至少2000至约3000个氨基酸残基或甚至更多残基;甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)残基的总和占XTEN的总氨基酸残基的至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%;XTEN大致上是非重复的以致(i)XTEN不含有三个相同连续氨基酸,除非氨基酸是丝氨酸;(ii)至少约80%的XTEN序列由非重叠序列基序组成,所述序列基序各自包含约9至约14、或约12个由四至六个选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成的氨基酸残基,其中在各非重叠序列基序中,任何两个连续氨基酸残基都不出现超过两次;或(iii)XTEN序列的子序列计分小于10;XTEN具有大于90%、或大于95%、或大于99%无规卷曲形成率(如通过GOR算法所确定);XTEN具有小于2%α螺旋和2%β折叠(如通过Chou-Fasman算法所确定);当通过TEPITOPE算法分析时,XTEN缺乏预测的T细胞表位,其中关于通过所述算法进行所述预测的TEPITOPE阈值计分的阈值是-9,且其中所述融合蛋白展现终末半衰期长于至少约12小时、或至少约24小时、或至少约48小时、或至少约72小时、或至少约96小时、或至少约120小时、或至少约144小时、或至少约21天或更长。在一个实施方案中,重组因子VIII融合蛋白包含可与另一XTEN相同或不同的至少第二、或至少第三、或至少第四XTEN。根据一种不同方法,当最优比对时,CFXTEN融合蛋白的至少一个、至少第二、或至少第三、或至少第四XTEN相较于一个或多个选自表4、表13、表14、表15、表16和表17的具有类似长度的XTEN各自具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性。在另一不同方法中,CFXTEN融合蛋白的至少一个、至少第二、或至少第三、或至少第四XTEN相较于选自以下的序列各自具有至少90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%至约100%序列同一性:AE42_1、AE42_2、AE42_3、AG42_1、AG42_2、AG42_3、AG42_4、AE144_1A、AE144_2A、AE144_2B、AE144_3A、AE144_3B、AE144_4A、AE144_4B、AE144_5A、AE144_6B、AG144_1、AG144_2、AG144_A、AG144_B、AG144_C、AG144_F、AG144_3、AG144_4、AE288_1、AE288_2、AG288_1和AG288_2。

[0059] 在一个实施方案中,CFXTEN重组因子VIII融合蛋白的因子VIII组分包含一个、两个或三个选自相对于成熟人因子VIII编号的残基R1648、Y1680和R1689的氨基酸取代,其中所述取代选自丙氨酸、甘氨酸和苯丙氨酸。所述取代的非限制性实例包括R1648A、Y1680F和R1689A。

[0060] 在另一实施方案中,当通过尺寸排阻色谱或类似方法测量时,CFXTEN融合蛋白展现表观分子量因子至少约1.3、或至少约2、或至少约3、或至少约4、或至少约5、或至少约6、或至少约7、或至少约8、或至少约9、或至少约10。

[0061] 在CFXTEN融合蛋白的一些实施方案中,一个或多个XTEN将通过一个或两个各自可由选自由因子XIa、因子XIIa、激肽释放酶(kallikrein)、因子VIIa、因子IXa、因子Xa、因子IIa(凝血酶)、弹性蛋白酶-2(Elastase-2)、MMP-12、MMP13、MMP-17和MMP-20组成的组的哺乳动物蛋白酶裂解的裂解序列连接于FVIII,其中由所述哺乳动物蛋白酶在所述裂解序列处进行的裂解使因子VIII序列自XTEN序列释放,且其中释放的因子VIII序列相较于未裂解融合蛋白展现促凝血活性增加。在一个实施方案中,裂解序列可由因子XIa裂解。

[0062] 根据一种不同方法,CFXTEN融合蛋白包含至少三个位于因子VIII多肽的不同位置处的XTEN,其中所述不同位置选自:在来自选自表5、表6、表7、表8和表9的位点的1至6个氨基酸处或内的插入位置;在成熟因子VIII的氨基酸残基32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910的1至6个氨基酸处或内的位置;在因子VIII序列中任何两个邻近结构域之间的位置,其中所述两个邻近结构域选自由A1和A2、A2和B、B和A3、A3和C1、以及C1和C2组成的组;关于如图3中阐述的全长人因子VIII序列,在自在约氨基酸残基编号741至约750处的第一位置开始且在于氨基酸残基编号1635至约1648处的第二位置处结束的内部B结构域缺失内的位置;和因子VIII序列的C末端,其中多个XTEN的累积长度是至少约100至约3000个氨基酸残基且其中融合蛋白相较于未连接于XTEN的相应因子VIII保留至少约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%的促凝血活性,其中促凝血活性是通过体外凝血测定加以测定。在一个前述实施方案中,当向受试者施用时,融合蛋白相较于缺乏所述XTEN的相应因子VIII多肽展现终末半衰期延长,其中当向受试者施用时,所述融合蛋白展现终末半衰期至少约3小时、或4小时、或6小时、或12小时、或13小时、或14小时、或16小时、或24小时、或48小时、或72小时、或96小时、或120小时、或144小时、或7天、或14天、或21天。在一个实施方案中,受试者选自由人和因子VIII/血管性血友病因子双重敲除小鼠组成的组。在一个前述实施方案中,融合蛋白不包含选自GTPGSGTASSSP(SEQ ID NO:31)、GSSTPSGATGSP(SEQ ID NO:32)、GSSPSASTGTGP(SEQ ID NO:33)、GASPGTSSTGSP(SEQ ID NO:34)和

[0063] GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO:59)的序列。在另一前述实施方案中,融合蛋白不含有由

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG

[0064] SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT

SGSETPGTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO: 59)、

[0065] PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS

(SEQ ID NO:71)或

[0066] PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS(SEQ ID NO:80)组成的XTEN序列。

[0067] 在另一方面,本发明涉及相较于未连接于XTEN的FVIII具有增强的药代动力学性质,包括提高的参数的CFXTEN融合蛋白,其中所述增强的性质包括但不限于相较于未连接于XTEN的FVIII,终末半衰期变长、曲线下面积变大、血液浓度保持在治疗窗内的时间增加、导致血液浓度在治疗窗内的连续剂量之间的时间增加、以及以IU计的可施用的剂量随时间降低,但仍然导致血液浓度高于为促凝血作用所需的阈值浓度。在一些实施方案中,当向受试者施用时,CFXTEN融合蛋白相较于缺乏所述XTEN的相应因子VIII多肽展现终末半衰期延长。受试者可为人或小鼠,如因子VIII/血管性血友病因子双重敲除小鼠。在一个前述实施方案中,当向受试者施用时,相较于未连接于XTEN的相应因子VIII,CFXTEN展现终末半衰期长至少约2倍、或约3倍、或约4倍、或约5倍、或约10倍、或约20倍。在一个实施方案中,当向受试者施用时,CFXTEN融合蛋白展现终末半衰期至少约3小时、或4小时、或6小时、或12小时、或13小时、或14小时、或16小时、或24小时、或48小时、或72小时、或96小时、或120小时、或144小时、或7天、或14天、或21天。在其它实施方案中,实施方案的融合蛋白的增强的药代动力学性质是相较于未连接于XTEN且以类似剂量向受试者施用的相应FVIII,维持有需要的受试者中的促凝血融合蛋白的循环血液浓度高于0.01IU/ml、或0.05IU/ml、或0.1IU/ml、或0.2IU/ml、或0.3IU/ml、或0.4IU/ml或0.5IU/ml的阈值浓度持续的时期长至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约20倍、或至少约40倍、或至少约60倍的性质。半衰期和高于阈值浓度花费的时间的增加允许相较于未连接于XTEN的相应FVIII,降低给药频率以及降低向受试者施用的融合蛋白(以摩尔当量计)的量。在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN且使用类似剂量方案向受试者施用的相应FVIII,使用治疗有效剂量方案向受试者施用主题融合蛋白导致融合蛋白的血液水平的至少两个连续Cmax峰值和/或Cmin谷底值之间的时间增加至少2倍、或至少3倍、或至少4倍、或至少5倍、或至少6倍、或至少8倍、或至少10倍、或至少约20倍、或至少约40倍、或至少约60倍或更高。

[0068] 在优选实施方案中,CFXTEN融合蛋白相较于未连接于XTEN的相应因子VIII保留至少约30%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%的促凝血活性,其中促凝血活性是通过体外凝血测定,如但不限于显色测定或单级或两级凝结测定加以测定。

[0069] 根据一种不同方法,本发明提供包含因子VIII多肽和至少一个延伸重组多肽(XTEN)的重组因子VIII融合蛋白,其中所述因子VIII多肽包含A1结构域、A2结构域、A3结构域、C1结构域、C2结构域和任选B结构域的全部或一部分,且其中所述至少一个XTEN在选自残基编号18-32、或40、或211-224、或336-403、或599、或745-1640、或1656-1728、或1796-1804、或1900-1912、或2171-2332的插入位点处连接于所述因子VIII多肽;且其中所述融合蛋白相较于未连接于XTEN的相应因子VIII保留至少约30%、或约40%、或约50%、或约

60％、或约70％、或约80％、或约90％的促凝血活性。在一个前述实施方案中,融合蛋白包含至少第二XTEN、或至少第三、或至少第四XTEN,其中所述XTEN在于选自表5、表6、表7、表8和表9的位点的1至6个氨基酸处或内的位点处连接于因子VIII。在另一实施方案中,本发明提供一种重组因子VIII融合蛋白,其进一步包含在选自表5、表6、表7、表8、表9的插入位点处、在于来自图8的一个或多个插入位置处的插入位置的N末端或C末端侧的6个氨基酸处或内、以及在一个或多个来自图9的插入范围内连接于所述FVIII多肽的至少第二XTEN、或至少第三、或至少第四XTEN,其中至少两个XTEN由具有至少100至约400个氨基酸的氨基酸序列分隔。

[0070] 本发明提供CFXTEN,其中XTEN的XTEN半径比率是至少2.3或至少2.5,且由具有至少约20个氨基酸残基、或至少约50、或至少约100、或至少约200、或至少约300、或至少约400个氨基酸残基的氨基酸序列分隔。在其它实施方案中,CFXTEN包含至少四个XTEN,其中所述XTEN的XTEN半径比率是至少2.3、或至少2.5、或至少2.8,且其中四个XTEN中连接于融合蛋白的至少三者由具有至少约20个氨基酸残基、或至少约50、或至少约100、或至少约200、或至少约300、或至少约400个氨基酸残基的氨基酸序列分隔,且第四XTEN连接在B结构域(或其片段)内或在C结构域(或其末端)内。

[0071] 在一些实施方案中,主题组合物被构造来相较于未连接于XTEN的相应FVIII,对受试者中的清除受体具有降低的结合亲和力。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现对FVIII的清除受体的结合亲和力在未连接于XTEN的相应FVIII的结合亲和力的约0.01％-30％、或约0.1％至约20％、或约1％至约15％、或约2％至约10％的范围内。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,对清除受体的亲和力降低的融合蛋白的主动清除降低且半衰期相应增加长至少约2倍、或3倍、或至少4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约7倍、或至少约8倍、或至少约9倍、或至少约10倍、或至少约12倍、或至少约15倍、或至少约17倍、或至少约20倍。

[0072] 在一实施方案中,本发明提供一种包含FVIII和一个或多个XTEN的重组因子VIII融合蛋白,其中所述融合蛋白相较于未连接于XTEN的FVIII展现在生理条件下的溶解度增加至少3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约7倍、或至少约8倍、或至少约9倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或至少20倍、或至少40倍、或至少60倍。

[0073] 在另一方面,本发明提供一种药物组合物,其包含本文所述的任何实施方案的融合蛋白和药学上可接受的载体。

[0074] 在另一实施方案中,本发明提供一种治疗受试者的凝血病变的方法,其包括向所述受试者施用包含凝结有效量的药物组合物的组合物。在所述方法的一个实施方案中,在所述施用之后,促凝血因子VIII的血液浓度维持在约0.05、或1、或1.5IU/ml或更高持续至少所述施用之后48小时。在另一实施方案中,本发明提供一种使受试者的血液凝结的方法,其包括使凝结有效量的药物组合物与血液接触。

[0075] 在另一实施方案中,本发明提供一种治疗具有因子VIII的循环抑制剂的受试者的凝血病变的方法,其包括向所述受试者施用包含治疗有效量的CFXTEN的药物组合物的组合物,其中所述组合物相较于包含未连接于XTEN且使用类似量施用的相应因子VIII的组合物展现在所述受试者中的促凝血活性更大。在所述方法的一个实施方案中,凝血病变是甲型血友病。在另一实施方案中,凝血病变是创伤或手术或感染的结果。

[0076] 本发明提供一种治疗受试者的出血事件的方法,其包括向所述受试者施用包含凝结有效量的CFXTEN药物组合物的组合物,其中所述凝结有效量的融合蛋白相较于未连接于XTEN且使用类似量向所述受试者施用的相应因子VIII遏止出血事件持续的时期长至少3倍、或至少4倍、或至少5倍。未连接于XTEN的相应因子VIII的非限制性实例包括天然FVIII、表1的序列、BDD-FVIII和pCB0114FVIII。

[0077] 在另一实施方案中,本发明提供一种用于治疗甲型血友病患者的医药方案的CFXTEN重组因子VIII融合蛋白,所述方案包括包含CFXTEN融合蛋白的药物组合物。在所述医药方案的一个实施方案中,方案进一步包括确定为在甲型血友病患者中实现止血所需的包含CFXTEN的药物组合物的量的步骤。在另一实施方案中,用于治疗甲型血友病受试者的医药方案包括以有效量连续两剂或更多剂向受试者施用药物组合物,其中相较于未连接于XTEN且使用类似剂量施用的因子VIII,所述施用导致至少一个、两个或三个与甲型血友病相关的参数较大改善至少10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%、或90%。改善的参数的非限制性实例包括促凝血FVIII的血液浓度、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定时间减少、单级或两级凝结测定时间减少、出血事件的发作延迟、显色测定时间减少、出血测定时间减少、出血事件解决、或相对于天然FVIII的毕提斯达效价降低。

[0078] 在另一方面,本发明提供编码CFXTEN融合蛋白的任一实施方案的融合蛋白的分离的核酸序列。在一个实施方案中,分离的核酸是编码实施方案的CFXTEN融合蛋白的序列的互补序列。在一个实施方案中,分离的核酸进一步包含编码信号肽的序列,其中所述序列是

[0079] ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT(SE Q ID NO:1613)或其互补序列。在另一实施方案中,本发明提供一种包含编码融合蛋白的核酸或其互补序列的表达载体。在另一实施方案中,本发明提供一种包含前述表达载体的分离的宿主细胞。在另一实施方案中,本发明提供一种产生任何实施方案的融合蛋白的方法,其包括提供包含表达载体的宿主细胞;培养所述宿主细胞以实现所述融合蛋白的产生;以及回收所述融合蛋白。

[0080] 在一个实施方案中,本发明提供一种分离的融合蛋白,其包含当最优比对时,相较于选自表21的具有类似长度的序列具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性的多肽。

[0081] 在另一实施方案中,本发明提供一种分离的核酸,其包含选自以下的多核苷酸序列:(a)当最优比对时,相较于选自表21的具有类似长度的序列具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性的序列,或(b)(a)的多核苷酸的互补序列。在另一实施方案中,分离的核酸包含连接于(a)的核酸的5'末端的序列ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT(SE Q ID NO:1613)或所述序列的连接于(b)的3'末端的互补序列。

[0082] 明确涵盖的是重组因子VIII融合蛋白可展现本文公开的性质的一者或多者或任何组合。

[0083] 以引用的方式并入

[0084] 本说明书中提及的所有公布、专利和专利申请都以引用的方式并入本文,所述引

用的程度就如同已特定地和个别地指示将各个别公布、专利或专利申请以引用的方式并入一般。

附图说明

[0085] 本发明的特征和优势可通过参照以下详细描述和阐述说明性实施方案的附图加以进一步说明。

[0086] 图1显示在加工和凝结期间的FVIII构造和结构域的空间排列的图示,且意图表示天然FVIII与B结构域缺失的变体两者。A1结构域在残基1至372(编号是相对于成熟形式的FVIII序列NCBI蛋白质RefSeq NP_000123且涵盖a1残基)的范围内,A2结构域在残基373至740的范围内,B结构域在残基741至1648的范围内,A3结构域在残基1649至2019(涵盖a3酸性区域)的范围内,C1结构域在2020至2172的范围内,且C2结构域在残基2173至2332的范围内。BDD变体包括在范围741至1648之间的缺失,从而留下一些剩余残基或不留下剩余残基,其中非限制性BDD剩余序列是SFSQNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:1614)。图1A显示在加工之前单链FVIII的结构域构造。箭头指示在残基R372、R740、R1648和R1689处的在加工和FVIII转化成FVIIIa时被裂解的位点。图1B显示已通过在R1648残基处裂解加工成异二聚体的FVIII分子,其中A3结构域的a3酸性区域指示在A3的N末端上。图1C显示通过在R372、R740和R1689残基处裂解加工成FVIIIa异三聚体的FVIOO分子。

[0087] 图2是凝血级联的示意图,其显示通向共同路径的内源性和外源性臂。

[0088] 图3描绘成熟人因子VIII的氨基酸序列(SEQ ID NO:1592)。

[0089] 图4描绘缺失一部分B结构域的因子VIII序列(SEQ ID NO:1593)。

[0090] 图5说明FVIII连接于XTEN的CFXTEN构型的若干实例(XTEN显示为粗波形线)。在所有情况下,FVIII都可为FVIII的天然或BDD形式,或移除整个B结构域(包括天然裂解位点)的单链形式。图5A从左到右显示单链因子VIII的三种变化形式,即XTEN连接于N末端、C末端以及两个XTEN连接于N末端和C末端。图5B从左到右显示成熟异二聚体FVIII的六种变化形式,即XTEN连接于A1结构域的N末端;XTEN连接于C2结构域的C末端;XTEN连接于A1结构域的N末端和C2结构域的C末端;XTEN连接于A1结构域的N末端和A3结构域的N末端;XTEN连接于C2结构域的C末端和通过残余B结构域氨基酸连接于A3结构域的N末端;以及XTEN连接于A1结构域的N末端、通过残余B结构域氨基酸连接于A2结构域的C末端以及连接于C2结构域的C末端。图5C从左到右显示,单链因子VIII的三种变化形式:XTEN连接于A1结构域的N末端,XTEN连接在A1结构域的表面环内以及XTEN连接在A3结构域的表面环内;XTEN连接在A2结构域的表面环内,XTEN连接在C2结构域的表面环内以及XTEN连接于C2结构域的C末端;XTEN连接于A1结构域的N末端和在C1结构域的表面环内以及连接于C结构域的C末端。图5D从左到右显示成熟异二聚体FVIII的六种变化形式,即XTEN连接于A1结构域的N末端,XTEN连接在A1结构域的表面环内以及XTEN连接在A3结构域的表面环内;XTEN连接在A2结构域的表面环内,和XTEN连接在C1结构域的表面环内以及XTEN连接于C2结构域的C末端;XTEN连接于A1结构域的N末端,XTEN连接在A1结构域的表面环内,XTEN连接在A3结构域的表面环内以及XTEN连接于C2结构域的C末端;XTEN连接于A1结构域的N末端,XTEN通过B结构域的残余氨基酸连接于A3结构域的N末端以及XTEN连接在C2结构域的表面环内;XTEN连接在A2结构域的表面环内,XTEN通过B结构域的残余氨基酸连接于A3结构域的N末端,XTEN连接在C1结构域的表

面环内以及XTEN连接于C2结构域的C末端;以及XTEN连接在B结构域内或BDD变体的残余B结构域残基之间(且本发明也涵盖以下变化形式:其中XTEN置换连接A2和A3结构域的B结构域全部(包括所有天然裂解位点),从而产生单链形式的因子VIII)。这个图也包括其中一个或多个XTEN序列插入在B结构域内且所得融合物在细胞内加工期间在一个或多个位点处(例如,在R1648位点处)被裂解的所有变化形式。

[0091] 图6是XTEN插入在B结构域内以及连接于C2结构域的C末端的CFXTEN构建体的图形描绘,其说明XTEN的导致形成可覆盖因子VIII邻近于XTEN的部分的无规卷曲的非结构化特征。在下图中,图式描绘当XTEN呈无规卷曲时,它可采用产生会阻断因子VIII抑制剂抗体的结合的空间位阻的构象,所述抗体否则将对邻近于XTEN插入位点的表位具有亲和力。

[0092] 图7是对FVIII B结构域缺失序列进行的用以鉴定XTEN在FVIII序列内的插入位点的各种分析的图形描绘。A-H行的各者处于跨越FVIII BDD序列的Y轴值的任意标度上以使低值表示对XTEN插入物的预测耐受性较高的区域,其中残基编号在X轴上。A行显示结构域边界;这行中的所有中断都表示可能接受XTEN的边界。B行显示外显子边界;即所述行中的各阶跃都表示新外显子。C行显示由于在晶体中缺乏次序而在X射线结构中不可见的区域。标记的D行表示使用相应程序FoldIndex以及RONN计算的多个次序预测结果,所述FoldIndex见于万维网站点bip.weizmann.ac.il/fldbin/findex(2011年2月23日末次访问)上(参见Jaime Prilusky,Clifford E.Felder,Tzviya Zeev-Ben-Mordehai,Edwin Rydberg,Orna Man,Jacques S.Beckmann,Israel Silman和Joel L.Sussman,2005,Bioinformatics based on the Kyte&Doolitlle algorithm),所述RONN见于万维网站点strubi.ox.ac.uk/RONN(2011年2月23日末次访问)上(参见Yang,Z.R.,Thomson,R.,McMeil,P.和Esnouf,R.M.(2005)RONN:the bio-basis function neura; network technique applied to the detection of natively disordered regions inproteins Bioinformatics 21:3369-3376)。E和F行是基于可在GenBank中获得的来自11种哺乳动物的FVIII基因的多个序列比对加以计算。E行表示个别残基的保守性。F行表示FVIII的含3个氨基酸的区段的保守性。G和H行表示在11个哺乳动物FVIII基因的多个序列比对中观察到的间隙和插入。J行通过氨基酸编号列出基于组合以上多个测量结果所获得的XTEN插入点。

[0093] 图8描绘使用图8中描绘的信息且如实施例34的测定中所确认,在FVIII B结构域缺失序列(SEQ ID NO:1594)中鉴定为XTEN的活性插入点的位点。

[0094] 图9描绘使用图8和或实施例34中描绘的信息外加各插入点周围的被视为适于插入XTEN的一定跨度的氨基酸,在FVIII B结构域缺失序列(SEQ ID NO:1595)中被鉴定用于插入XTEN的位点的范围。

[0095] 图10是通过如对于图7所述鉴定插入点,随后使用分子生物学技术在各个插入点处插入单一XTEN(黑色棒条)来产生的CFXTEN文库的装配的示意图。表达并回收构建体,接着评估FVIII活性和药代动力学性质以鉴定导致性质增强的那些CFXTEN构型。

[0096] 图11是CFXTEN组分文库的装配的示意图,其中单一或连接于各种长度的XTEN(黑色棒条)的FVIII BDD结构域的区段以组合方式装配成编码CFXTEN的基因的文库,可接着评估所述文库的FVIII活性和药代动力学性质以鉴定导致性质增强的那些CFXTEN构型。

[0097] 图12说明具有XTEN(显示为粗波形线)的CFXTEN构型的若干实例,其中某些XTEN可通过插入可由促凝血蛋白酶裂解的裂解序列(由黑色三角指示)加以释放。图12A说明具有

两个末端可释放XTEN的scFVIII。图12B说明与图12A相同的构型,但具有连接A3和C1结构域的额外非可释放XTEN。图12C说明具有两个末端可释放XTEN的成熟异二聚体FVIII。图12D说明与10C相同的构型,但具有连接A3和C1结构域的额外非可释放XTEN。

[0098] 图13是装配、产生和评估XTEN中的代表性步骤的示意流程图。

[0099] 图14是装配编码融合蛋白的CFXTEN多核苷酸构建体中的代表性步骤的示意流程图。个别寡核苷酸501退火成序列基序502(如含12个氨基酸的基序(“12-mer”)),其被连接于来自文库的其它序列基序以产生涵盖所需长度的XTEN 504的集合,且连接于较小浓度的含有BbsI和KpnI限制位点的寡聚物503。将连接产物的所得集合进行凝胶纯化且切割具有所需长度的XTEN的条带,从而产生具有封堵序列(stopper sequence)505的分离的XTEN基因。将XTEN基因克隆至填充载体中。在这个情况下,载体编码任选CBD序列506和GFP基因508。接着用BbsI/HindIII进行消化以移除507和508且放置终止密码子。接着将所得产物克隆至BsaI/HindIII消化的含有编码FVIII的基因的载体中,从而产生编码FVIII-XTEN融合蛋白的基因500。

[0100] 图15是装配编码包含CF和XTEN的融合蛋白的基因、所述基因以融合蛋白形式表达和回收、以及所述融合蛋白作为候选CFXTEN产物加以评估中的代表性步骤的示意流程图。

[0101] 图16说明使用供体XTEN序列来产生截短XTEN。图16A提供AG864的序列(SEQ ID NO:1596),其中加下划线序列用于产生序列长度576(SEQ ID NO:1597)。图16B提供AG864的序列(SEQ ID NO:1598),其中加下划线序列用于产生序列长度288(SEQ ID NO:1599)。图16C提供AG864的序列(SEQ ID NO:1600),其中加下划线序列用于产生序列长度144(SEQ ID NO:1601)。图16D提供AE864的序列(SEQ ID NO:1602),其中加下划线序列用于产生序列长度576(SEQ ID NO:1603)。图16E提供AE864的序列(SEQ ID NO:1604),其中加下划线序列用于产生序列长度288(SEQ ID NO:1605)。图16F提供用于产生四个144长度的序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 1607-1610)的AE864的序列(SEQ ID NO:1606)(双下划线指示144序列中的首个氨基酸,其中单下划线表示那个序列的其余部分)。

[0102] 图17是以将XTEN元件引入FVIII编码序列中的不同策略设计因子VIII-XTEN表达载体的图示。图17A显示编码融合于编码FVIII的序列的3’末端的XTEN的表达载体。图17B描绘编码插入编码单一FVIII的编码序列的中部中的XTEN元件的表达载体。图17C描绘编码两个XTEN元件:一个插入FVIII编码序列的内部,且另一融合于FVIII编码序列的3’末端的表达载体。

[0103] 图18说明编码XTEN的基因的组合基因装配的过程。在这种情况下,基因自6个碱基片段装配且各片段可以4种不同密码子形式(A、B、C和D)获得。这允许在装配含12个氨基酸的基序时实现理论多样性4096。

[0104] 图19显示在皮下或静脉内施用的单剂的连接于不同长度的非结构化多肽的GFP不同组合物之后,在食蟹猕猴中的药代动力学分布图(血浆浓度),如实施例41中所述。组合物是GFP-L288、GFP-L576、GFP-XTEN_AF576、GFP-Y576和XTEN_AD836-GFP。在注射之后各种时间分析血液样本且使用用于捕获的针对GFP的多克隆抗体和相同多克隆抗体的用于检测的生物素化制剂,通过ELISA测量血浆中的GFP的浓度。结果呈现为在给药之后相对于时间(小时)的血浆浓度,且特别显示XTEN_AD836-GFP(即XTEN序列长度最长的组合物)的半衰期可观增加。序列长度最短的构建体GFP-L288具有最短半衰期。

[0105] 图20显示来自XTEN_AE864融合于GFP的N末端的融合蛋白的稳定性研究的样本的SDS-PAGE凝胶(参见实施例42)。在37℃下在食蟹猕猴血浆和大鼠肾溶解产物中孵育GFP-XTEN多达7天。此外,也评估向食蟹猕猴施用的GFP-XTEN。在0、1和7天取样且通过SDS PAGE分析,然后用针对GFP的抗体使用蛋白质印迹分析进行检测。

[0106] 图21显示对相对于分子量已知的蛋白质标准物测量的胰高血糖素-XTEN构建体样本的尺寸排阻色谱分析的结果,其中图输出为吸光度对滞留体积,如实施例40中所述。胰高血糖素-XTEN构建体是1)胰高血糖素-Y288;2)胰高血糖素Y-144;3)胰高血糖素-Y72;和4)胰高血糖素-Y36。结果指示表观分子量随XTEN部分的长度增加而增加(对于数据,参见实施例40)。

[0107] 图22显示由用如所指定的构建体转化的细胞的细胞培养物表达的蛋白质的蛋白质印迹的结果(实施例25)。泳道1-12中的样本分别是:MW标准物、FVIII(42.5ng)、pBC0100B、pBC0114A、pBC0100、pBC0114、pBC0135、pBC0136、pBC0137、pBC0145、pBC0149和pBC0146。泳道8、9和12显示与估计MW是95kDa的具有C末端XTEN288的FVIII一致的条带。泳道7和11显示与估计MW是175kDa的具有C末端XTEN42的FVIII一致的条带。泳道2-6显示与FVIII和重链一致的条带。泳道10和23显示与重链一致的条带。泳道7显示与重链和连接的XTEN42一致的条带。

[0108] 图23显示对自流体动力学注射质粒DNA的FVIII和血管性血友病因子双重敲除小鼠获得的样本的FVIII测定的结果,如实施例36中所详述。

[0109] 图24是如实施例30中所述向HemA或FVIII/VWF双重敲除小鼠施用的rBDD-FVIII和纯化CFXTEN融合蛋白pBC0145和pBC0146(具有C末端XTEN)的药代动力学性质的图形和表格描绘,其显示CFXTEN在两种小鼠品系中的半衰期均增强。

[0110] 图25是使用在HemA小鼠中进行的细胞培养物PK测定,向HemA(图25A)或FVIII/VWF双重敲除小鼠(图25B)施用的rBDD-FVIII和CFXTEN融合蛋白pSD0050和pSD0062(具有内部插入的XTEN)的药代动力学性质的图形和表格描绘。如实施例32中所述,显示剂量、5分钟回收率和半衰期(T1/2),从而强调在两种小鼠品系中,相较于阳性对照FVIII,CFXTEN的回收率和半衰期得以增强。

[0111] 图26是使用pBC0114BDD-FVIII和含有三个在残基18、745和2332处的144个氨基酸的XTEN插入的CFXTEN构建体LSD0049.002滴定GMA8021FVIII抑制剂的图形描绘。数据指示相较于FVIII阳性对照,为在50％程度上抑制CFXTEN所需的以μg/ml计的抗体量右移约0.7数量级。

[0112] 图27是算法SegScore的逻辑流程图的示意图。在图中,以下图例适用:i,j-用于穿过整个序列的控制回路中的计数器;HitCount-这个变量是记录子序列在嵌段中遇到相同子序列多少次的计数器;SubSeqX-这个变量保存被检查冗余度的子序列;SubSeqY-这个变量保存SubSeqX被检查所针对的子序列;BlockLen-这个变量保存使用者确定的嵌段长度;SegLen-这个变量保存区段长度。程序被硬编码来产生长度是3,4,5,6,7,8,9和10的子序列的计分;Block-这个变量保存一串长度BlockLen。所述串主要由来自输入XTEN序列的字母组成且由i计数器的位置所确定;SubSeqList-这是保存所有产生的子序列计分的清单。

[0113] 图28描绘对11个氨基酸的假设XTEN(SEQ ID NO:1591)应用算法SegScore以确定重复性。由N个氨基酸组成的XTEN序列被分成N-S+1个长度是S的子序列(在这个情况下S＝

3)。对所有子序列进行逐对比较且计算相同子序列的平均数目以产生子序列计分1.89。

[0114] 图29是在暴露于针对FVIII的GMA8021抗体之后,测定的CFXTEN中的FVIII活性与pBC114FVIII阳性对照的FVIII活性的个别构建体比率值的图,分组是根据构建融合蛋白中的XTEN的数目(参见实施例28)。结果显示CFXTEN保留FVIII活性的能力与并入的XTEN的数目增加基本上成线性关系。

[0115] 图30描绘成熟B结构域缺失的(BDD)人FVIII构建体的一级序列和结构域结构(实施例46)。显示引入的NheI和ClaI限制位点的位置。应注意氨基酸编号对应于成熟FVIII的一级序列中的氨基酸位置(图30)。个别结构域是通过灰色线/框加以限定,其中用灰色文本鉴定结构域。酸性区域(a1、a2、a3)用虚线框指示。实心楔/三角指示FVIII活化成FVIIIa时的凝血酶裂解位点。空心楔/三角指示细胞内蛋白水解加工成双链形式的FVIII的位点。六角形指示N连接的糖基化的位点。圆圈指示Tyr硫酸化的位点。引入cDNA中以有助于XTEN插入/重组的独特非天然限制位点(NheI,GCTAG;ClaI,ATCGAT)用灰色以双下划线加以突出。

[0116] 图31提供图30中所述的FVIII构建体的图解表示,其指示结构域组构以及天然和非天然限制位点的位置。

[0117] 图32显示结构数据集2R7E、3CDZ和PM0076106的图示ASAView输出结果。显示结构域A1、A2、A3、C1和C2中的氨基酸的可及溶剂面积(ASA)。对存放在由结构生物信息学研究合作协会(Research Collaboratory for Structural Bioinformatics)(RCSB;http://www.rcsb.org/pdb)维护的蛋白质数据库(Protein Data Bank)中的X射线结晶坐标3CDZ(Ngo等,Structure 16:597-606(2008))和2R7E(Shen等,Blood 111:1240-1247(2008))、以及对存放在由Consorzio Interuniversitario per le Applicazioni di Supercalcolo per Universitàe Riserca(CASPUR)和罗马大学生物化学科学系(Department of Biochemical Sciences of the University of Rome)维护的蛋白质模型数据库(Protein Model Database)(http://mi.caspur.it/PMDB/main.php)中的由分子动力学模拟研究获得的预测细化FVIII结构的原子坐标PM0076106(Venkateswarlu,BMC Struct.Biol.10:7(2010))进行分析。

[0118] 图33显示XTEN插入位点的位置的结构示意图。对应于FVIII的晶体结构(PDB:2R7E)的中心图式由结构域A1、A2、A3、C1和C2的详细视图围绕。β链和α螺旋显示为条带表示。环显示为α碳管。在XTEN插入位点处的氨基酸显示为CPK球形表示。各图中的编号指示根据图30中的编号的XTEN插入位点的位置。

[0119] 图34显示图33中所示的XTEN插入位点的位置的结构示意图,其中所得重组FVIII蛋白显示FVIII活性。

[0120] 图35显示图34中所示的XTEN插入位点的位置的结构示意图,其中所得重组FVIII蛋白显示FVIII活性。

[0121] 图36显示图35中所示的XTEN插入位点的位置的结构示意图,其中所得重组FVIII蛋白显示FVIII活性。

[0122] 图37显示FVIII的结构域A1、A2、A3、C1和C2的ClustalW多个序列比对,其显示导致重组FVIII蛋白显示FVIII活性(黑色框、白色文本)或不显示FVIII活性(灰色框、粗体文本)的XTEN插入位置。

[0123] 图38显示对以标识符2R7E存放在蛋白质数据库处的天然活性人FVIII晶体结构中

的两条多肽链的二级结构的DSSP图解表示(参见实施例47)。氨基酸序列编号与图30中的蛋白质序列相同。β折叠区域显示为实心箭头且指定为β1至β66。XTEN容许环的位置由交叉影线框表示。结构域A1XTEN容许环指定为环A1-1和环A1-2。结构域A2XTEN容许环指定为环A2-1和环A2-2。结构域A3XTEN容许环指定为环A3-1和环A3-2。

[0124] 图39显示对以标识符2R7E存放在蛋白质数据库处的天然活性人FVIII晶体结构中的两条多肽链的二级结构的DSSP图解表示(参见实施例47)。氨基酸序列编号与图30中的蛋白质序列相同。β折叠区域显示为实心箭头且指定为β1至β66。XTEN容许环的位置由交叉影线框表示。结构域A1XTEN容许环指定为环A1-1和环A1-2。结构域A2XTEN容许环指定为环A2-1和环A2-2。结构域A3XTEN容许环指定为环A3-1和环A3-2。

[0125] 图40显示FVIII的结构域A1、A2、A3、C1和C2的ClustalW多个序列比对,其显示导致重组FVIII蛋白显示FVIII活性(黑色框、白色文本)或不显示FVIII活性(灰色框、粗体文本)的XTEN插入位置。XTEN容许环的位置由虚线矩形指示(参见实施例47)。

[0126] 图41.图41A呈现人FVIII(PDB:2R7E)的前视结构示意图,其显示结构域A1、A2、A3、C1和C2的位置(用虚线加圆圈)和以CPK球形表示加以突出的XTEN容许环A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1和A3-2的位置。图41B呈现人FVIII(PDB:2R7E)的侧视结构示意图,其显示结构域A1、A2、A3、C1和C2的位置(用虚线加圆圈)和以CPK球形表示加以突出的XTEN容许环A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1和A3-2的位置。

[0127] 图42显示分离的人FVIII(PDB:2R7E)A结构域的顶视结构示意图,其显示以CPK球形表示加以突出的XTEN容许环的位置。图42B、42D和42F显示分离的人FVIII(PDB:2R7E)A结构域的侧视结构示意图,其显示以CPK球形表示加以突出的XTEN容许环的位置。

[0128] 图43显示各种因子VIII B结构域缺失和个别突变的序列。4-10行显示各种B结构域缺失,其中指示的XTEN连接侧接B结构域残余残基或A3结构域残基。R1648A突变由箭头在5和8行中指示,而Y1680F突变由箭头在8-10行中指示。

[0129] 图44是具有单一XTEN插入物的各种CFXTEN的显色和aPTT测定活性的条形图(实施例49)。

[0130] 图45是具有2个XTEN插入物的各种CFXTEN的显色和aPTT测定活性的条形图(实施例49)。

[0131] 图46是具有3个XTEN插入物的各种CFXTEN的显色和aPTT测定活性的条形图(实施例49)。

[0132] 图47是相较于BDD-FVIII对照,施用的各种具有单一XTEN插入物的CFXTEN在DKO小鼠中的血浆水平的图,其显示通过在各个位置处插入XTEN实现半衰期长10至20倍(实施例50)。

[0133] 图48是相较于BDD-FVIII对照,施用的各种具有一个、两个和三个XTEN插入物的CFXTEN在DKO小鼠中的血浆水平的图,其显示相较于单一或两个插入物,通过包括额外XTEN插入物实现半衰期增加(实施例51)。

[0134] 图49是在毕提斯达测定中用实施例52中所述的三种血友病患者血清(图49A-C)或绵羊抗FVII(图49D)测定的样本中的剩余因子VIII促凝血活性的绘制抑制曲线的图,其显示相较于未连接于XTEN的FVIII,两个CFXTEN分子的抑制曲线明显左移。

具体实施方式

[0135] 在描述本发明的实施方案之前,应了解所述实施方案是仅通过举例方式提供,且本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。众多变化、改变和替代在不脱离本发明的情况下现将被本领域技术人员所想到。

[0136] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。尽管在实施或测试本发明时可使用与本文所述的那些方法和材料类似或等效的方法和材料,但以下描述适合的方法和材料。在起冲突的情况下,以包括定义的专利说明书为准。此外,材料、方法和实例仅具有说明性而非意图具有限制性。众多变化、改变和替代在不脱离本发明的情况下现将被本领域技术人员所想到。

[0137] 定义

[0138] 在本申请的情形下,除非另外指定,否则以下术语具有归于它们的含义:

[0139] 除非上下文另外明确规定,否则如在说明书和权利要求中所用,单数形式“一个”和“所述”包括复数个提及物。举例来说,术语“一个细胞”包括复数个细胞,包括其混合物。

[0140] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换用于指代任何长度的氨基酸聚合物。聚合物可为线性或分支的,它可包含修饰的氨基酸,且它可被非氨基酸打断。所述术语也涵盖已例如通过形成二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化或任何其它操作(如与标记性组分缀合)加以修饰的氨基酸聚合物。

[0141] 如本文所用,术语“氨基酸”是指天然和/或非天然或合成氨基酸,包括但不限于D或L两种光学异构体、以及氨基酸类似物和肽模拟物。标准单字母代码或三字母代码用于指定氨基酸。

[0142] 术语“结构域”在关于因子VIII多肽使用时是指全长结构域或其功能性片段,例如因子VIII的A1结构域、A2结构域、A3结构域、B结构域、C1结构域和/或C2结构域的全长或功能性片段。

[0143] 术语“天然L-氨基酸”是指甘氨酸(G)、脯氨酸(P)、丙氨酸(A)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)、异亮氨酸(I)、甲硫氨酸(M)、半胱氨酸(C)、苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)、组氨酸(H)、赖氨酸(K)、精氨酸(R)、谷氨酰胺(Q)、天冬酰胺(N)、谷氨酸(E)、天冬氨酸(D)、丝氨酸(S)和苏氨酸(T)的L光学异构体形式。

[0144] 如应用于序列以及如本文所用的术语“非天然存在”是指不具有哺乳动物中所见的野生型或天然存在的序列的对应物、不互补于哺乳动物中所见的野生型或天然存在的序列、或不与哺乳动物中所见的野生型或天然存在的序列具有高度同源性的多肽或多核苷酸序列。举例来说,当适合地比对时,非天然存在的多肽或片段相较于天然序列可共有至多99%、98%、95%、90%、80%、70%、60%、50%或甚至更小氨基酸序列同一性。

[0145] 术语“亲水性”和“疏水性”是指物质与水具有的亲和程度。亲水性物质对水具有强烈亲和力,倾向于溶解于水中,与水混合,或由水湿润,而疏水性物质大致上对水缺乏亲和力,倾向于排斥而非吸收水且倾向于不溶解于水中或与水混合或由水湿润。氨基酸可基于它们的疏水性加以表征。已开发许多尺度。一个实例是由Levitt,M等,J Mol Biol(1976)104:59开发的尺度,其列于Hopp,TP等,ProcNatlAcad SciU SA(1981)78:3824中。“亲水性氨基酸”的实例是精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。特别感兴趣的是亲水性氨基酸天冬氨酸、谷氨酸以及丝氨酸和甘氨酸。“疏水性氨基酸”的实例是色氨酸、酪

氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

[0146] “片段”在应用于蛋白质时是天然生物活性蛋白质的保留至少一部分治疗和/或生物活性的截短形式。“变体”在应用于蛋白质时是与天然生物活性蛋白质具有序列同源性的保留生物活性蛋白质的至少一部分治疗和/或生物活性的蛋白质。举例来说,相较于参照生物活性蛋白质,变体蛋白质可共有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性。如本文所用,术语“生物活性蛋白质部分”包括如例如通过定点诱变、合成编码基因、插入而故意地修饰的蛋白质或通过突变而偶然地修饰的蛋白质。

[0147] 术语“序列变体”是指相较于它们的天然或原始序列,已通过插入、缺失或取代一个或多个氨基酸加以修饰的多肽。插入可位于蛋白质的任一末端或两个末端处,和/或可位于氨基酸序列的内部区域内。一个非限制性实例是在生物活性有效负载蛋白质的序列内插入XTEN序列。在缺失变体中,移除如本文所述的多肽中的一个或多个氨基酸残基。因此,缺失变体包括有效负载多肽序列的全部片段。在取代变体中,移除且用替代残基置换多肽的一个或多个氨基酸残基。在一方面,取代在性质上是保守性的且这个类型的保守性取代在本领域中是熟知的。

[0148] 如本文所用,“内部XTEN”是指已插入凝血因子的序列中的XTEN序列。内部XTEN可通过将XTEN序列插入如FVIII的凝血因子的序列中来构建,所述插入是通过在凝血因子的结构域内的两个邻近氨基酸之间(“结构域内”)或在两个结构域之间(“结构域间”)插入来实现或其中XTEN置换凝血因子的部分内部序列。

[0149] 如本文所用,“末端XTEN”是指已融合于凝血因子的N末端或C末端或融合在凝血因子的N末端或C末端中或融合于凝血因子的N末端或C末端的蛋白水解裂解序列或接头的XTEN序列。末端XTEN可融合于凝血因子的天然末端。或者,末端XTEN可置换凝血因子的一部分末端序列。

[0150] 术语“XTEN释放位点”是指CFXTEN融合蛋白中可由哺乳动物蛋白酶识别且裂解,从而实现XTEN或XTEN的一部分自CFXTEN融合蛋白释放的裂解序列。如本文所用,“哺乳动物蛋白酶”是指通常存在于哺乳动物的体液、细胞或组织中的蛋白酶。XTEN释放位点可被工程化来由各种哺乳动物蛋白酶(也称为“XTEN释放蛋白酶”)裂解,所述哺乳动物蛋白酶如FXIa、FXIIa、激肽释放酶、FVIIIa、FVIIIa、FXa、FIIa(凝血酶)、弹性蛋白酶-2、MMP-12、MMP13、MMP-17、MMP-20或在凝结事件期间存在的任何蛋白酶。可利用能够识别确定裂解位点的其它等效蛋白酶(内源性或外源性)。可针对所用蛋白酶调整和定制裂解位点。

[0151] 当提及第一多肽连接于第二多肽时,术语“在...内”涵盖分别使所述第一或第二多肽的N末端连接于所述第二或第一多肽的C末端的连接,以及将所述第一多肽插入所述第二多肽的序列中。举例来说,当XTEN“在因子VIII多肽的结构域内”连接时,所述XTEN可连接于N末端、C末端,或可插入所述结构域中。

[0152] 如本文所用,术语“位点”在用于指代XTEN插入在如因子VIII的生物多肽内或向如因子VIII的生物多肽插入的位点时表示连接所述XTEN所处的氨基酸位置。当描述编号位点,如XTEN插入在因子VIII内或向因子VIII插入的第一、第二、第三、第四、第五或第六位点时,各位点将理解为表示因子VIII中的不同位点;例如,所述第二位点是与所述第一位点不同的因子VIII位置,所述第三位点不同于所述第二和所述第一位点等。

[0153] 如应用于本文提供的CFXTEN多肽的一种或多种形式的“活性”或“促凝血活性”是

指无论通过体外、离体或体内测定所测量,都能够结合靶标凝血蛋白底物或辅因子且促进凝结事件的能力。所述测定包括但不限于单级凝结测定、两级凝结测定、显色测定和ELISA测定。“生物活性”是指体外或体内生物功能或作用,包括但不限于受体或配体结合、或FVIII凝血因子对在本领域中通常已知的凝血的作用、或细胞、生理或临床反应,包括遏止出血事件。

[0154] 如本文所用,术语“ELISA”是指如本文所述或如本领域中另外已知的酶联免疫吸附测定。

[0155] “宿主细胞”包括可为或已为主题载体的接受者的个别细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单一宿主细胞的子代。由于天然、偶然或故意突变,子代可不必与原始亲本细胞完全相同(在形态方面或在总DNA互补序列的基因组方面)。宿主细胞包括用本发明的载体体内转染的细胞。

[0156] “分离的”在用于描述本文公开的各种多肽时是指已被鉴定且与它的天然环境的组分分离和/或自所述天然环境的组分回收的多肽。它的天然环境的污染物组分是将通常干扰多肽的诊断或治疗用途的物质,且可包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。如为本领域技术人员显而易知,非天然存在的多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段不需要“分离”以将它与它的天然存在的对应物区分。此外,“浓缩的”、“分离的”或“稀释的”多核苷酸、肽、多肽、蛋白质、抗体或其片段可与它的天然存在的对应物区分,因为每体积分子的浓度或数目通常大于它的天然存在的对应物的浓度或数目。一般来说,通过重组手段制备且在宿主细胞中表达的多肽被视为“分离的”。

[0157] “分离的”多核苷酸或多肽编码核酸或其它多肽编码核酸是被鉴定且与在多肽编码核酸的天然来源中它通常与之缔合的至少一种污染物核酸分子分离的核酸分子。分离的多肽编码核酸分子不同于它在自然界中所见的形式或配置。因此,分离的多肽编码核酸分子不同于当它存在于天然细胞中时的特定多肽编码核酸分子。然而,分离的多肽编码核酸分子包括通常表达多肽的细胞中含有的多肽编码核酸分子,在所述细胞中,例如核酸分子在不同于天然细胞的位置的染色体或染色体外位置中。

[0158] “嵌合”蛋白含有至少一种在序列中不同于在自然界中存在的位置的位置中包含至少一个区域的融合多肽。所述区域可通常以单独蛋白质形式存在且在融合多肽中集合在一起;或它们可通常以相同蛋白质形式存在,但以新型排列置放在融合多肽中。可例如通过化学合成,或通过产生并翻译其中以所需关系编码肽区域的多核苷酸来产生嵌合蛋白。

[0159] “缀合的”、“连接的”、“融合的”和“融合”在本文中可互换使用。这些术语是指通过无论什么手段(包括化学缀合或重组手段)将两种或更多种化学元素、序列或组分接合在一起。举例来说,如果启动子或增强子影响序列的转录,那么使它可操作地连接于编码序列。通常,“可操作地连接”是指所连接的DNA序列是连续的,且在阅读相中或框内。“框内融合”是指以维持原始ORF的正确阅读框的方式接合两个或更多个开放阅读框(ORF)以形成连续较长ORF。因此,所得重组融合蛋白是含有两个或更多个对应于由原始ORF编码的多肽的区段的单一蛋白质(所述区段在自然界中通常不这样接合)。

[0160] 在多肽的情形下,“线性序列”或“序列”是多肽中呈氨基末端至羧基末端方向的一定顺序的氨基酸,其中在序列中彼此相邻的残基在多肽的一级结构中是连续的。“部分序列”是多肽的一部分的已知在一个或两个方向上包含其它残基的线性序列。

[0161] “异源”是指源于某一实体,所述实体就基因型而言不同于它与之比较的实体的其余部分。举例来说,自它的天然编码序列移除且可操作地连接于除天然序列以外的编码序列的甘氨酸富集序列是异源甘氨酸富集序列。如应用于多核苷酸、多肽的术语“异源”是指多核苷酸或多肽源于某一实体,所述实体就基因型而言不同于它与之比较的实体的其余部分的基因型。

[0162] 术语“多核苷酸”、“核酸”、“核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用。它们是指任何长度的核苷酸的聚合形式,所述核苷酸是脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可具有任何三维结构,且可执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段的编码或非编码区、由连锁分析确定的基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核糖酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、具有任何序列的分离的DNA、具有任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可包含修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,那么可在聚合物装配之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可由非核苷酸组分打断。可在聚合之后,如通过与标记组分缀合来进一步修饰多核苷酸。

[0163] 术语“多核苷酸的互补序列”表示相较于参照序列,具有互补碱基序列和逆向定向,以致它可以完全保真度与参照序列杂交的多核苷酸分子。

[0164] 如应用于多核苷酸的“重组”是指多核苷酸是体外克隆、限制和/或连接步骤、以及产生可潜在于宿主细胞中表达成重组蛋白的构建体的其它程序的各种组合的产物。

[0165] 术语“基因”和“基因片段”在本文中可互换使用。它们是指含有至少一个能够在转录和翻译之后,编码特定蛋白质的开放阅读框的多核苷酸。基因或基因片段可为基因组的或cDNA,只要多核苷酸含有至少一个可涵盖整个编码区或其区段的开放阅读框即可。“融合基因”是由至少两种连接在一起的异源多核苷酸组成的基因。

[0166] “同源性”或“同源”或“序列同一性”是指两个或更多个多核苷酸序列之间或两个或更多个多肽序列之间的序列相似性或可互换性。当使用如BestFit的程序来确定两个不同氨基酸序列之间的序列同一性、相似性或同源性时,可使用缺省设置,或可选择如blosum45或blosum80的适当计分矩阵来使一致性、相似性或同源性计分最优化。优选地,同源的多核苷酸是在如本文定义的严格条件下杂交且相较于那些序列具有至少70%、优选至少80%、更优选至少90%、更优选95%、更优选97%、更优选98%、以及甚至更优选99%序列同一性的那些多核苷酸。同源的多肽优选具有至少70%、优选至少80%、甚至更优选至少90%、甚至更优选至少95-99%、以及最优选100%相同的序列同一性。

[0167] “连接”是指在两个核酸片段或基因之间形成将它们连接在一起的磷酸二酯键的过程。为将DNA片段或基因连接在一起,DNA的末端必须可彼此相容。在一些情况下,在核酸内切酶消化之后,末端将直接可相容。然而,可能必要的是首先使通常在核酸内切酶消化之后产生的交错末端转化成钝末端以使得它们对于连接可相容。

[0168] 术语“严格的条件”或“严格的杂交条件”包括涉及多核苷酸将在比与其它序列更大的可检测程度上(例如,超过背景至少2倍)与它的靶标序列杂交所处的条件。通常,部分地关于进行洗涤步骤所处的温度和盐浓度来表述杂交的严格性。通常,严格条件将为以下条件:其中在pH 7.0至8.3下,盐浓度小于约1.5MNa离子,通常约0.01至1.0MNa离子浓度(或其它盐)且温度是至少约30℃(对于短多核苷酸(例如10至50个核苷酸)而言)和至少约60℃

(对于长多核苷酸(例如大于50个核苷酸)而言)-举例来说,“严格条件”可包括在37℃下在50%甲酰胺、1M NaCl、1%SDS中杂交,以及在60℃至65℃下在0.1×SSC/1%SDS中洗涤3次,各次15分钟。或者,可使用温度约65℃、60℃、55℃或42℃。SSC浓度可自约0.1至2×SSC变化,其中SDS是以约0.1%存在。所述洗涤温度通常选择为低于特定序列在确定离子强度和pH下的热熔点约5℃至20℃。Tm是50%靶标序列杂交于完全匹配探针所处的温度(在确定离子强度和pH下)。用于计算Tm的等式和用于核酸杂交的条件是熟知的且可见于Sambrook,J.等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001中。通常,阻断试剂用于阻断非特异性杂交。所述阻断试剂包括例如约100-200μg/ml的剪切和变性的鲑鱼精子DNA。有机溶剂(如在约35-50%v/v浓度下的甲酰胺)也可在特定情况(如RNA:DNA杂交)下使用。关于这些洗涤条件的适用变化将易于为本领域普通技术人员显而易知。

[0169] 如应用于多核苷酸序列的术语“同一性百分比”、“序列同一性百分比”和“同一性%”是指使用标准化算法比对的至少两个多核苷酸序列之间匹配的残基的百分比。所述算法可以标准化和可复现方式在所比较的序列中插入间隙以使两个序列之间的比对最优化,且因此实现两个序列的更有意义比较。同一性百分比可在整个确定多核苷酸序列的长度上加以测量,或可在较短长度,例如在取自较大确定多核苷酸序列的片段(例如具有至少45、至少60、至少90、至少120、至少150、至少210或至少450个连续残基的片段)的长度上加以测量。所述长度仅是示例性的,且应了解,由本文在表、图或序列表中所示的序列支撑的任何片段长度都可用于描述在其上测量同一性百分比的长度。序列同一性百分比是通过以下方式来计算:在比较窗上比较两个最优对准的序列,确定匹配位置(相同残基存在于两个多肽序列中所处的位置)的数目,用比较窗中的位置总数(即,窗口大小)除匹配位置的数目,以及用100乘以结果以产生序列同一性百分比。当将比较不同长度的序列时,最短序列限定比较窗的长度。当计算序列同一性时,不考虑保守性取代。

[0170] 关于本文鉴定的多肽序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列且必要时引入间隙以实现最大序列同一性百分比,且不将任何保守性取代考虑为序列同一性的一部分之后,查询序列中与第二参照多肽序列或其部分的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。出于确定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的各种方式实现,所述方式例如使用可公开获得的计算机软体,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定适于测量比对的参数,包括为在所比较序列的全长上实现最大对准所需的任何算法。同一性百分比可在整个确定多肽序列的长度上加以测量,或可在较短长度,例如在取自较大确定多肽序列的片段(例如具有至少15、至少20、至少30、至少40、至少50、至少70或至少150个连续残基的片段)的长度上加以测量。所述长度仅是示例性的,且应了解,由本文在表、图或序列表中所示的序列支撑的任何片段长度都可用于描述在其上测量同一性百分比的长度。

[0171] 如本文在多肽的情形下所用的术语“非重复性”是指在肽或多肽序列中缺乏内部同源性程度或内部同源性程度有限。术语“大致上非重复”可指例如存在少许或不存在以下情况:在序列中四个连续氨基酸是相同氨基酸类型;或指多肽具有10或更小的子序列计分(下文定义)或指以自N末端至C末端的顺序不存在构成多肽序列的序列基序的样式。如本文在多肽的情形下所用的术语“重复性”是指在肽或多肽序列中的内部同源性的程度。相反,

“重复”序列可含有短氨基酸序列的多个相同拷贝。举例来说,目标多肽序列可分成n-mer序列且可对相同序列的数目进行计数。高度重复序列含有大部分相同序列,而非重复序列含有少许相同序列。在多肽的情形下,序列可含有具有确定或可变长度的较短序列或基序的多个拷贝,其中所述基序自身具有非重复序列,从而致使全长多肽大致上是非重复的。测量非重复性所处的多肽的长度可自3个氨基酸至约200个氨基酸、约自6个氨基酸至约50个氨基酸、或自约9个氨基酸至约14个氨基酸变化。在多核苷酸序列的情形下使用的“重复性”是指序列中的内部同源性程度,例如像给定长度的相同核苷酸序列的频率。重复性可例如通过分析相同序列的频率来测量。

[0172] “载体”是将插入的核酸分子转移至宿主细胞中和/或在宿主细胞之间转移插入的核酸分子的核酸分子,优选在适当宿主中自我复制。所述术语包括主要起将DNA或RNA插入细胞中的作用的载体、主要起复制DNA或RNA的作用的复制载体、和起转录和/或翻译DNA或RNA的作用的表达载体。也包括提供一种以上上述功能的载体。“表达载体”是在引入适当宿主细胞中时可转录且翻译成多肽的多核苷酸。“表达系统”通常暗示包含可起产生所需表达产物的作用的表达载体的适合宿主细胞。

[0173] 如应用于多肽的“血清降解抗性”是指多肽能够抵抗在血液或其组分中的降解的能力,所述降解通常涉及血清或血浆中的蛋白酶。血清降解抗性可通过通常在约37℃下组合蛋白质与人(或视情况小鼠、大鼠、猴)血清或血浆通常持续一定范围的天数(例如0.25、0.5、1、2、4、8、16天)来测量。这些时间点的样本可进行蛋白质印迹测定且用抗体检测蛋白质。抗体可针对蛋白质中的标签。如果蛋白质在蛋白质印迹上显示单一条带(其中蛋白质的尺寸与注射的蛋白质的尺寸一致),那么未发生降解。在这个示例性方法中,如通过蛋白质印迹或等效技术判断的50%蛋白质降解所处的时间点是蛋白质的血清降解半衰期或“血清半衰期”。

[0174] 如本文所用的术语“$t_{1/2}$”是指计算为ln(2)/K_{el}的终末半衰期。K_{el}是通过对数浓度对时间曲线的终末线性部分的线性回归计算的终末消除速率常数。半衰期通常是指为沉积在活生物体中的一半数量的施用物质由正常生物过程代谢或消除所需的时间。术语“$t_{1/2}$”、“终末半衰期”、“消除半衰期”和“循环半衰期”在本文中可互换使用。

[0175] “主动清除”是指蛋白质除通过过滤或凝聚以外自循环移除所凭借的机制,且其包括由细胞、受体、代谢或降解介导的自循环移除蛋白质。

[0176] “表观分子量因子”和“表观分子量”是关于由特定氨基酸序列展现的表观分子量相对增加或降低的量度的相关术语。表观分子量是使用尺寸排阻色谱(SEC)或类似方法,通过与球状蛋白质标准物进行比较来测定,且用“表观kD”单位计量。表观分子量因子是表观分子量与实际分子量之间的比率;后者是通过基于氨基酸组成添加组成中各类型的氨基酸的计算分子量或通过根据在SDS电泳凝胶中与分子量标准物的比较进行估计来预测。

[0177] 术语“流体动力学半径”或“斯托克斯半径(Stokes radius)”是溶液中分子的有效半径(R_h,以nm计),其是通过假定物体穿过溶液且由溶液的粘性所抵抗来测量。在本发明的实施方案中,XTEN融合蛋白的流体动力学半径测量结果与作为一种更直观量度的‘表观分子量因子’相关。蛋白质的“流体动力学半径”影响它在水溶液中的扩散速率以及它在大分子的凝胶中迁移的能力。蛋白质的流体动力学半径是通过它的分子量以及通过它的结构(包括形状和紧密性)来测定。用于测定流体动力学半径的方法在本领域中是熟知的,如通

过使用如美国专利号6,406,632和7,294,513中所述的尺寸排阻色谱(SEC)。大多数蛋白质具有球状结构,此是蛋白质具有最小流体动力学半径所可具有的最紧密三维结构。一些蛋白质采用随机和开放的非结构化或'线性'构象且因此相较于具有类似分子量的典型球状蛋白质具有大得多的流体动力学半径。

[0178] "生理条件"是指活宿主中的一组条件以及体外条件,包括模拟活受试者的那些条件的温度、盐浓度、pH。已建立具有生理相关条件的用于体外测定的宿主。通常,生理缓冲液含有生理浓度的盐且调整至在约6.5至约7.8、且优选约7.0至约7.5的范围内的中性pH。多种生理缓冲液列于Sambrook等(2001)中。生理相关温度在约25℃至约38℃、且优选约35℃至约37℃的范围内。

[0179] "反应性基团"是可偶联于第二反应性基团的化学结构。反应性基团的实例是氨基、羧基、硫氢基、羟基、醛基、叠氮基。一些反应性基团可被活化来促进与第二反应性基团偶联。活化的非限制性实例是羧基与碳二亚胺反应、羧基转化成活化的酯、或羧基转化成叠氮化物官能团。

[0180] "控制释放剂"、"缓慢释放剂"、"长效制剂(depot formulation)"和"持续释放剂"可互换用于指代相对于在不存在试剂下施用多肽时的释放持续时间,能够延长本发明多肽的释放持续时间的试剂。本发明的不同实施方案可具有不同释放速率,从而产生不同治疗量。

[0181] 术语"抗原"、"靶标抗原"和"免疫原"在本文中可互换用于指代抗体片段或抗体片段基治疗剂与其结合或针对其具有特异性的结构或结合决定簇。

[0182] 如本文所用的术语"有效负载"是指具有生物或治疗活性的蛋白质或肽序列;即小分子的药效团的对应物。有效负载的实例包括但不限于凝血因子、细胞因子、酶、激素、以及血液和生长因子。

[0183] 如本文所用的术语"拮抗剂"包括部分或完全阻断、抑制或中和本文公开的天然多肽的生物活性的任何分子。用于鉴定多肽的拮抗剂的方法可包括使天然多肽与候选拮抗剂分子接触以及测量一种或多种通常与天然多肽相关的生物活性的可检测变化。在本发明的情形下,拮抗剂可包括蛋白质、核酸、碳水化合物、抗体或降低生物活性蛋白质的作用的任何其它分子。

[0184] 术语"激动剂"是以广义使用且包括模拟本文公开的天然多肽的生物活性的任何分子。适合激动剂分子明确包括天然多肽、肽、小有机分子等的激动剂抗体或抗体片段、片段或氨基酸序列变体。用于鉴定天然多肽的激动剂的方法可包括使天然多肽与候选激动剂分子接触以及测量一种或多种通常与天然多肽相关的生物活性的可检测变化。

[0185] 如本文所用,"治疗"或"缓和"或"改善"可互换使用且是指施用药物或生物制剂以实现治疗益处,治愈现存病状或减轻现存病状的严重性,或实现防治性益处,预防或降低病状发作的可能性或病状发生的严重性。就治疗益处而言,其是指根除或改善所治疗的潜伏病状或与潜伏病状相关的一种或多种生理症状以使在受试者中观察到改善,纵使受试者可能仍然受潜伏病状折磨。

[0186] 如本文所用的"治疗作用"或"治疗益处"是指由施用本发明的融合蛋白产生的生理作用,包括但不限于减轻、改善或预防人或其它动物的疾病,或另外增强人或动物的身体或精神良好状态,而非能够诱导产生针对生物活性蛋白质具有的抗原性表位的抗体。对于

防治性益处,可向处于发展特定疾病、所述疾病的病状或症状(例如,诊断有甲型血友病的受试者的出血)的风险下的受试者,或向尽管可能尚未对这个疾病作出诊断,但报告疾病的一种或多种生理症状的受试者施用组合物。

[0187] 如本文所用的术语“治疗有效量”和“治疗有效剂量”是指当以一次或重复剂量向受试者施用时,单独或作为融合蛋白组合物的一部分的药物或生物活性蛋白质能够对疾病病况或病状的任何症状、方面、测量参数或特征具有任何可检测有益作用的量。所述作用无需是绝对有益的。确定治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,尤其鉴于本文提供的详细公开内容。

[0188] 如本文所用的术语“治疗有效剂量方案”是指用于单独或作为融合蛋白组合物的一部分连续施用多次剂量(即,至少两次或两次以上)的生物活性蛋白质的时程,其中所述剂量是以治疗有效量给予以对疾病病况或病状的任何症状、方面、测量参数或特征产生持续有益作用。

[0189] I).一般技术

[0190] 除非另外指示,否则本发明的实施采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA的常规技术,所述技术属于本领域的技能。参见Sambrook,J.等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001;“Current protocols in molecularbiology”,F.M.Ausubel等编,1 987;丛书“Methods in Enzymology,”Academic Press,San Diego,CA.;“PCR 2:a practical approach”,M.J.MacPherson,B.D.Hames和GR.Taylor编,Oxford University Press,1 995;“Antibodies,a laboratory manual”Harlow,E.和Lane,D.编,Cold Spring Harbor Laboratory,1988;“Goodman&Gilman’s The Pharmacological Basis of TherapeuticS,”第1 1版,McGraw-Hill,2005;以及Freshney,R.I.,“Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique,”第4版,John Wiley&Sons,Somerset,NJ,2000,其内容以引用的方式整体并入本文。

[0191] II).凝血因子VIII

[0192] 本发明部分地涉及包含连接于一个或多个延伸重组蛋白(XTEN)的因子VIII凝血因子(CF)的组合物,从而产生CFXTEN融合蛋白组合物。如本文所用,“CF”是指因子VIII(FVIII)或FVIII的模拟物、序列变体和截短形式,如下所述。

[0193] “因子VIII”或“FVIII”或“FVIII蛋白”是指凝血因子蛋白质及其物种(包括人、猪、犬、大鼠或鼠类FVIII蛋白)和序列变体,包括但不限于含有2351个氨基酸的单链前体蛋白质(具有19个氨基酸的疏水性信号肽);约270-330kDa的含有2332个氨基酸的成熟因子VIII辅因子蛋白质,其具有结构域结构A1-A2-B-A3-C1-C2;以及FVIII的非酶“活性”或辅因子形式(FVIIIa),其为具有由于在R1648之后进行蛋白水解裂解而形成的两条链的循环异二聚体,其具有含有氨基酸1-1648(相对于成熟FVIII形式加以编号)的主要由A1-A2-B组成的重链形式(在90-220kD的范围内)和含有氨基酸1649-2232的80kDa轻链A3-C1-C2,所述各形式示意性描绘于图1中。此外且如本文所用,A1、A2和A3结构域各自涵盖酸性间隔子区域;分别为a1、a2和a3酸性区域。因此,应了解,描述为具有A1、A2、A3、B、C1和C2结构域的CFXTEN构建体包括a1、a2和a3酸性区域。如本文所用,“因子VIII”或“FVIII”或“FVIII多肽”也包括变体形式,包括具有取代、添加和/或缺失的蛋白质,只要变体保留如促凝血活性的所需生物活

性即可。数万种功能性FVIII变体已被构建且可用作如本文所述的重组FVIII蛋白。参见PCT公布号WO 2011/069164A2、WO 2012/006623A2、WO 2012/006635A2或WO 2012/006633A2,其全部以引用的方式整体并入本文。已知许多功能性FVIII变体。此外,已在血友病患者中鉴定FVIII中之数百种非功能性突变。参见例如Cutler等,Hum.Mutat.19:274-8(2002),其以引用的方式整体并入本文。此外,来自人的FVIII与来自其它物种的FVIII之间的比较已鉴定可能为功能所需的保守残基。参见例如Cameron等,Thromb.Haemost.79:317-22(1998)和US 6,251,632,其以引用的方式整体并入本文。

[0194] 在一个实施方案中,人因子VIII结构域是由以下氨基酸残基所界定:A1,残基Ala1-Arg372;A2,残基Ser373-Arg740;B,残基Ser741-Arg1648;A3,残基Ser1649-Asn2019;C1,残基Lys2020-Asn2172;C2,残基Ser2173-Tyr2332。A3-C1-C2序列包括残基Ser1649-Tyr2332。在另一实施方案中,残基Arg336-Arg372通常称为a1区域,且Arg372由凝血酶所裂解。在某些实施方案中,a2区域是A1结构域的一部分。在另一实施方案中,残基Glu1649-Arg1689称为a3酸性区域。在某些实施方案中,a3酸性区域是A3结构域的一部分。在另一实施方案中,天然FVIII蛋白具有下式:A1-a1-A2-a2-B-a3-A3-C1-C2,其中A1、A2和A3是结构相关的“A结构域”,B是“B结构域”,C1和C2是结构相关的“C结构域”,且a1、a2和a3是酸性间隔子区域。在前式中且参照图30中的一级氨基酸序列位置,人FVIII的A1结构域自Ala1延伸至约Arg336,a1间隔子区域自约Met337延伸至约Arg372,A2结构域自约Ser373延伸至约Tyr719,a2间隔子区域自约Glu720延伸至约Arg740,B结构域自约Ser741延伸至约Arg1648,a3间隔子区域自约Glu1649延伸至约Arg1689,A3结构域自约Ser1690延伸至约Asn2019,C1结构域自约Lys2020延伸至约Asn2172,且C2结构域自约Ser2173延伸至Tyr2332(Saenko等,2005,J Thromb Hemostasis,1,922-930)。除特定蛋白水解裂解位点以外,对FVIII的结构域和区域之间的边界的位置的指定在不同参考文献中可有所不同。因此,本文中指示的边界是通过使用术语“约”来指定为大致边界。

[0195] 所述因子VIII包括截短序列,如其中一部分或大部分B结构域序列缺失的B结构域缺失的“BDD”序列(如美国专利号6,818,439和7,632,921中公开或引用的BDD序列)。BDD FVIII的一实例是REFACTO®或XYNTHA®(重组BDD FVIII),其包含对应于图30的氨基酸1至743的第一多肽,融合于对应于图30的氨基酸1638至2332的第二多肽。可用于产生本发明的重组蛋白的示例性BDD FVIII构建体包括但不限于缺失对应于成熟人FVIII的氨基酸747-1638(图30)的氨基酸的FVIII(Hoeben R.C.等J.Biol.Chem.265(13):7318-7323(1990),其以引用的方式整体并入本文)、以及缺失对应于成熟人FVIII的氨基酸771-1666或氨基酸868-1562(图30)的氨基酸的FVIII(Meulien P.等Protein Eng.2(4):301-6(1988),其以引用的方式整体并入本文)。

[0196] 此外,涵盖包括异源氨基酸插入或取代(如天冬氨酸取代位置75处的缬氨酸)的序列、或重链和轻链是由接头共价连接的单链FVIII(scFVIII)。如本文所用,“FVIII”将为因子VIII分子的具有凝血因子VIII的典型特征的任何功能性形式,所述形式在向例如患有甲型血友病的受试者的所述受试者施用时能够纠正人因子VIII缺乏。如美国专利或申请号4,757,006;4,965,199;5,004,804;5,198,349,5,250,421;5,919,766;6,228,620;6,818,439;7,138,505;7,632,921;和20100081615中所述,已分离、表征和克隆FVIII或序列变体。

[0197] 人因子VIII由存在于X染色体的长臂尖端(q28)的单拷贝基因编码。它包含接近

186,000个碱基对(bp)且占X染色体的约0.1％(White,GC.和Shoemaker,C.B.,Blood(1989)73:1-12)。人FVIII氨基酸序列自如美国专利号4,965,199中所示的cDNA加以推断,所述专利以引用的方式整体并入本文。由cDNA序列获得的天然成熟人FVIII(即,无分泌信号肽但在其它翻译后加工之前)呈现为图3。

[0198] 编码成熟因子VIII mRNA的DNA见于26个大小在69至3,106bp的范围内的单独外显子中。分隔外显子的25个插入内含子区域大小在207至32,400bp的范围内。完整基因由约9kb外显子和177kb内含子组成。三个重复A结构域具有约30％序列同源性。B结构域含有约25个预测糖基化位点中的19个,且A3结构域据信含有对血管性血友病因子的结合位点。串联C结构域在A3结构域之后且彼此具有约37％同源性(White,GC.和Shoemaker,C.B.,Blood(1989)73:1-12)。

[0199] 在新合成的前体单链分子中,B结构域分隔天然因子FVIII的A2结构域和A3结构域。B结构域的准确边界已以不同方式报道为自前体序列的氨基酸712延伸至1648(Wood等,Nature(1984)312:330-337)或报道为氨基酸741-1648(Pipe,SW,Haemophilia(2009)15:1187-1196以及美国专利号7,560,107)或氨基酸740-1689(Toole,JJ.Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1986)83:5939-5942)。如本文所用,“B结构域”是指成熟因子VIII的氨基酸741-1648。如本文所用,“FVIII B结构域缺失”或“FVIII BDD”是指氨基酸741至1648中的任何氨基酸、片段或全部缺失的FVIII序列。在一个实施方案中,FVIII BDD变体保留来自N末端(如本文所用的“B1”)和C末端(如本文所用的“B2”)的B结构域的剩余氨基酸。在一种FVIII BDD变体中,B结构域剩余氨基酸是SFSQNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:1614)。在一种FVIII BDD变体中,B1剩余物是SFS且B2剩余物是QNPPVLKRHQR(SEQ ID NO:1615)。在另一FVIII BDD变体中,B1剩余物是SFSQN(SEQ ID NO:1616)且B2剩余物是PPVLKRHQR(SEQ ID NO:1617)。“B结构域缺失的因子VIII”、“FVIII BDD”或“BDD FVIII”可具有美国专利号6,316,226、6,346,513、7,041,635、5,789,203、6,060,447、5,595,886、6,228,620、5,972,885、6,048,720、5,543,502、5,610,278、5,171,844、5,112,950、4,868,112和6,458,563中公开的完全或部分缺失,所述专利各自以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,本发明的B结构域缺失的因子VIII序列包含在美国专利号6,316,226(也在US 6,346,513中)的第4栏第4行至第5栏第28行以及实施例1-5处公开的任一缺失。在另一实施方案中,B结构域缺失的因子VIII是S743/Q1638B结构域缺失的因子VIII(SQ形式因子VIII)(例如,氨基酸744至氨基酸1637缺失的因子VIII,例如,具有全长因子VIII的氨基酸1-743和氨基酸1638-2332的因子VIII)。在一些实施方案中,本发明的B结构域缺失的因子VIII具有在美国专利号5,789,203(以及US 6,060,447、US 5,595,886和US 6,228,620)的第2栏第26-51行以及实施例5-8处公开的缺失。在一些实施方案中,B结构域缺失的因子VIII具有以下中所述的缺失:美国专利号5,972,885的第1栏第25行至第2栏第40行;美国专利号6,048,720的第6栏第1-22行以及实施例1;美国专利号5,543,502的第2栏第17-46行;美国专利号5,171,844的第4栏第22行至第5栏第36行;美国专利号5,112,950的第2栏第55-68行,图2以及实施例1;美国专利号4,868,112的第2栏第2行至第19栏第21行以及表2;美国专利号7,041,635的第2栏第1行至第3栏第19行、第3栏第40行至第4栏第67行、第7栏第43行至第8栏第26行、以及第11栏第5行至第13栏第39行;或美国专利号6,458,563的第4栏第25-53行。在一些实施方案中,B结构域缺失的因子VIII缺失大部分B结构域,但仍然含有B结构域的为在体内将初级翻

译产物蛋白水解加工成两条多肽链所必需的氨基末端序列,如WO 91/09122中所公开,所述专利以引用的方式整体并入本文。在一些实施方案中,构建缺失氨基酸747-1638,即实际上完全缺失B结构域的B结构域缺失的因子VIII。Hoeben R.C.等J Biol.Chem.265(13):7318-7323(1990),其以引用的方式整体并入本文。B结构域缺失的因子VIII也可含有因子VIII的氨基酸771-1666或氨基酸868-1562的缺失。Meulien P.等Protein Eng.2(4):301-6(1988),其以引用的方式整体并入本文。作为本发明的一部分的其它B结构域缺失包括:缺失氨基酸982至1562或760至1639(Toole等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.(1986)83,5939-5942))、797至1562(Eaton等Biochemistry(1986)25:8343-8347))、741至1646(Kaufman(PCT公布申请号WO 87/04187))、747-1560(Sarver等,DNA(1987)6:553-564)、741至1648(Pasek(PCT申请号88/00831))、或816至1598或741至1648(Lagner(Behring Inst.Mitt.(1988)第82期:16-25;EP 295597)),所述文献和专利各自以引用的方式整体并入本文。可在本发明的实施方案中利用的任何因子VIII序列中进行各前述缺失。

[0200] 凝结中涉及的蛋白质包括因子I、因子II、因子III、因子IV、因子V、因子VI、因子VII、因子VIII、因子IX、因子X、因子XI、因子XII、因子XIII、蛋白质C和组织因子(共同或个别“凝结蛋白”)。内源性和外源性凝结路径中的主要凝结蛋白的相互作用显示于图2中。大多数凝结蛋白以酶原形式存在,但当活化时展现促凝血蛋白酶活性,其中它们活化另一凝结蛋白,从而有助于内源性或外源性凝血路径和凝块形成。在内源性凝血级联路径中,FVIII与活化的因子IX、因子X、钙和磷脂的复合物缔合。因子VIII异二聚体不具有酶活性,但在由凝血酶或因子Xa蛋白水解活化之后,异二聚体变得具有作为酶因子IXa的辅因子的活性,其中因子VIIIa的活性的特征在于它能够形成因子IXa和X的呈适于由因子IXa活化因子X的构象的膜结合位点。在由凝血酶裂解后,活化的FVIII(FVIIIa)自血管性血友病因子解离且结合带负电荷的磷脂PL,且所得复合物作为因子IXa的辅因子参与在因子X活化(因子X酶(tenase))复合物中。在C2结构域以及A3结构域中的氨基酸残基1649至1689内是血管性血友病因子(vWF)结合位点,其用于与血管性血友病因子复合,所得循环复合物保护FVIII免遭在血液中快速降解(Weiss HJ等Stabilization of factor VIII in plasma by the von Willebrand factor.Studies on posttransfusion and dissociated factor VIII and in patients with von Willebran d′s disease.J Clin Invest(1977)60:390)。

[0201] 活化的因子VIII是包含A1结构域和A2结构域以及包括结构域A3-C1-C2的轻链的异三聚体。因子IX的活化是通过自分子两步移除活化肽(Ala 146-Arg 180)来实现(Bajaj等,Human factor IX and factor IXa,METHODS IN ENZYMOLOGY.1993)。第一裂解是由因子XIa或因子VIIa/组织因子在Arg 145-Ala 146位点处进行。第二且限速裂解是在Arg 180-Val181处进行。活化移除35个残基。活化的人因子IX以通过一个使酶连接于Gla结构域的二硫桥固持在一起的C末端重链(28kDa)和N末端轻链(18kDa)的异二聚体形式存在。因子IXa又与活化的因子VIII协力活化因子X。或者,因子IX和X可均由通过外源性路径产生的与脂质化组织因子复合的因子VIIa活化。因子Xa接着参与凝血酶原转化成凝血酶所凭借的最终共同路径,且凝血酶又使纤维蛋白原转化成血纤维蛋白以形成凝块。

[0202] 凝血过程中的缺陷可导致凝块形成所花费的时间延长的出血病症(凝血病变)。所述缺陷可为先天性的或获得性的。举例来说,甲型血友病和乙型血友病是特征在于分别缺

乏FVIII和FIX的遗传性疾病。换句话说,生物活性因子VIII纠正源于受甲型血友病折磨的个体的血浆中的凝血缺陷。重组FVIII已显示是有效的且已被核准用于治疗成年患者和儿科患者的甲型血友病,且也用于阻止出血事件或预防与创伤和/或手术相关的出血。因子VIII的当前治疗用途在治疗展现因子VIII缺乏的个体以及患有血管性血友病(Von Willebrand's disease)的那些个体方面可存在问题。此外,以补充疗法接受因子VIII的个体常产生针对这些蛋白质的常降低或消除所结合的FVIII的促凝血活性的抗体。由于降低或打消治疗功效的这些抗体的存在,连续治疗是极度困难的。

[0203] 在一方面,本发明涵盖在CFXTEN融合蛋白组合物中包括与人FVIII一致的FVIII序列、与FVIII序列具有同源性的序列、天然序列(如来自人、非人灵长类动物、哺乳动物(包括家养动物))、或截短形式的FVIII;其全部保留天然FVIII的至少一部分促凝血活性且适用于预防、治疗、介导或改善甲型血友病或与创伤、手术或缺乏凝血因子VIII相关的出血事件。可通过标准同源性搜索技术(如NCBI BLAST)或在公开数据库中得到与FVIII具有同源性的序列,所述数据库如化学文摘服务数据库(Chemical Abstracts Services Database)(例如CAS登记)、GenBank、全球蛋白质资源(Universal Protein Resource)(UniProt)和订阅提供的数据库,如GenSeq(例如Derwent)。

[0204] 在一个实施方案中,并入主题CFXTEN组合物中的FVIII是序列对应于自然界中所见的FVIII蛋白的重组多肽。在另一实施方案中,FVIII是天然序列的保留相应天然FVIII的至少一部分促凝血活性的非天然FVIII序列变体、片段、同源物或模拟物。在另一实施方案中,FVIII是全部或一部分B结构域缺失的截短变体("FVIII BDD"),其可呈异二聚形式或可保持为单链("scFVIII"),后者描述于Meulien等,Protein Eng.(1988)2(4):301-306中。FVIII BDD的非限制性实例是在以下处缺失氨基酸的因子VIII序列:在残基编号741与残基编号1640之间(相对于天然成熟FVIII加以编号)、或在残基编号745与残基编号1640之间、或在残基编号745与残基编号1640之间、或在残基编号741与残基编号1690之间、或在残基编号745与残基编号1667之间、或在残基编号745与残基编号1657之间、或在残基编号747与残基编号1642之间、或在残基编号751与残基编号1667之间。

[0205] 在另一实施方案中,将异源序列并入FVIII中,所述异源序列可包括如以下更充分描述的XTEN。表1提供由本发明的CFXTEN融合蛋白涵盖的FVIII的氨基酸序列的非限制性清单。在一些实施方案中,并入CFXTEN融合蛋白中的FVIII包括相较于选自表1的具有类似长度的氨基酸序列,具有至少约70%序列同一性、或者80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一性的蛋白质。

[0206] 表1:FVIII氨基酸序列

[0207]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
FVIII 前体多肽（人）	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPS TRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLS DLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNE KLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQL DTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLF KGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVW QNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKE	1

[0208]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSV EGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEK KIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVL QDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQ QNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNE KEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPA ASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTY KKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQ GTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWK SQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCS QNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQK KTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPL YRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPR KNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPT FKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNK CQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDL LAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD SSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDA QITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVT GVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVN SLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
成熟FVIII（人）	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAID SNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFK VSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFL PESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEF TKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLP QIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTA HFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPL EETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHS IPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQG AKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKV ELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFL RVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLN ACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS SPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGL VMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASG	2

[0209]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	QYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHP THYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII（犬）	MQVELYTCCFLCLLPFSLSATRKYYLGAVELSWDYMQSDLLSALHADTSFSSRVP GSLPLTTSVTYRKTVFVEFTDDLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVIVLKN MASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYEDQTSQKEKEDDNVIPGESHTYVWQVLKE NGPMASDPPCLTYSYFSHVDLVKDLNSGLIGALLVCKEGSLAKERTQTLQEFVLL FAVFDEGKSWHSETNASLTQAEAQHELHTINGYVNRSLPGLTVCHKRSVYWHVI GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTFLMDLGQFLLFCHIPSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEDKDYDDDLYDSDMDVVSFDDDSSSPFI QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPSGPTPNDRSHKNLYLNNGPQRIGKKY KKVRFVAYTDETFKTREAIQYESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGI NYVTPLHTGRLPKGVKHLKDMPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSS FINLERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTEN MQRFLPNADVVQPHDPEFQLSNIMHSINGYVFDNLQLSVCLHEVAYWYILSVGA QTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWVLGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCNRNIDDYYEDTYEDIPTPLLNENNVIKPRSFSQNSRHPSTKEK QLKATTTPENDIEKIDLQSGERTQLIKAQSVSSSDLLMLLGQNPTPRGLFLSDLREA TDRADDHSRGAIERNKGPPEVASLRPELRHSEDREFTPEPELQLRLNENLGTNTTV ELKKLDLKISSSSDSLMTSPTIPSDKLAAATEKTGSLGPPNMSVHFNSHLGTIVFGN NSSHLIQSGVPLELSEEDNDSKLLEAPLMNIQESSLRENVLSMESNRLFKEERIRGP ASLIKDNALFKVNISSVKTNRAPVNLTTNRKTRVAIPTLLIENSTSVWQDIMLERN TEFKEVTSLIHNETFMDRNTTALGLNHVSNKTTLSKNVEMAHQKKEDPVPLRAE NPDLSSSKIPFLPDWIKTHGKNSLSSEQRPSPKQLTSLGSEKSVKDQNFLSEEKVVV GEDEFTKDTELQEIFPNNKSIFFANLANVQENDTYNQEKKSPEEIERKEKLTQENV ALPQAHTMIGTKNFLKNLFLLSTKQNVAGLEEQPYTPILQDTRSLNDSPHSEGIHM ANFSKIREEANLEGLGNQTNQMVERFPSTTRMSSNASQHVITQRGKRSLKQPRLS QGEIKFERKVIANDTSTQWSKNMNYLAQGTLTQIEYNEKEKRAITQSPLSDCSMR NHVTIQMNDSALPVAKESASPSVRHTDLTKIPSQHNSSHLPASACNYTFRERTSGV QEGSHFLQEAKRNNLSLAFVTLGITEGQGKFSSLGKSATNQPMYKKLENTVLLQP GLSETSDKVELLSQVHVDQEDSFPTKTSNDSPGHLDLMGKIFLQKTQGPVKMNK TNSPGKVPFLKWATESSEKIPSKLLGVLAWDNHYDTQIPSEEWKSQKKSQTNTAF KRKDTILPLGPCENNDSTAAINEGQDKPQREAMWAKQGEPGRLCSQNPPVSKHH QREITVTTLQPEEDKFEYDDTFSIEMKREDFDIYGDYENQGLRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSRSPHILRNRAQSGDVQQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIVVTFKNQASRPYSFYSSLISYDEDEGQGAEPRRKFVNPNET KIYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLICRSNTLNPA HGRQVTVQEFALVFTIFDETKSWYFTENLERNCRAPCNVQKEDPTLKENFRFHAI NGYVKDTLPGLVMAQDQKVRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA VYNLYPGVFETVEMLPSQVGIWRIECLIGEHLQAGMSTLFLVYSKKCQTPLGMAS GHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKDPFSWIKVDLLAPMIIHGI MTQGARQKFSSLYVSQFIIMYSLDGNKWHSYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIAQYIRLHPTHYSIRSTLRMELLGCDFNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYLS SMLATWSPSQARLHLQGRTNAWRPQANNPKEWLQVDFRKTMKVTGITTQGVKS LLISMYVKEFLISSSQDGHNWTLFLQNGKVKVFQGNRDSSTPVRNRLEPPLVARY VR LHPQSWAHHIALRLEVLGCDTQQPA	3
FVIII（猪）	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL	4

[0210]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAID SNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSST SNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSL SEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFK VSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFL PESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEF TKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLP QIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTA HFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPL EETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHS IPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQG AKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKV ELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFL RVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLN ACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS SPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEF ALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGL VMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASG QYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHP THYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKA RLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEF LISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII（鼠）	AIRRYYLGAVELSWNYIQSDLLSVLHTDSRFLPRMSTSFPFNTSIMYKKTVFVEYK DQLFNIAKPRPPWMGLLGPTIWTEVHDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGDEYEDQTSQMEKEDDKVFPGESHTYVWQVLKENGPMASDPPCLTYSYMSHV DLVKDLNSGLIGALLVCKEGSLSKERTQMLYQFVLLFAVFDEGKSWHSETNDSY TQSMDSASARDWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEIHSIF LEGHTFFVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLIDLGQFLLFCHISSHKHDGMEAYVKV DSCPEESQWQKKNNNEEMEDYDDDLYSEMDMFTLDYDSSPFIQIRSVAKKYPKT WIHYISAEEEDWDYAPSVPTSDNGSYKSQYLSNGPHRIGRKYKKVRFIAYTDETF KTRETIQHESGLLGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVSPLHARRLPR GIKHVKDLPIHPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFINPERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQMMSDKRNVILFSIFDENQSWYITENMQRFLPNAAKTQPQD PGFQASNIMHSINGYVFDSLELTVCLHEVAYWHILSVGAQTDFLSIFFSGYTFKHK MVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWVLGCHNSDFRKRGMTALLKVSSCDKST SDYYEEIYEDIPTQLVNENNVIDPRSFFQNTNHPNTRKKKFKDSTIPKNDMEKIEPQ FEEIAEMLKVQSVSVSDMLMLLGQSHPTPHGLFLSDGQEAIYEAIHDDHSPNAIDS NEGPSKVTQLRPESHHSEKIVFTPQPGLQLRSNKSLETTIEVKWKKLGLQVSSLPS NLMTTTILSDNLKATFEKTDSSGFPDMPVHSSSKLSTTAFGKKAYSLVGSHVPLN ASEENSDSNILDSTLMYSQESLPRDNILSIENDRLLREKRFHGIALLTKDNTLFKDN VSLMKTNKTYNHSTTNEKLHTESPTSIENSTTDLQDAILKVNSEIQEVTALIHDGT LLGKNSTYLRLNHMLNRTTSTKNKDIFHRKDEDPIPQDEENTIMPFSKMLFLSESS NWFKKTNGNNSLNSEQEHSPKQLVYLMFKKYVKNQSFLSEKNKVTVEQDGFTK NIGLKDMAFPHNMSIFLTTLSNVHENGRHNQEKNIQEEIEKEALIEEKVVLPQVHE ATGSKNFLKDILILGTRQNISLYEVHVPVLQNITSINNSTNTVQIHMEHFFKRRKDK ETNSEGLVNKTREMVKNYPSQKNITTQRSKRALGQFRLSTQWLKTINCSTQCIIKQ IDHSKEMKKFITKSSLSDSSVIKSTTQTNSSDSHIVKTSAFPPIDLKRSPFQNKFSHV QASSYIYDFKTKSSRIQESNNFLKETKINNPSLAILPWNMFIDQGKFTSPGKSNTNS VTYKKRENIIFLKPTLPEESGKIELLPQVSIQEEEILPTETSHGSPGHLNLMKEVFLQ	5

[0211]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	KIQGPTKWNKAKRHGESIKGKTESSKNTRSKLLNHHAWDYHYAAQIPKDMWKS KEKSPEIISIKQEDTILSLRPHGNSHSIGANEKQNWPQRETTWVKQGQTQRTCSQIP PVLKRHQRELSAFQSEQEATDYDDAITIETIEDFDIYSEDIKQGPRSFQQKTRHYFI AAVERLWDYGMSTSHVLRNRYQSDNVPQFKKVVFQEFTDGSFSQPLYRGELNEH LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFKNQASRPYSFYSSLISYKEDQRGEEPRRNFVKPNET KIYFWKVQHHMAPTEDEFDCKAWAYFSDVDLERDMHSGLIGPLLICHANTLNPA HGRQVSVQEFALLFTIFDETKSWYFTENVKRNCKTPCNFQMEDPTLKENYRFHAI NGYVMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGNNENIQSIHFSGHVFTVRKKEEYKMA VYNLYPGVFETLEMIPSRAGIWRVECLIGEHLQAGMSTLFLVYSKQCQIPLGMAS GSIRDFQITASGHYGQWAPNLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIVHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWLSYQGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNSF NPPIIARYIRLHPTHSSIRSTLRMELMGCDLNSCSIPLGMESKVISDTQITASSYFTN MFATWSPSQARLHLQGRTNAWRPQVNDPKQWLQVDLQKTMKVTGIITQGVKSL FTSMFVKEFLISSSQDGHHWTQILYNGKVKVFQGNQDSSTPMMNSLDPPLLTRYL RIHPQIWEHQIALRLEILGCEAQQQY	
FVIII BDD 变体（美国专利号 7632921, SEQ ID NO: 3)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYF IAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNE HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK HNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	6
FVIII BDD-2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD	7

[0212]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	
FVIII BDD-3 (G1648)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQGEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	8
FVIII BDD-4	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDY GMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIR AEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVT VQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG VFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQ KFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI	9

[0213]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWS PSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMY VKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII BDD-5	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK QSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFT DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEED QRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAP CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIH FSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKE PFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD FQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGN QDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	10
FVIII BDD-6	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD TISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFR NQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDE TKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQR IRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAP KLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMY SLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRS NAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEV LGCEAQDLY	11
FVIII BDD-7	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV	12

[0214]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYG MSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQ HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTV QEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL PGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVF ETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKF SSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVK EFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSW VHQIALRMEVLGCEAQDLY	
FVIII BDD-8 前体（美国专利号 6818439 SEQ ID NO: 47）	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPK SFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNM ASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKEN GPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLF AVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKS VYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNG PQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASR PYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR CLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENR SWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHN SDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYF IAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNE HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPN ETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTL NPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMII HGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK HNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPL LTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY	13
成熟 FVIII BDD-9（美国专利号 6818439）	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP	14

[0215]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	
FVIII BDD-10	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	15
FVIII BDD-11	ATRATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSY WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSY LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETK NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEV HSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAY VKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMA YTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYS RRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDL ASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPA GVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSG YTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVS SCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQ	16

[0216]

名称（来源）	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSS PHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVED NIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFA LFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLV MAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVE MLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTH YSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLIS SSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLY	
FVIII BDD-12	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	17
FVIII BDD-13	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKAS EGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHV DLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLM QDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFL EGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKV DSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDE TFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLP KGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFK HKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDK NTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDY DDTISVEMKKEDFDIFDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVT FRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD	18

[0217]

名称(来源)	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSK AGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQW APKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQ GRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY	

[0218] 本发明也涵盖包含具有在表1的FVIII序列中进行的各种氨基酸缺失、插入和取代的保留促凝血活性的FVIII的CFXTEN。多肽序列中的氨基酸的保守性取代的实例显示于表2中。在相较于本文公开的特定序列,FVIII的序列同一性小于100％的CFXTEN的实施方案中,本发明涵盖用其它19种天然L-氨基酸的任一者取代给定FVIII的可在FVIII序列内任何位置处的给定氨基酸残基,包括邻近氨基酸残基。如果任一取代导致促凝血活性不合需要变化,那么可采用一种替代性氨基酸且通过本文所述的方法(例如表49的测定),或使用例如美国专利号5,364,934(其内容以引用的方式整体并入本文)中阐述的用于保守性和非保守性突变的任何技术和指导方针;或使用本领域中通常已知的方法评估构建体蛋白质。在一优选取代中,CFXTEN实施方案的FVIII组分是通过用甘氨酸或丙氨酸置换R1648残基(相对于天然成熟形式的FVIII加以编号)来修饰以防止对异二聚体形式的蛋白水解加工。在另一取代中,CFXTEN实施方案的FVIII组分是通过用苯丙氨酸置换Y1680残基(相对于天然成熟形式的FVIII加以编号)来修饰。在另一实施方案中,CFXTEN实施方案的FVIII组分是通过用苯丙氨酸置换Y1680残基(相对于天然成熟形式的FVIII加以编号)且用甘氨酸或丙氨酸置换R1648残基(相对于天然成熟形式的FVIII加以编号)来修饰。

[0219] 在一个实施方案中,融合蛋白组合物的FVIII具有一个或多个被设计来降低FVIII抑制剂在由表9的抗体识别的表位处的结合的氨基酸取代,包括但不限于在以下处的取代:Lys(377)、Lys(466)、Lys(380)、Ser(488)、Arg(489)、Arg(490)、Leu(491)、Lys(493)、Lys(496)、His(497)、Lys(499)、Lys(512)、Lys(523)、Lys(556)、Met(2199)、Phe(2200)、Leu(2252)、Val(2223)和Lys(2227)。此外,变体可包括例如其中在或接近全长天然氨基酸序列或FVIII的结构域的N末端或C末端处添加或缺失一个或多个氨基酸残基的多肽,只要变体保留天然肽的一些(如果不是全部)促凝血活性即可。相较于天然循环FVIII保留至少一部分(例如,至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、或至少95％或更多)促凝血活性的所得FVIII序列被视为适用于本发明的融合蛋白组合物。FVIII变体的实例在本领域中是已知的,包括美国专利和申请号6,316,226;6,818,439;7,632,921;20080227691中所述的那些,所述专利和申请以引用的方式并入本文。在一个实施方案中,FVIII序列变体具有在氨基酸位置75(相对于天然成熟形式的FVIII加以编号)处取代缬氨酸的天冬氨酸。

[0220] 表2:示例性保守性氨基酸取代

[0221]

原始残基	示例性取代
Ala(A)	val;leu;ile
Arg(R)	lys;gln;asn
Asn(N)	gin;his;lys;arg

Asp(D)	Glu
Cys(C)	Ser
Gln(Q)	Asn
Glu(E)	Asp
Gly(G)	Pro
His(H)	asn:gin:lys:arg
Ile(I)	leu;val;met;ala;phe:正亮氨酸
Leu(L)	正亮氨酸:ile:val;met;ala:phe
Lys(K)	arg:gin:asn
Met(M)	leu;phe;ile
Phe(F)	leu:val:ile;ala
Pro(P)	Gly
Ser(S)	Thr
Thr(T)	Ser
Trp(W)	Tyr
Tyr(、Y、)	Trp:phe:thr:ser
Val(V)	Ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸

[0222] III).延伸重组多肽

[0223] 在一方面,本发明提供适用作用以连接于FVIII多肽和/或并入FVIII多肽内,从而产生CFXTEN融合蛋白的融合蛋白配偶体(partner)的XTEN多肽组合物。XTEN通常是具有非天然存在的大致上非重复序列的多肽,所述序列在生理条件下具有低程度或不具有二级或三级结构。XTEN通常具有约36至约3000个氨基酸,其中大多数或全部是小亲水性氨基酸。如本文所用,“XTEN”明确排除完整抗体或抗体片段(例如单链抗体和Fc片段)。XTEN多肽具有作为融合蛋白配偶体的效用,因为它们在连接于FVIII蛋白以产生CFXTEN融合蛋白时起各种作用,从而赋予某些合乎需要的药代动力学、物理化学、药理学和医药性质。所述CFXTEN融合蛋白组合物相较于未连接于XTEN的相应FVIII具有增强的性质,从而使得它们适用于治疗如以下更充分描述的与FVIII缺乏或出血病症相关的某些病状。

[0224] 对待融合于用于产生本发明融合蛋白组合物的FVIII蛋白的XTEN的选择准则通常涉及XTEN的物理/化学性质的属性和构象结构,所述构象结构又用于对FVIII融合蛋白组合物赋予增强的医药、药理学和药代动力学性质。XTEN的非结构化特征和物理/化学性质部分地由不相称地限于4-6个亲水性氨基酸的总体氨基酸组成、可定量非重复设计中的氨基酸的连接、以及XTEN多肽的长度所致。在为XTEN所共有但不为多肽所共有的一有利特征中,本文公开的XTEN的性质不依赖于绝对一级氨基酸序列,如由表4的示例性序列的多样性所证明,在不同长度范围内具有相似性质,其中许多性质在实施例中加以记载。本发明的XTEN可展现一种或多种或全部以下有利性质:非结构化构象、构象可挠性、水溶性增强、高度蛋白酶抗性、低免疫原性、与哺乳动物受体的结合较低、确定电荷度和流体动力学(或斯托克斯)半径增加;可使得它们特别适用作融合蛋白配偶体的性质。相较于未连接于XTEN的FVIII,XTEN赋予包含融合于XTEN的FVIII的融合蛋白的增强的性质的非限制性实例包括总体溶解度和/或代谢稳定性增加、对蛋白水解的敏感性降低、免疫原性降低、在皮下或肌肉内施用

时吸收速率降低、与FVIII清除受体的结合降低、与抗有效负载抗体的反应性降低、与底物的相互作用增强、和/或当向受试者施用时药代动力学性质增强。相较于未连接于XTEN的FVIII,CFXTEN组合物的增强的药代动力学性质包括终末半衰期更长(例如,2倍、3倍、4倍或更长)、曲线下面积(AUC)增加(例如,25%、50%、100%或更大)、分布体积更低、以及在皮下或肌肉内注射之后吸收增强(这是相较于必须静脉内施用的可商购FVIII形式的一个优势)。此外,据信包含裂解序列(以下更充分描述)的CFXTEN组合物允许持续释放生物活性FVIII,以使施用的CFXTEN充当储槽(depot)。明确涵盖的是本发明CFXTEN融合蛋白可展现本文公开的改进性质的一者或多者或任何组合。由于这些性质增强,据信当以类似剂量下施用时,CFXTEN组合物相较于未连接于XTEN的FVIII允许以较小频率给药。所述CFXTEN融合蛋白组合物具有治疗如本文所述的某些因子VIII相关病状的效用。

[0225] 本领域已知用于测定如包含XTEN的CFXTEN组合物的蛋白质的物理/化学性质的多种方法和测定。所述性质包括但不限于二级或三级结构、溶解度、蛋白质聚集、稳定性、绝对和表观分子量、纯度和均一性、熔融性质、污染和水含量。用以测定这些性质的方法包括分析性离心、EPR、HPLC-离子交换、HPLC-尺寸排阻、反相HPLC、光散射、毛细管电泳、圆二色性、差示扫描量热法、荧光、HPLC-离子交换、HPLC-尺寸排阻、IR、NMR、拉曼(Raman)光谱术、折射法和紫外光/可见光谱术。其它方法公开于Arnau等,Prot Expr and Purif(2006)48,1-13中。

[0226] CFXTEN的XTEN组分被设计来在生理条件下充当变性肽序列,不管聚合物的延伸长度如何。“变性”描述肽在溶液中的特征在于肽骨架的构象自由度较大的状态。大多数肽和蛋白质在高浓度变性剂存在下或在高温下采用变性构象。呈变性构象的肽具有例如特征圆二色性(CD)光谱且特征在于缺乏长程相互作用,如通过NMR所确定。“变性构象”和“非结构化构象”在本文中是同义使用。在一些实施方案中,本发明提供在生理条件下主要缺乏二级结构的XTEN序列。在其它情况下,XTEN序列在生理条件下大致上缺乏二级结构以使XTEN可采用无规卷曲构象。如在这个情形下使用的“主要缺乏”是指XTEN序列的至少50%XTEN氨基酸残基不促成二级结构,如通过本文所述的手段所测量或确定。如在这个情形下使用的“大致上缺乏”是指XTEN序列的至少约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或至少约99%XTEN氨基酸残基不促成二级结构,如通过本文所述的方法所测量或确定。

[0227] 本领域中已建立多种方法来辨别在给定多肽中存在或不存在二级和三级结构。具体来说,二级结构可例如通过在“远紫外”光谱区(190-250nm)中进行圆二色性光谱术来以分光光度方式测量。如α螺旋和β折叠的二级结构元件各自产生CD光谱的特征形状和幅度,缺乏这些结构元件也是这样。也可通过某些计算机程序或算法预测多肽序列的二级结构,所述程序或算法如熟知的Chou-Fasman算法(Chou,P.Y.等(1974)Biochemistry,1 3:222-45)和Garnier-Osguthorpe-Robson(“GOR”)算法(Garnier J,Gibrat JF,Robson B.(1996),GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence.Methods Enzymol266:540-553),如美国专利申请公布号20030228309A1中所述。对于给定序列,算法可预测是否存在一些或完全不存在二级结构,表示为序列中形成例如α螺旋或β折叠的总残基数和/或残基的百分比或序列中预测会导致形成无规卷曲(其缺乏二级结构)的残基的百分比。

[0228] 在一个实施方案中,主题融合蛋白组合物中使用的XTEN序列的α螺旋百分比在0%

至小于约5%的范围内,如通过Chou-Fasman算法所确定。在另一实施方案中,融合蛋白组合物的XTEN序列的β折叠百分比在0%至小于约5%的范围内,如通过Chou-Fasman算法所确定。在一些实施方案中,融合蛋白组合物的XTEN序列的α螺旋百分比在0%至小于约5%的范围内且β折叠百分比在0%至小于约5%的范围内,如通过Chou-Fasman算法所确定。在一些实施方案中,融合蛋白组合物的XTEN序列的α螺旋百分比小于约2%且β折叠百分比小于约2%。融合蛋白组合物的XTEN序列具有高度无规卷曲百分比,如通过GOR算法所确定。在一些实施方案中,XTEN序列具有至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%、且最优选至少约99%无规卷曲,如通过GOR算法所确定。在一些实施方案中,融合蛋白组合物的XTEN序列的α螺旋百分比在0%至小于约5%的范围内且β折叠百分比在0%至小于约5%的范围内,如通过Chou-Fasman算法所确定;且具有至少约90%无规卷曲,如通过GOR算法所确定。在其它实施方案中,融合蛋白组合物的XTEN序列具有小于约2%的α螺旋百分比和小于约2%的β折叠百分比、至少约90%无规卷曲,如通过GOR算法所确定。

[0229] 1.非重复序列

[0230] 意图CFXTEN实施方案的XTEN序列大致上是非重复的。一般来说,重复氨基酸序列具有聚集或形成较高级结构的倾向,如由天然重复序列(如胶原蛋白和亮氨酸拉链)所例证。这些重复氨基酸也可倾向于形成接触,从而产生结晶或伪结晶结构。相反,非重复序列的聚集倾向较低使得能够设计带电荷氨基酸的频率相对较低的长序列XTEN,如果序列是重复的,那么所述长序列XTEN将另外可能聚集。主题XTEN的非重复性可通过评估一种或多种以下特征加以观察。在一个实施方案中,“大致上非重复”XTEN序列具有约36、或至少72、或至少96、或至少144、或至少288、或至少400、或至少500、或至少600、或至少700、或至少800、或至少864、或至少900、或至少1000、或至少2000至约3000个或更多个氨基酸残基,或具有的长度在约36至约3000、约100至约500、约500至约1000、约1000至约3000个氨基酸和残基的范围内,其中序列中无三个连续氨基酸是相同氨基酸类型,除非所述氨基酸是丝氨酸,在所述情况下,至多三个连续氨基酸是丝氨酸残基。在另一实施方案中,如以下更充分所述,“大致上非重复”XTEN序列包含具有9至14个氨基酸残基的基序,其中所述基序由4至6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,且其中任一基序中的任何两个连续氨基酸残基的序列在所述序列基序中不重复超过两次。

[0231] 多肽或基因的重复程度可通过计算机程序或算法或通过本领域中已知的其它手段加以测量。根据本发明,本文公开将用于计算如XTEN的特定多肽的重复程度的算法,且提供由算法分析的序列的实例(参见以下实施例)。在一方面,预定长度的多肽的重复性可根据由等式1给出的公式加以计算(在下文中称为“子序列计分”):

[0232] 子序列计分 $\frac{\sum_{i=1}^{m} 计数_i}{m}$ I

[0233] 其中:m=(多肽的氨基酸长度)-(子序列的氨基酸长度)+1;且计数$_i$=序列$_i$内各独特子序列的累积出现次数

[0234] 称为“SegScore”的算法被开发来应用前述等式定量如XTEN的多肽的重复性,从而

提供子序列计分,其中通过确定长度“s”的独特子序列在设置长度中出现的次数(“计数”),除以序列的预定长度内的子序列的绝对数目来分析预定氨基酸长度“n”的序列的重复性。图27描绘SegScore算法的逻辑流程图,而图28描绘如何获得具有11个氨基酸且子序列长度是3个氨基酸残基的假想XTEN的子序列计分的示意图。举例来说,预定多肽长度200个氨基酸残基具有192个重叠9氨基酸子序列和198个3-mer子序列,但任何给定多肽的子序列计分将取决于独特子序列的绝对数目以及各独特子序列(是指不同氨基酸序列)在序列的预定长度中出现的频率。

[0235] 在本发明的情形下,“子序列计分”是指各独特3-mer框跨越累积XTEN多肽的200个连续氨基酸的出现次数总和除以独特3-mer子序列在含有200个氨基酸的序列内的绝对数目。由重复和非重复多肽的200个连续氨基酸获得的所述子序列计分的实例呈现于实施例45中。在一个实施方案中,本发明提供一种包含一个XTEN的CFXTEN,其中所述XTEN的子序列计分小于12、更优选小于10、更优选小于9、更优选小于8、更优选小于7、更优选小于6、且最优选小于5。在另一实施方案中,本发明提供包含至少两个至约六个XTEN的CFXTEN,其中XTEN的200个氨基酸的子序列计分小于10、更优选小于9、更优选小于8、更优选小于7、更优选小于6、且最优选小于5。在本文所述的CFXTEN融合蛋白组合物的实施方案中,融合蛋白的具有子序列计分10或更低(即9、8、7等)的XTEN组分也大致上是非重复的。

[0236] 据信本发明的XTEN的非重复特征连同在XTEN中占优势的特定类型的氨基酸一起而非绝对一级序列赋予CFXTEN融合蛋白的许多增强的物理化学和生物性质。这些增强的性质包括所得CFXTEN相较于包含具有重复序列的多肽的融合蛋白,融合蛋白在宿主细胞中的表达程度更高、编码XTEN的基因的遗传稳定性更大、溶解度更大、聚集倾向更小、以及药代动力学增强。这些增强的性质允许更高效制造,降低商品成本,且有助于配制包含XTEN的含有极高蛋白质浓度(在一些情况下超过100mg/ml)的药物制剂。此外,各实施方案的XTEN多肽序列被设计来具有低程度的内部重复性以降低或大致上消除在向哺乳动物施用时的免疫原性。当向哺乳动物施用时,由主要限于仅三个氨基酸(如甘氨酸、丝氨酸和谷氨酸)的短重复基序组成的多肽序列可产生相对较高抗体效价,尽管在这些序列中不存在预测T细胞表位。这可能由多肽的重复性质引起,因为已显示具有重复表位的免疫原(包括蛋白质聚集体、交联免疫原和重复碳水化合物)具有高度免疫原性且可例如导致B细胞受体交联,从而导致B细胞活化。(Johansson,J.等(2007)Vaccine,25:1676-82;Yankai,Z.等(2006)Biochem Biophys Res Commun,345:1 365-71;Hsu,C.T.等(2000)Cancer Res,60:3701-5);Bachmann MF等Eur J Immunol.(1995)25(12):3445-3451)。

[0237] 2.示例性序列基序

[0238] 本发明涵盖用作融合配偶体的包含多个较短序列单元或基序的XTEN,其中所述基序的氨基酸序列是非重复的。尽管使用利用多聚化序列基序的文库进行“构筑嵌段”方法来产生XTEN序列,但满足非重复性质。因此,尽管XTEN序列可由少至四种不同类型的序列基序的多个单元组成,但因为所述基序自身通常由非重复氨基酸序列组成,所以总体XTEN序列被设计来致使序列大致上是非重复的。

[0239] 在一个实施方案中,XTEN具有含有大于约36至约3000、或约100至约2000、或约144至约1000个氨基酸残基或甚至更长的大致上非重复序列,其中所述XTEN序列的至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或约100%由非重叠序

列基序组成,且其中所述基序各自具有约9至36个氨基酸残基。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或约100%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有9至14个氨基酸残基。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约80%、或至少约85%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或约100%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有12个氨基酸残基。在这些实施方案中,优选的是序列基序由大致上(例如,90%或90%以上)或仅小亲水性氨基酸组成,以使总体序列具有非结构化可挠性特征。包括在XTEN中的氨基酸的实例是例如精氨酸、赖氨酸、苏氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸和甘氨酸。由于如密码子优化、装配多核苷酸编码序列基序、蛋白质的表达、表达的蛋白质的电荷分布和溶解度、以及二级和三级结构的测试变量,发现具有本文公开的增强的特征的XTEN组合物主要或仅包括甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)残基,其中序列被设计成大致上是非重复的。在一个实施方案中,XTEN序列主要具有四至六种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)或脯氨酸(P)的氨基酸,所述氨基酸排列在长度大于约36至约3000、或约100至约2000、或约144至约1000个氨基酸残基的大致上非重复序列中。在一些实施方案中,XTEN序列是由4、5或6种类型的选自由以下组成的组的氨基酸构成:甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)或脯氨酸(P)。在一些实施方案中,XTEN具有大于约36至约1000、或约100至约2000、或约400至约3000个氨基酸残基的序列,其中所述序列的至少约80%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有9至36个氨基酸残基且其中各所述基序的至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%或100%由4至6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,且其中全长XTEN中的任一氨基酸类型的含量不超过30%。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约90%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有9至36个氨基酸残基,其中所述基序由4至6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,且其中全长XTEN中的任一氨基酸类型的含量不超过40%、或约30%、或25%、或约17%。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约90%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有12个由4至6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成的氨基酸残基,且其中全长XTEN中的任一氨基酸类型的含量不超过40%、或30%、或约25%。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%至约100%由非重叠序列基序组成,其中所述基序各自具有12个由甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)组成的氨基酸残基。

[0240] 在其它实施方案中,XTEN包含大于约36至约3000个氨基酸残基的大致上非重复序列,其中所述序列的至少约80%、或至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%由9至14个氨基酸残基的非重叠序列基序组成,其中所述基序由4至6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,且其中任一基序中的任何两个连续氨基酸残基的序列在所述序列基序中不重复超过两次。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%

由12个氨基酸残基的非重叠序列基序组成,其中所述基序由四至六种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,且其中任一序列基序中的任何两个连续氨基酸残基的序列在所述序列基序中不重复超过两次。在其它实施方案中,XTEN序列的至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%由12个氨基酸残基的非重叠序列基序组成,其中所述基序由甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)组成,且其中任一序列基序中的任何两个连续氨基酸残基的序列在所述序列基序中不重复超过两次。在其它实施方案中,XTEN由12个氨基酸的序列基序组成,其中所述氨基酸选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P),且其中任一序列基序中的任何两个连续氨基酸残基的序列在所述序列基序中不重复超过两次,且其中全长XTEN中的任一氨基酸类型的含量不超过30%。前述实施方案是大致上非重复XTEN序列的实例。以下详述其它实例。

[0241] 在一些实施方案中,本发明提供包含一个、或两个、或三个、或四个、五个、六个或更多个具有约36至约1000个氨基酸残基或累积具有约100至约3000个氨基酸残基的非重复XTEN序列的CFXTEN组合物,其中所述序列的至少约80%、或至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%至约100%由四个或更多个选自表3的氨基酸序列的非重叠序列基序的多个单元组成,其中总体序列保持大致上非重复。在一些实施方案中,XTEN包含非重叠序列基序,其中所述序列的约80%、或至少约85%、或至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%或约100%由选自自表3选择的单一基序家族(从而产生家族序列)的非重叠序列的多个单元组成。如本文所用,“家族”是指XTEN具有仅选自来自表3的单一基序种类(即AD、AE、AF、AG、AM、AQ、BC或BD XTEN)的基序,且选择XTEN中不来自家族基序的任何其它氨基酸以实现所需性质,如允许通过编码核苷酸并入限制位点,并入裂解序列,或实现与CFXTEN的FVIII凝血因子组分的更好键联。在XTEN家族的一些实施方案中,XTEN序列包含AD基序家族或AE基序家族或AF基序家族或AG基序家族或AM基序家族或AQ基序家族或BC家族或BD家族的非重叠序列基序的多个单元,从而所得XTEN展现上述同源性范围。在其它实施方案中,XTEN包含来自表3的两个或更多个基序家族的基序序列的多个单元。可选择这些序列以实现由以下更充分描述的基序的氨基酸组成赋予的所需物理/化学特征,包括如净电荷、亲水性、缺乏二级结构或缺乏重复性的性质。在上文于这个段落中所述的实施方案中,可使用本文所述的方法选择并装配并入XTEN中的基序以获得约36至约3000个氨基酸残基的XTEN。

[0242] 表3:具有12个氨基酸的XTEN序列基序和基序家族

[0243]

基序家族	基序序列	SEQ ID NO:
AD	GESPGGSSGSES	19
AD	GSEGSSGPGESS	20
AD	GSSESGSSEGGP	21
AD	GSGGEPSESGSS	22
AE、AM	GSPAGSPTSTEE	23
AE、AM、AQ	GSEPATSGSETP	24
AE、AM、AQ	GTSESATPESGP	25
AE、AM、AQ	GTSTEPSEGSAP	26
AF、AM	GSTSESPSGTAP	27
AF、AM	GTSTPESGSASP	28
AF、AM	GTSPSGESSTAP	29
AF、AM	GSTSSTAESPGP	30
AG、AM	GTPGSGTASSSP	31
AG、AM	GSSTPSGATGSP	32

[0244]

基序家族	基序序列	SEQ ID NO:
AG、AM	GSSPSASTGTGP	33
AG、AM	GASPGTSSTGSP	34
AQ	GEPAGSPTSTSE	35
AQ	GTGEPSSTPASE	36
AQ	GSGPSTESAPTE	37
AQ	GSETPSGPSETA	38
AQ	GPSETSTSEPGA	39
AQ	GSPSEPTEGTSA	40
BC	GSGASEPTSTEP	41
BC	GSEPATSGTEPS	42
BC	GTSEPSTSEPGA	43
BC	GTSTEPSEPGSA	44
BD	GSTAGSETSTEA	45
BD	GSETATSGSETA	46
BD	GTSESATSESGA	47
BD	GTSTEASEGSAS	48

[0245] *表示当以各种排列一起使用时产生“家族序列”的个别基序序列

[0246] 在XTEN家族的一些实施方案中,XTEN序列包含AD基序家族、AE基序家族或AF基序家族或AG基序家族或AM基序家族或AQ基序家族或BC家族或BD家族的非重叠序列基序的多个单元,从而所得XTEN展现上述同源性范围。在其它实施方案中,XTEN包含被选择来实现可由以下更充分描述的基序的氨基酸组成赋予的所需物理化学特征的来自表3的两个或更多个基序家族的基序序列的多个单元,所述特征包括如净电荷、缺乏二级结构或缺乏重复性的性质。在上文于这个段落中所述的实施方案中,可使用本文所述的方法选择并装配并入XTEN中的基序或基序的各部分以获得约36、约42、约72、约144、约288、约576、约864、约1000、约2000至约3000个氨基酸残基或任何中间长度的XTEN。适用于并入主题CFXTEN中的

XTEN家族序列的非限制性实例呈现于表4中。意图关于表4提及的指定序列具有表4中阐述的那个序列,而一般化提及例如AE144序列意图涵盖具有144个氨基酸残基的任何AE序列;例如AE144_1A、AE144_2A等,或一般化提及例如AG144序列意图涵盖具有144个氨基酸残基的任何AG序列,例如AG144_1、AG144_2、AG144_A、AG144_B、AG144_C等。

[0247] 表4:XTEN多肽

[0248]

XTEN名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
AE42	GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS	49
AE42_1	TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGS	50
AE42_2	PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG	51
AE42_3	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP	52
AG42_1	GAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGP	53
AG42_2	GPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP	54
AG42_3	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA	55
AG42_4	SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG	56
AE48	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS	57
AM48	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS	58
AE144	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	59
AE144_1A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	60
AE144_2A	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	61
AE144_2B	TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG	62
AE144_3A	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	63
AE144_3B	SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	64
AE144_4A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	65
AE144_4B	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	66

[0249]

XTEN名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
AE144_5A	TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG	67
AE144_6B	TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG	68
AF144	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	69
AG144_1	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP	70
AG144_2	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	71
AG144_A	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	72
AG144_B	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	73
AG144_C	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	74
AG144_F	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	75
AG144_3	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	76
AG144_4	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	77
AE288_1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	78
AE288_2	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	79
AG288_1	PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS	80
AG288_2	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	81
AF504	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSXPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST	82

[0250]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSP	
AF540	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	83
AD576	GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPG SSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSS ESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSGG EPSESGSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSS GSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGG PGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSS GSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSSEGGPGESSG SSESGSSEGGPGSEGSSGPGESS	84
AE576	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP	85
AF576	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESP GPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGT STPESGSASPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTE SPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGE SSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGS ASPGTSTPESGSASP	86
AG576	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS	87
AE624	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	88

[0251]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAP	
AD836	GSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESG ESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGES PGGSSGSESGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSES GSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSEGSSGP GESSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSGGEPSES GSSGSSESGSSEGGPGSGGEPSESGSSGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGS ESGSEGSSGPGESSGSEGSSGPGESSGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGP GESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGPGESSGESPGGSSGSESGSEGSSGPGSSES GSSEGGPGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSEGSSGP GESSGESPGGSSGSESGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSSESGSSEGGPGSGGEPSES GSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSSGSSESGSSEGGPGESPGGSSGS ESGSGGEPSESGSSGESPGGSSGSESGSGGEPSESGSS	89
AE864	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	90
AF864	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGT STPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGS ASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPG STSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGPXXXGAS ASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSES PSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESST APGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGT SPSGESSTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSS TAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSP	91
AG864_2	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA	92

[0252]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST GSP	
AM875	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGA SASGAPSTGGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSE SPSGTAPGTSPSGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATS GSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESS TAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSAS PGSTSESPSGTAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAP	93
AE912	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	94
AM923	MAEPAGSPTSTEEGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGS TSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGASASGAPSTGGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGT APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	95
AM1318	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGS TSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGP EPTGPAPSGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSTSST AESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGES STAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES	96

[0253]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS SPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGASASGAPSTGGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS STPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTS STAESPGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAP	
BC 864	GTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGS EPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPAT SGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSEPSTSEPGAGSEPATSG TEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSGASEPTSTEPGSEPATSGTE PSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPS GSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGS GASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTST EPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEP SEPGSAGSEPATSGTEPSGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSE PGSAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGTSEPSTSEPGAGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPG SAGTSTEPSEPGSAGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGSEPATSGTEPS GSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGSEPATSGTEPSGTSEPSTSEPGAGSEPATSGTEPSGS GASEPTSTEPGTSTEPSEPGSAGSEPATSGTEPSGSGASEPTSTEPGTSTEPSEPGSA	97
BD864	GSETATSGSETAGTSESATSESGAGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTEAGTSESATSESGAGTSTEASEGSASGSETATSGSETAGSTAGSETSTEA GSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEA GSTAGSETSTEAGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGTSTEASEGSAS GSTAGSETSTEAGSETATSGSETAGTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGTSESATSESGAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGTSTEASEGSASGSTAGSETSTEAGSTAGSETSTEAGSETATSGSETA GTSESATSESGAGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGSETATSGSETA GTSTEASEGSASGTSESATSESGAGSETATSGSETAGSETATSGSETAGTSESATSESGA GTSESATSESGAGSETATSGSETA	98
AE948	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGTSESATPESGP	99
AE1044	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEP	100

[0254]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST	
AE1140	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPA	101
AE1236	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEP	102
AE1332	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSE	103

[0255]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTST	
AE1428	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPA	104
AE1524	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPA	105
AE1620	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEP ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST	106
AE1716	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSE	107

[0256]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSE	
AE1812	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEP	108
AE1908	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP	109
AE2004 A	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSG SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATP	110

[0257]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	ESGPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSE	
AG948	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	111
AG1044	GTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST	112
AG1140	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAST GTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSST	113
AG1236	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTP	114

[0258]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP	
AG1332	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG	115
AG1428	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTG PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP	116
AG1524	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTP GSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS	117

[0259]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPG	
AG1620	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGT SSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGT GPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPS ASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST	118
AG1716	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS PSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGP GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG	119
AG1812	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASP	120
AG1908	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPG	121

[0260]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSP	
AG2004 A	GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP	122
AE72B	SPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPG	123
AE72C	TSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPG	124
AE108A	TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS	125
AE108B	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	126
AE144A	STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGS	127
AE144B	SEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPG	128
AE180A	TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	129
AE216A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	130
AE252A	ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSE	131

[0261]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
AE288A	TPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA	132
AE324A	PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	133
AE360A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	134
AE396A	PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS	135
AE432A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATS	136
AE468A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	137
AE504A	EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	138
AE540A	TPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEP	139
AE576A	TPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	140

[0262]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS PAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPT STEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GSEPATSGSETPGTSESA	
AE612A	GSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	141
AE648A	PESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSET PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESAT	142
AE684A	EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TS	143
AE720A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTE	144
AE756A	TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP	145

[0263]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEG SPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSES	
AE792A	EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPS	146
AE828A	PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS ESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG PGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESAT PESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETPGTSESAT	147
AG72A	GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASS	148
AG72B	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSP	149
AG72C	SPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSST PSGATGSPGA	150
AG108A	SASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASP	151
AG108B	PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	152
AG144A	PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS	153
AG144B	PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASP	154
AG180A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS	155
AG216A	TGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG	156
AG252A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS	157

[0264]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPG	
AG288A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS	158
AG324A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTP	159
AG360A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP GSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	160
AG396A	GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGT	161
AG432A	GATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP S	162
AG468A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG	163
AG504A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGS GTASSSPGSSTP	164
AG540A	TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSA	165

[0265]

XTEN 名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	STGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	
AG576A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGASPG	166
AG612A	STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSS TGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS	167
AG648A	GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	168
AG684A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTA SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPG	169
AG720A	TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPG	170
AG756A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS	171

[0266]

XTEN名称	氨基酸序列	SEQ ID NO:
	SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPG	
AG792A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPG	172
AG828A	TSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSS TGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAST GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP	173
AG288_DE	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	1699

[0267] 在其它实施方案中,CFXTEN组合物包含一个或多个长度在约36至约3000个氨基酸残基的范围内的非重复XTEN序列,其中所述序列的至少约80%、或至少约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%至约100%由非重叠36个氨基酸的序列基序组成,所述基序选自表13-17的一个或多个多肽序列,呈家族序列形式,或其中基序选自两个或更多个基序家族。

[0268] 在CFXTEN融合蛋白的XTEN组分的小于100%的氨基酸由4、5或6种类型的选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成,或小于100%序列由来自表3的序列基序或表4和13-17的XTEN序列组成的那些实施方案中,XTEN的其它氨基酸残基选自任何其它14种天然L-氨基酸,但优先选自亲水性氨基酸以使XTEN序列含有至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%亲水性氨基酸。不是甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的XTEN氨基酸分散在整个XTEN序列中,位于序列基序内或之间,或集中在XTEN序列的一个或多个短链段中例如以在XTEN组分与FVIII组分之间产生接头。在CFXTEN的XTEN组分包含除甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)以外的氨基酸的所述情况

下,优选的是小于约2%或小于约1%氨基酸是疏水性残基以使所得序列通常缺乏二级结构,例如不具有超过2%α螺旋或2%β折叠,如通过本文公开的方法所确定。在构建XTEN时有利性较小的疏水性残基包括色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和甲硫氨酸。另外,可设计XTEN序列以含有小于5%或小于4%或小于3%或小于2%或小于1%或不含有以下氨基酸:半胱氨酸(以避免形成二硫化物和氧化)、甲硫氨酸(以避免氧化)、天冬酰胺和谷氨酰胺(以避免脱酰胺)。因此,在一些实施方案中,CFXTEN融合蛋白的除甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)之外也包含其它氨基酸的XTEN组分具有促成α螺旋和β折叠的残基小于5%(如通过Chou-Fasman算法所测量)的序列且具有至少90%、或至少约95%或95%以上无规卷曲形成率(如通过GOR算法所测量)。

[0269] 3.序列的长度

[0270] 在另一方面,本发明提供用于并入CFXTEN组合物中的具有不同长度的XTEN,其中基于待在融合蛋白中实现的性质或功能选择XTEN序列的长度。视预定性质或功能而定,CFXTEN组合物包含位于FVIII序列内部或FVIII结构域之间的短长度或中等长度XTEN和/或位于如本文所述的融合蛋白中的可充当载体的较长XTEN序列。尽管不意图具有限制性,但XTEN或XTEN的片段包括具有约6至约99个氨基酸残基的短区段、约100至约399个氨基酸残基的中等长度、和约400至约1000且多达约3000个氨基酸残基的较长长度。因此,用于并入主题CFXTEN中的XTEN涵盖长度是约6、或约12、或约36、或约40、或约42、或约72或约96、或约144、或约288、或约400、或约500、或约576、或约600、或约700、或约800、或约864、或约900、或约1000、或约1500、或约2000、或约2500、或多达约3000个氨基酸残基的XTEN或XTEN的片段。或者,XTEN序列的长度可为约6至约50、约50至约100、约100至150、约150至250、约250至400、约400至约500、约500至约900、约900至1500、约1500至2000、或约2000至约3000个氨基酸残基。并入主题CFXTEN中的XTEN的准确长度可变化而不不利地影响CFXTEN组合物的活性。在一个实施方案中,用于本文公开的CFXTEN中的一个或多个XTEN的长度是36个氨基酸、42个氨基酸、144个氨基酸、288个氨基酸、576个氨基酸或864个氨基酸且可选自一个XTEN家族序列;即AD、AE、AF、AG、AM、AQ、BC或BD。在另一实施方案中,用于本文公开的CFXTEN中的两个或更多个XTEN的长度是36个氨基酸、42个氨基酸、144个氨基酸、288个氨基酸、576个氨基酸或864个氨基酸且可选自两个XTEN家族序列;即AD、AE、AF、AG、AM、AQ、BC或BD,其中AE和AG家族序列的组合是优选的。在一些实施方案中,包含一个或多个本文使用的XTEN的CFXTEN含有选自表4中的任一序列的XTEN,其可直接或通过本文公开的间隔子序列连接于FVIII组分。

[0271] 在其中XTEN充当可挠性接头,或插入FVIII序列的外部环或无序区域中以增加区域的体积、可挠性或亲水性,或被设计来干扰FVIII的清除受体以增强药代动力学性质,或干扰FVIII抑制剂的结合或其它抗FVIII抗体,或其中短长度或中等长度的XTEN用于促进组织渗透或改变CFXTEN融合蛋白与它的靶标的相互作用的强度,或其中合乎需要的是在FVIII序列内的多个位置处在短长度或中等长度的区段中分布XTEN的累积长度的特定CFXTEN构型设计中,本发明涵盖一个、两个、三个、四个、五个或更多个短或中等XTEN序列插入在一个或多个FVIII结构域之间或内或插入在外部环内,或插入在FVIII序列中的其它位点处的CFXTEN组合物,所述其它位点如但不限于在或邻近于表5、表6、表7、表8和表9中鉴定或如图8-9中说明的插入位点处的位置。在一个前述实施方案中,CFXTEN融合蛋白含有多个

XTEN区段,例如至少两个、或至少三个、或至少四个、或至少五个或更多XTEN区段,其中所述XTEN区段可相同或它们可不同且其中当通过本文公开的一种测定加以测定时,CFXTEN保留天然FVIII的至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％或更多的促凝血活性。在其中XTEN充当载体以增加融合蛋白的体积,或改变CFXTEN融合蛋白与它的靶标的相互作用的强度,或增强融合蛋白的药代动力学性质的其它特定CFXTEN构型设计中,本发明涵盖一个或多个中等长度或较长长度XTEN序列插入在C末端处、B结构域(或BDD序列的残余物)内、一个或多个FVIII结构域之间或内、外部环内、或FVIII序列中的其它位点处的CFXTEN组合物,所述其它位点如但不限于表5、表6、表7、表8和表9中鉴定或如图8-9中说明的插入位点。然而,据信将多个短长度至中等长度的XTEN并入CFXTEN组合物中会对融合蛋白赋予相较于在较少但较长长度XTEN中具有相同数目的氨基酸的CFXTEN融合蛋白增强的性质,但仍然产生具有促凝血活性和延长的半衰期的组合物;其基本原理在本文中关于多个XTEN的获得半径加以详述。

[0272] 在其中CFXTEN融合蛋白包含多个XTEN序列的实施方案中,XTEN序列中总残基的累积长度大于约100至约3000、或约200至约2000、或约400至约1000个氨基酸残基且XTEN可相同或它们可在序列、净电荷或长度方面不同。在包含多个XTEN的CFXTEN的一个实施方案中,当与具有类似长度的序列最优比对时,个别XTEN序列相较于选自表3、4和13-17的基序或XTEN或其片段各自展现至少约80％序列同一性,或者81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％序列同一性。

[0273] 如以下更充分所述,公开以下各方法:其中CFXTEN是通过选择XTEN的长度和它在CFXTEN内的并入位点来设计以赋予CFXTEN融合蛋白的靶标半衰期、促凝血活性的保持、与FVIII抑制剂的结合降低或物理化学性质(例如,稳定性或溶解度)增强;产生并表达编码构建体;以及分离并回收重组CFXTEN融合蛋白。一般来说,相较于较短累积长度,例如短于约280个残基,累积长度长于约400个残基的XTEN并入CFXTEN组合物中导致半衰期较长。在一个实施方案中,涵盖包含具有长序列长度至少约400、或至少约600、或至少约800、或至少约900、或至少约1000个或更多个氨基酸的至少单一XTEN作为载体的CFXTEN融合蛋白设计。在另一实施方案中,将多个XTEN并入融合蛋白中以实现累积长度至少约400、或至少约600、或至少约800、或至少约900、或至少约1000个或更多个氨基酸,其中XTEN可相同或它们可在序列或长度方面不同。如本文所用,当超过一个XTEN并入CFXTEN融合蛋白中时,“累积长度”意图涵盖以氨基酸残基数计的总长度。两个前述实施方案被设计来在向受试者施用之后赋予相较于包含较短累积XTEN长度的CFXTEN增加的生物可用度和/或增加的终末半衰期,但仍然产生促凝血活性和止血作用。当皮下或肌肉内施用时,相较于类似剂量的具有较短累积长度XTEN的CFXTEN或未连接于XTEN的FVIII,Cmax降低但曲线下面积(AUC)增加,由此有助于能够维持CFXTEN组合物的有效水平持续较长时期且允许在给药之间的时期增加至2、4、7、10、14或21天,如以下更充分所述。因此,除本文所述的其它物理化学性质之外,XTEN对施用的CFXTEN赋予储槽性质。

[0274] 当XTEN用作载体时,本发明利用的是发现增加非重复非结构化多肽的长度会增强XTEN的非结构化性质且相应增强包含XTEN载体的融合蛋白的物理/化学和药代动力学性质。如在实施例中更充分所述,按比例增加XTEN的长度(即使由重复顺序的单一家族序列基

序(例如,表3的四个AE基序)所产生)导致序列相较于较短XTEN长度具有较高无规卷曲形成百分比(例如,90%或更高)(如通过GOR算法所确定)或α螺旋或β折叠的含量降低(例如,小于2%)(如通过Chou-Fasman算法所确定)。此外,如实施例中所述,增加非结构化多肽融合配偶体的长度导致融合蛋白相较于非结构化多肽配偶体具有较短序列长度的融合蛋白,终末半衰期不成比例增加(例如,多达50、100、200小时或200小时以上)。以下更充分描述CFXTEN相较于未连接于XTEN的FVIII增强的药代动力学性质。

[0275] 在另一方面,本发明提供用以自较长"供体"XTEN序列产生短长度或中等长度的XTEN的方法,其中较长供体XTEN序列在N末端或C末端处被截短,或自供体序列的内部产生片段,由此导致短长度或中等长度XTEN。在非限制性实例中,如图16A-C中所示意性描绘,可截短864个氨基酸残基的AG序列以产生具有144个残基的AG序列、具有288个残基的AG序列、具有576个残基的AG序列或其它中等长度,而可截短864个残基的AE序列(如图16D、E中所描绘)以产生多个144个残基的AE序列、具有288或576个残基的AE序列或其它较短或中等长度。明确涵盖的是所述方法可与本文所述的任何XTEN实施方案一起或与表4或13-17中所列的任何序列一起用于产生所需长度的XTEN。在优选实施方案中,包含多个XTEN的CFXTEN具有与选自AE42_1、AE42_2、AE42_3、AG42_1、AG42_2、AG42_3、AG42_4、AE144_1A、AE144_2A、AE144_2B、AE144_3A、AE144_3B、AE144_4A、AE144_4B、AE144_5A、AE144_6B、AG144_1、AG144_2、AG144_A、AG144_B、AG144_C、AG144_F、AG144_3、AG144_4、AE288_1、AE288_2、AG288_1、AG288_2和AG288_DE的序列展现至少约80%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%、或100%序列同一性的XTEN。

[0276] 4.净电荷

[0277] 在其它实施方案中,XTEN多肽的非结构化特征可通过并入具有净电荷的氨基酸残基和/或降低疏水性氨基酸在XTEN序列中的总体百分比(例如小于5%或4%或3%或2%或1%)来增强。总体净电荷和净电荷密度是通过修改XTEN序列中带正电荷或负电荷氨基酸的含量来控制,其中净电荷通常表示为除由具有相反电荷的残基抵消的那些残基之外,多肽中促成带电荷状态的氨基酸的百分比。在一些实施方案中,组合物的XTEN的净电荷密度可高于+0.1或低于-0.1电荷/残基。就本文蛋白质或肽的"净电荷密度"而言,其是指净电荷除以蛋白质或肽原中的氨基酸总数。在其它实施方案中,XTEN的净电荷可为约0%、约1%、约2%、约3%、约4%、约5%、约6%、约7%、约8%、约9%、约10%约11%、约12%、约13%、约14%、约15%、约16%、约17%、约18%、约19%、或约20%或更多。基于净电荷,一些XTEN具有等电点(pI)1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0或甚至6.5。在优选实施方案中,XTEN将具有在1.5与4.5之间的等电点且在生理条件下携带净负电荷。

[0278] 因为人或动物中的大多数组织和表面具有净负电荷,所以在一些实施方案中,XTEN序列被设计来具有净负电荷以使含有XTEN的组合物与如血管、健康组织或各种受体的各种表面之间的非特异性相互作用最小。在不受特定理论束缚下,由于XTEN多肽的个别地携带净负电荷且跨越XTEN多肽的序列分布的个别氨基酸之间的静电排斥,XTEN可采用开放构象。在一些实施方案中,设计至少90%或95%带电荷残基由如丝氨酸、丙氨酸、苏氨酸、脯氨酸或甘氨酸的其它残基分隔的XTEN序列,此导致电荷更均一分布,表达或纯化特性更好。净负电荷在延长序列长度的XTEN中的所述分布可产生非结构化构象,其又可导致流体动力

学半径有效增加。在优选实施方案中,主题XTEN的负电荷是通过并入谷氨酸残基来赋予。通常,谷氨酸残基跨越XTEN序列被均一间隔。在一些情况下,XTEN中每20kDaXTEN可含有约10-80、或约15-60、或约20-50个谷氨酸残基,其可导致XTEN具有将具有极类似pKa的带电荷残基,此可增加产物的电荷均质性且使它的等电点尖锐,增强所得CFXTEN融合蛋白的物理化学性质,且因此简化纯化程序。举例来说,当需要具有负电荷的XTEN时,XTEN可仅选自由于并入的谷氨酸而具有约17%净电荷的AE家族序列,或可包括不同比例的表3的含谷氨酸基序以提供所需净电荷程度。AE XTEN的非限制性实例包括但不限于表4和14的36、42、144、288、576、624、864和912AE家族序列或其片段。在一个实施方案中,表4或13-17的XTEN序列可被修饰来包括其它谷氨酸残基以实现所需净负电荷。因此,在一个实施方案中,本发明提供XTEN,其中XTEN序列含有约1%、2%、4%、8%、10%、15%、17%、20%、25%或甚至约30%谷氨酸。在一个实施方案中,除谷氨酸之外,本发明也涵盖将多达5%天冬氨酸残基并入XTEN中以实现净负电荷。

[0279] 在不需要净电荷的其它实施方案中,XTEN可选自例如AGXTEN组分,如表3的AG基序或表3的不具有净电荷的那些AM基序。AG XTEN的非限制性实例包括但不限于表4和16的36、42、144、288、576和864AG家族序列或其片段。在另一实施方案中,XTEN可包含不同比例的AE和AG基序以具有视为针对给定用途而言最优的净电荷或维持给定物理化学性质。

[0280] 在不受特定理论束缚下,预期CFXTEN组合物的具有较高净电荷的XTEN与如血管、组织或各种受体的各种带负电荷表面的非特异性相互作用较小,此将进一步有助于主动清除降低。相反,据信CFXTEN组合物的具有低净电荷(或不具有净电荷)的XTEN将与表面具有较高程度的相互作用,鉴于细胞(例如,血小板)和血管表面对凝血过程和凝血因子活化强度的已知作用,此可加强相关凝血因子的活性(Zhou,R.等,Biomaterials(2005)26(16):2965-2973;London,F.等Biochemistry(2000)39(32):9850-9858)。

[0281] 本发明的组合物的XTEN通常不具有带正电荷氨基酸或具有低含量的带正电荷氨基酸。在一些实施方案中,XTEN可具有小于约10%具有正电荷的氨基酸残基、或小于约7%、或小于约5%、或小于约2%、或小于约1%具有正电荷的氨基酸残基。然而,本发明涵盖其中将有限数目的具有正电荷的氨基酸(如赖氨酸)并入XTEN中以允许赖氨酸的ε胺与肽上的反应性基团、接头桥、或待缀合于XTEN骨架的药物或小分子上的反应性基团之间缀合的构建体。在一个前述实施方案中,主题CFXTEN的XTEN具有约1个至约100个之间的赖氨酸残基、或约1至约70个赖氨酸残基、或约1至约50个赖氨酸残基、或约1至约30个赖氨酸残基、或约1至约20个赖氨酸残基、或约1至约10个赖氨酸残基、或约1至约5个赖氨酸残基、或者仅单一赖氨酸残基。使用前述含赖氨酸的XTEN,可构建包含XTEN、FVIII凝血因子加适用于治疗凝血病变病状的化学治疗剂或其它凝血因子或辅因子的融合蛋白,其中并入XTEN组分中的药剂的最大分子数目是根据并入XTEN中的赖氨酸或具有反应性侧链的其它氨基酸(例如,半胱氨酸)的数目来确定。

[0282] 因为疏水性氨基酸对多肽赋予结构,所以本发明规定XTEN中的疏水性氨基酸的含量将通常小于5%、或小于2%、或小于1%疏水性氨基酸含量。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白的XTEN组分中的甲硫氨酸和色氨酸的氨基酸含量通常小于5%、或小于2%、且最优选小于1%。在另一实施方案中,主题CFXTEN组合物的XTEN将具有以下序列,所述序列具有小于10%具有正电荷的氨基酸残基、或小于约7%、或小于约5%、或小于约2%具有正电荷

的氨基酸残基,甲硫氨酸和色氨酸残基的总和将小于2%,且天冬酰胺和谷氨酰胺残基的总和将小于总XTEN序列的5%。

[0283] 5.低免疫原性

[0284] 在另一方面,本文提供的XTEN序列具有低程度的免疫原性或大致上是非免疫原性的。若干因素可促成XTEN的低免疫原性,例如非重复序列、非结构化构象、高度溶解性、低程度自聚集或缺乏自聚集、序列内低程度蛋白水解位点或缺乏蛋白水解位点、以及XTEN序列中低程度表位或缺乏表位。

[0285] 构象表位是由蛋白质表面的主要由蛋白质抗原的多个不连续氨基酸序列组成的区域所形成。蛋白质的准确折叠使这些序列呈可由宿主体液免疫系统识别为“外来物”的明确稳定空间构型或表位,从而导致产生针对蛋白质的抗体或活化细胞介导的免疫反应。在后述情况下,个体中对蛋白质的免疫反应深受随那个个体的HLA-DR异型的肽结合特异性而变的T细胞表位识别影响。MHC II类肽复合物由T细胞的表面上的同源T细胞受体啮合连同如CD4分子的某些其它共受体的交叉结合一起可诱导T细胞内的活化状态。活化导致细胞因子释放,从而进一步活化如B细胞的其它淋巴细胞以产生抗体或活化T杀伤细胞作为完全细胞免疫反应。

[0286] 肽结合给定MHC II类分子以在APC(抗原递呈细胞)表面上递呈的能力取决于许多因素;最显著取决于它的一级序列。在一个实施方案中,较低程度的免疫原性是通过设计抵抗抗原递呈细胞中的抗原加工的XTEN序列,和/或选择不充分结合MHC受体的序列来实现。本发明提供具有大致上非重复XTEN多肽的CFXTEN融合蛋白,所述XTEN多肽被设计来降低与MHC II受体的结合,以及避免形成T细胞受体或抗体结合的表位,从而产生低程度的免疫原性。免疫原性的避免可至少部分归因于XTEN序列的构象可挠性的结果,即由于氨基酸残基的选择和顺序而缺乏二级结构。举例来说,特别感兴趣的是在水溶液中或在可产生构象表位的生理条件下采用紧密折叠构象的倾向较低的序列。使用常规治疗规范和给药施用包含XTEN的融合蛋白将通常不导致形成针对XTEN序列的中和抗体,且也降低CFXTEN组合物中FVIII融合配偶体的免疫原性。

[0287] 在一个实施方案中,主题融合蛋白中利用的XTEN序列可大致上不含由人T细胞识别的表位。先前已公开出于产生免疫原性较小的蛋白质的目的消除所述表位;参见例如WO98/52976、WO 02/079232和WO 00/3317,其以引用的方式并入本文。已描述针对人T细胞表位的测定(Stickler,M.等(2003)J Immunol Methods,281:95-108)。特别感兴趣的是可加以寡聚化而不产生T细胞表位或非人序列的肽序列。这是通过以下方式来实现:测试同向重复的这些序列中存在T细胞表位以及出现不是人序列的6至15-mer,且具体来说9-mer序列,且接着改变XTEN序列的设计以消除或破坏表位序列。在一些实施方案中,通过限制XTEN的预测会结合MHC受体的表位的数目,XTEN序列大致上是非免疫原性的。随着能够结合MHC受体的表位的数目降低,存在T细胞活化潜力以及T辅助细胞功能相伴降低、B细胞活化或上调降低以及抗体产生降低。可通过例如像TEPITOPE(Sturniolo,T.等(1999)Nat Biotechnol,17:555-61)的表位预测算法确定预测的T细胞表位的低程度,如实施例46中所示。蛋白质内给定肽框的TEPITOPE计分是那个肽框结合多个最常见人MHC等位基因的Kd(解离常数、亲和力、解离速率)的对数,如Sturniolo,T.等(1999)Nature Biotechnology17:555中所公开。计分历经至少20个对数在约10至约-10(对应于结合约束$10e^{10}K_d$至$10e^{-10}K_d$)

的范围内,且可通过避免在肽于MHC上展示期间充当锚定残基的疏水性氨基酸(如M、I、L、V、F)来降低。在一些实施方案中,在TEPITOPE阈值计分约-5或-6或-7或-8或-9下,或在TEPITOPE计分-10下,并入CFXTEN中的XTEN组分不具有预测的T细胞表位。如本文所用,计分"-9"是比计分-5更严格的TEPITOPE阈值。

[0288] 在另一实施方案中,通过限制来自XTEN的序列的已知蛋白水解位点,从而降低将XTEN加工成可结合MHC II受体的小肽来致使本发明XTEN序列(包括并入主题CFXTEN融合蛋白中的那些)大致上是非免疫原性的。在另一实施方案中,通过使用大致上缺乏二级结构,从而由于结构的熵较高而赋予对许多蛋白酶的抗性的序列来致使XTEN序列大致上是非免疫原性的。因此,TEPITOPE计分降低以及自XTEN消除已知蛋白水解位点致使包括CFXTEN融合蛋白组合物的XTEN的XTEN组合物大致上不能由哺乳动物受体(包括免疫系统的那些受体或靶向FVIII的活性清除受体)所结合。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白的XTEN结合哺乳动物受体的K_d可>100nM,或K_d大于500nM,或对哺乳动物细胞表面受体或循环多肽受体的K_d大于1μM。

[0289] 另外,XTEN的非重复序列和相应缺乏表位限制B细胞结合XTEN或由XTEN活化的能力。重复序列被识别且可与甚至少许B细胞形成多价接触,且由于多个T细胞非依赖性受体的交联,可刺激B细胞增殖和抗体产生。相反,尽管XTEN可在它的延伸序列上与许多不同B细胞接触,但由于序列缺乏重复性,各个别B细胞仅可与个别XTEN接触一次或少数几次。在不受任何理论束缚下,XTEN刺激B细胞增殖以及因此刺激免疫反应的倾向通常低得多。在一个实施方案中,CFXTEN相较于未融合于XTEN的相应FVIII具有降低的免疫原性。在一个实施方案中,向哺乳动物施用多达三次胃肠外剂量的CFXTEN产生在血清稀释度1:100下可检测但在稀释度1:1000下不可检测的抗CFXTEN IgG。在另一实施方案中,向哺乳动物施用多达三次胃肠外剂量的CFXTEN产生在血清稀释度1:100下可检测但在稀释度1:1000下不可检测的抗FVIII IgG。在另一实施方案中,向哺乳动物施用多达三次胃肠外剂量的CFXTEN产生在血清稀释度1:100下可检测但在稀释度1:1000下不可检测的抗XTEN IgG。在前述实施方案中,哺乳动物可为小鼠、大鼠、兔或食蟹猕猴。

[0290] 相对于具有高度重复性的序列,具有非重复序列的XTEN的另一特征是非重复XTEN与抗体形成较弱接触。抗体是多价分子。举例来说,IgG具有两个相同结合位点且IgM含有10个相同结合位点。因此,针对重复序列的抗体可以高亲合力与所述重复序列形成多价接触,此可影响所述重复序列的效能和/或消除。相反,针对非重复XTEN的抗体可产生单价相互作用,从而导致免疫清除的可能性较小,以致CFXTEN组合物可在循环中保持的时期增加。此外,据信如图6中所示意性描绘,XTEN的可挠性非结构化性质提供邻近于XTEN插入位点的FVIII区域的空间遮蔽且提供针对由FVIII抑制剂结合的空间位阻。

[0291] 在另一方面,适用作融合配偶体的主题XTEN具有高流体动力学半径;这是一种在一些实施方案中对并有XTEN的CFXTEN融合蛋白赋予表观分子量相应增加,而在其它实施方案中增强针对FVIII抑制剂和抗FVIII抗体的空间位阻,从而降低它们结合CFXTEN的能力的性质。如实施例26中所详述,XTEN连接于治疗性蛋白质序列导致CFXTEN组合物相较于未连接于XTEN的治疗性蛋白质可具有增加的流体动力学半径、增加的表观分子量和增加的表观分子量因子。举例来说,在需要半衰期延长的治疗剂应用中,其中具有高流体动力学半径的XTEN并入包含治疗性蛋白质的融合蛋白中的组合物可使组合物的流体动力学半径有效增

大超出约3-5nm的肾小球孔尺寸(对应于表观分子量约70kDa)(Caliceti.2003.Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates.Adv Drug Deliv Rev 55:1261-1277),从而导致循环蛋白质的肾清除率降低,伴有终末半衰期相应增加和其它药代动力学性质增强。蛋白质的流体动力学半径是由它的分子量以及由它的结构(包括形状或紧密性)来赋予。在不受特定理论束缚下,由于肽的个别电荷之间的静电排斥或由序列中缺乏赋予二级结构的潜力的特定氨基酸赋予的固有可挠性,XTEN可采用开放构象。相较于具有类似序列长度和/或分子量的具有二级和/或三级结构的多肽(如典型球状蛋白质),XTEN多肽的开放、延伸和非结构化构象可具有更大成比例流体动力学半径。用于测定流体动力学半径的方法在本领域中是熟知的,如通过使用如美国专利号6,406,632和7,294,513中所述的尺寸排阻色谱(SEC)。实施例26证明XTEN长度增加会导致流体动力学半径、表观分子量和/或表观分子量因子成比例增加,且因此允许相对于表观分子量或流体动力学半径的所需截止值定制CFXTEN。因此,在某些实施方案中,可用XTEN构造CFXTEN融合蛋白以使融合蛋白可具有流体动力学半径至少约5nm、或至少约8nm、或至少约10nm、或约12nm、或约15nm、或约20nm或约30nm或更大。在前述实施方案中,由CFXTEN融合蛋白中的XTEN赋予的大流体动力学半径可导致所得融合蛋白的清除率降低、终末半衰期增加以及平均滞留时间增加。

[0292] 通常,成熟形式的FVIII组分的实际分子量是约265kDa,而在FVIII BDD的情况下,实际分子量是约165kDa。视XTEN组分的长度而定,包含FVIII BDD加一个或多个XTEN的CFXTEN融合蛋白的实际分子量在约200至约270kDa的范围内。如实施例中所述,当CFXTEN融合蛋白的分子量是由尺寸排阻色谱分析获得时,由于二级结构的程度较低的XTEN开放构象导致它们所并入的融合蛋白的表观分子量增加。在一些实施方案中,包含FVIII和至少一个或多个XTEN的CFXTEN展现表观分子量至少约400kD、或至少约500kD、或至少约700kD、或至少约1000kD、或至少约1400kD、或至少约1600kD、或至少约1800kD、或至少约2000kD。因此,包含一个或多个XTEN的CFXTEN融合蛋白展现的表观分子量比融合蛋白的实际分子量大约1.3倍、或约2倍、或约3倍或约4倍、或约8倍、或约10倍、或约12倍、或约15倍。在一个实施方案中,本文公开的任何实施方案的分离的CFXTEN融合蛋白展现在生理条件下表观分子量因子大于约1.3、或约2、或约3、或约4、或约5、或约6、或约7、或约8、或约10或大于约15。在另一实施方案中,相对于融合蛋白的实际分子量,CFXTEN融合蛋白在生理条件下具有表观分子量因子约3至约20、或约5至约15、或约8至约12、或约9至约10。据信主题CFXTEN组合物的表观分子量增加会由于各因素的组合而增强融合蛋白的药代动力学性质,所述因素包括主动清除降低、由FVIII抑制剂的结合降低、以及毛细管和静脉出血损失降低。

[0293] IV).CFXTEN组合物

[0294] 本发明提供包含具有连接于一个或多个XTEN序列的因子VIII的融合蛋白的组合物,其中当向受试者中施用时,所述融合蛋白起替换或增大内源性或接触活化的凝血路径中存在的FVIII的量的作用。本发明解决对增加向有需要的受试者外源施用的因子VIII的终末半衰期的长久切身需要。一种增加治疗性蛋白质的循环半衰期的方式是确保所述蛋白质的肾清除率或代谢降低。增加终末半衰期的另一方式是降低治疗性蛋白质的无论由受体、蛋白质的活性代谢或其它内源性机制介导的主动清除。两者均可通过使蛋白质缀合于聚合物来实现,所述聚合物一方面能够对蛋白质赋予增加的分子尺寸(或流体动力学半径)

且因此肾清除率降低,且另一方面干扰蛋白质结合清除受体或有助于代谢或清除的其它蛋白质。因此,本发明的某些目标包括但不限于提供循环或终末半衰期较长的改进FVIII分子,降低FVIII组合物的必要施用次数或频率,相较于天然凝血因子VIII保留至少一部分活性,和/或增强相较于目前可用因子VIII制剂,更高效、更有效、更经济和/或以更大安全性治疗凝血缺乏症和出血不受控制的能力。

[0295] 因此,本发明提供包含共价连接于一个或多个延伸重组多肽("XTEN")的FVIII,从而产生CFXTEN融合蛋白组合物的重组因子VIII融合蛋白组合物。如本文所用的术语"CFXTEN"意图涵盖包含至少一个有效负载区域和至少一个其它区域的融合多肽,所述至少一个有效负载区域包含能够具有与FVIII凝血因子相关的促凝血活性的FVIII或FVIII的一部分,所述至少一个其它区域包含一个或多个可分散在所述有效负载区域内和/或连接于末端的XTEN多肽。在一个实施方案中,FVIII是天然FVIII。在另一实施方案中,FVIII是天然序列的保留天然FVIII的至少一部分促凝血活性的序列变体、片段、同源物或模拟物,如本文所公开。适于包括在组合物中的FVIII的非限制性实例包括表1的序列或与表1的序列具有至少80%、或至少90%、或至少91%、或至少92%、或至少93%、或至少94%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%序列同一性的序列。在一优选实施方案中,FVIII是B结构域缺失的(BDD)FVIII序列变体,如来自表1的那些BDD序列或本领域中已知的其它所述序列。在另一优选实施方案中,CFXTEN包含B结构域缺失的(BDD)表达有天然19个氨基酸的信号序列的FVIII序列变体,所述信号序列在蛋白质成熟期间被裂解。

[0296] 本发明的组合物包括当向有需要的受试者施用时适用于介导或预防或改善与因子VIII缺乏或内源性产生的FVIII中的缺陷相关的病状、或与创伤、手术、因子VIII缺乏或缺陷相关的出血病症的融合蛋白。特别感兴趣的是寻求相较于天然FVIII,其药代动力学参数增加、溶解度增加、稳定性增加或一些其它医药性质增强,或增加其终末半衰期将改进功效、安全性,或导致给药频率降低和/或改进患者管理的CFXTEN融合蛋白组合物。本文公开的实施方案的CFXTEN融合蛋白展现如本文详述的改进性质和/或实施方案的一者或多者或任何组合。在一些实施方案中,当相较于未连接于XTEN且以类似剂量向有需要的受试者(例如,患有甲型血友病的受试者,如人或小鼠或猴)施用的FVIII时,CFXTEN融合组合物当向受试者施用时保持水平高于阈值至少0.01-0.05、或0.05至0.1、或0.1至0.4IU/ml持续更长时期。

[0297] 主题组合物的FVIII(特别是表1中公开的那些)连同它们的相应核酸和氨基酸序列一起可在公开数据库中以及在专利和一次文献中获得,所述数公开据库如化学文摘服务数据库(例如CAS登记)、GenBank、全球蛋白质资源(UniProt)、订阅提供的数据库,如GenSeq(例如Derwent)。可适用于表达主题CFXTEN序列的多核苷酸序列可为编码给定FVIII(例如,全长或成熟)的野生型多核苷酸序列,或在一些情况下,序列可为野生型多核苷酸序列的变体(例如,编码野生型生物活性蛋白质的多核苷酸,其中所述多核苷酸的DNA序列已例如针对在特定物种中的表达加以优化;或编码野生型蛋白质的变体(如定点突变体或等位基因变体)的多核苷酸)。完全属于熟练技术人员的能力的是利用本领域中已知的方法和/或连同本文提供且在实施例中更充分描述的指导和方法一起,使用FVIII的野生型或共有cDNA序列或密码子优化变体来产生由本发明涵盖的CFXTEN构建体。

[0298] 在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含连接于包括但不限于如表4中阐述的AE

或AG家族的具有42、144、288、576或864个氨基酸的序列的单一XTEN(例如,如上所述的XTEN)的单一FVIII分子,所述FVIII分子展现与表1的序列的至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性。在另一实施方案中,CFXTEN包含连接于两个XTEN的单一FVIII,其中所述XTEN可相同或它们可不同。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含连接于一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个XTEN序列的单一FVIII分子,其中所述FVIII是当最优比对时,相较于选自表1的蛋白质序列,具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性的序列,且当最优比对时,相较于选自表3、4和13-17的任一者的一个或多个序列,所述一个或多个XTEN各自具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性。在其中CFXTEN具有两个或更多个XTEN的前述实施方案中,XTEN可相同或它们可为不同序列。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含单一FVIII,当最优比对时,相较于选自表1的具有类似长度的序列,所述FVIII展现至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性,其中各部分与三个、四个、五个、六个或更多个XTEN序列交替分散且由所述XTEN序列连接,所述XTEN序列可相同或可不同且其中当最优比对时,相较于选自表3、4和13-17的任一者的序列或其片段,各自具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性。在另一实施方案中,本发明提供一种CFXTEN融合蛋白,其包含当最优比对时,与来自表21的序列具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或至少约99%、或100%序列同一性的序列。

[0299] 1.CFXTEN融合蛋白构型

[0300] 本发明提供具有以特定N末端至C末端构型连接的CF和XTEN组分的CFXTEN融合蛋白组合物。

[0301] 在CFXTEN组合物的一个实施方案中,本发明提供一种式I的融合蛋白:

[0302] $(XTEN)_x$-CF-$(XTEN)_y$ I

[0303] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与来自表1的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。因此,CFXTEN融合组合物可具有XTEN-CF、XTEN-CF-XTEN或CF-XTEN构型。

[0304] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式II的融合蛋白:

[0305] $(XTEN)_x$-$(S)_x$-(CF)-$(XTEN)_y$ II

[0306] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与表1中阐述的序列

具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。

[0307] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种重组因子VIII融合蛋白,其中所述融合蛋白具有式III:

[0308] $(XTEN)_x$-(S)$_x$-(CF)-(S)$_y$-$(XTEN)_y$ III

[0309] 其中就各次出现独立而言,CF是如本文定义的因子VIII,包括与表1中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;x是0或1且y是0或1,其中x+y≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。

[0310] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式IV的重组因子VIII融合蛋白:

[0311] (A1)-$(XTEN)_u$-A2)-$(XTEN)_v$-(B)-$(XTEN)_w$-(A3)-XTEN)$_x$-(C1)-$(XTEN)_y$-(C2)-$(XTEN)_z$

[0312] IV

[0313] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;B是FVIII的B结构域,其可为所述B结构域的片段或剪接变体;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;v是0或1;w是0或1;x是0或1;y是0或1;y是0或1,前提是u+v+x+y+z≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。

[0314] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式V的重组因子VIII融合蛋白:

[0315] $(XTEN)_1$-(S)$_1$-(A1)-(S)$_b$-$(XTEN)_u$-(S)$_b$-(A2)-(S)$_c$-$(XTEN)_v$-(S)$_c$-(B)-(S)$_a$-$(XTEN)_w$-(S)$_d$-(A3)-(S)$_e$-$(XTEN)_x$-(S)$_e$-(C1)-(S)$_1$-$(XTEN)_y$-(S)$_f$-(C2)-(S)$_g$-$(XTEN)_z$ V

[0316] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;B是FVIII的B结构域,其可为所述B结构域的片段或剪接变体;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;g是0或1;t是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是t+u+v+w+x+y+z≥1;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约96％、或至少约97％、或至少约98％、或至少约99％或100％序列同一性的序列。在式V的另一实施方案中,

间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0317] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VI的重组因子VIII融合蛋白:

[0318] $(XTEN)_u-(S)_a-(A1)-(S)_b-(XTEN)_y-(S)_b-(A2)-(S)_c-(XTEN)_w-(S)_c-(A3)-(S)_d-(XTEN)_x-(S)_d-(C1)-(S)_e-(XTEN)_y-(S)_e-(C2)-(S)_f-(XTEN)_z$ VI

[0319] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;A3是FVIII的A3结构域;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是$u+v+w+x+y+z\geq 1$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0320] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VII的重组因子VIII融合蛋白:

[0321] $(SP)-(XTEN)_x-(CS)_x-(S)_x-(FVIII_1-745)-(S)_y-(XTEN)_y-(S)_y-(FVIII_1635-2332)-(S)_z-(CS)t-(XTEN)_x$ VII

[0322] 其中就各次出现独立而言,SP是信号肽,优选具有序列MQIELSTCFFLCLLRFCFS(SEQ ID NO:1611),CS是表12中所列的裂解序列,S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的氨基酸的间隔子序列,“FVIII 1-745”是因子FVIII的残基1-745且“FVIII_1635-2332”是FVIII的残基1635-2332,x是0或1,y是0或1,且z是0或1,其中$x+y+z>2$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。在式VII的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0323] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式VIII的重组因子VIII融合蛋白:

[0324] $(A1)-(S)_a-(XTEN)_v-(S)_a-(A2)-(B1)-(S)_b-(XTEN)_w-(S)_b-(B2)-(A3)-(S)_e-(XTEN)_x-(S)_c-(C1)-(S)_u-(XTEN)_y-(S)_d-(C2)-(S)_e-(XTEN)_z$ VIII

[0325] 其中就各次出现独立而言,A1是FVIII的A1结构域;A2是FVIII的A2结构域;B1是B结构域的可具有FVIII的残基741至743-750或者FVIII的约残基741至约残基745的片段;B2是B结构域的可具有FVIII的残基1635-1686至1689或者FVIII的约残基1640至约残基1689的片段;A3是FVIII的A3结构域;C1是FVIII的C1结构域;C2是FVIII的C2结构域;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是$u+v+w+x+y+z\geq 1$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列。在式

VIII的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式V的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0326] 在CFXTEN组合物的另一实施方案中,本发明提供一种式IX的重组因子VIII融合蛋白:

[0327] $(A1_N)-(S)_a-(XTEN)_t-S)_b-(A1_C)-(A2_N)-(S)_c-(XTEN)_u-(S)_d-(A2_C)-(B_N)-(S)_e-(XTEN)_v-(S)_f-(B_C)-(A3_N)-(S)_g-(XTEN)_w-(S)_b-(A3_C)-(C1_N)-(S)_i-(XTEN)_x-(S)_j-(C1_C)-(C2_N)-(S)_k-(XTEN)_y-(S)_l-(C2_C)-(S)_m-(XTEN)_x$

[0328] IX

[0329] 其中就各次出现独立而言,$A1_N$是A1结构域的自至少残基编号1(相对于天然成熟FVIII加以编号)至至多残基编号371的片段,$A1_c$是A1结构域的自至少残基编号2至至多残基编号372的片段;$A2_N$是A2结构域的自至少残基编号373至至多残基编号739的片段,$A2_c$是A2结构域的自至少残基编号374至至多残基编号740的片段;B_N是B结构域的自至少残基编号741至至多残基编号1647的片段,B_c是B结构域的自至少残基编号742至至多残基编号1648的片段;$A3_N$是A3结构域的自至少残基编号1649至至多残基编号2019的片段,$A3_c$是A3结构域的自至少残基编号1650至至多残基编号2019的片段;$C1_N$是C1结构域的自至少残基编号2020至至多残基编号2171的片段,$C1_c$是C1结构域的自至少残基编号2021至至多残基编号2172的片段;$C2_N$是C2结构域的自至少残基编号2173至至多残基编号2331的片段,$C2_c$是C2结构域的自至少残基编号2174至至多残基编号2332的片段;S是具有1个至约50个之间的氨基酸残基的可任选包括可与限制位点相容的裂解序列或氨基酸的间隔子序列;a是0或1;b是0或1;c是0或1;d是0或1;e是0或1;f是0或1;g是0或1;h是0或1;i是0或1;j是0或1;k是0或1;l是0或1;m是0或1;t是0或1;u是0或1;v是0或1;w是0或1,x是0或1;y是0或1;z是0或1,前提是$t+u+v+w+x+y+z\geq 1$;且XTEN是如本文所述的延伸重组多肽,包括但不限于与表4中阐述的序列具有至少90%同一性的序列。在式IX的一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在式IX的另一实施方案中,间隔子序列是甘氨酸或选自表11和12的序列。

[0330] 式IV-VIII的实施方案涵盖以下CFXTEN构型:其中一个或多个长度在约6个氨基酸至≥1000个氨基酸的范围内的XTEN(例如,选自表3、4和13-17的任一者的序列或其片段、或展现与其的至少约90-99%或更高序列同一性的序列)插入并连接在因子VIII的邻接结构域之间或连接于FVIII的N末端或C末端。在式V-VIII的其它实施方案中,本发明进一步提供以下构型:其中XTEN通过可任选包含可与限制位点相容的氨基酸或可包括裂解序列(例如,以下更充分描述的表11和12的序列)的间隔子序列连接于FVIII结构域以使XTEN编码序列(在限制位点的情况下)可整合入CFXTEN构建体中,且在裂解序列的情况下,XTEN可在适于所述裂解序列的蛋白酶作用下自融合蛋白释放。

[0331] 式VI-VIII的实施方案不同于式V的那些实施方案,因为式VI-VIII的FVIII组分仅是因子VIII的保留B结构域的短残余序列的B结构域缺失形式(“FVIII BDD”),其序列的非限制性实例提供于表1中,其中一个或多个长度在约6个氨基酸至≥1000个氨基酸的范围内的XTEN或XTEN的片段(例如,选自表3、4和13-17的任一者的序列)插入并连接在因子VIII的邻接结构域之间和/或在B结构域残基的剩余物(如表8的那些)之间。式IX的实施方案通常不同于其它式的那些实施方案,因为一个或多个XTEN各自插入在FVIII的结构域内而非在结构域之间,和/或具有连接于FVIII的C末端(或通过间隔子序列连接于FVIII的C末端)的

XTEN。

[0332] 在CFXTEN的一些实施方案中,融合蛋白包含FVIII的B结构域缺失形式,其中关于全长人因子VIII序列,所述B结构域缺失自在约氨基酸残基编号745处的第一位置开始且在于氨基酸残基编号1635至约1690处的第二位置处结束,且XTEN连接B结构域缺失的第一位置和第二位置。在一个前述实施方案中,B结构域缺失的第一位置和第二位置选自表8的位置。在另一前述实施方案中,至少一个XTEN连接第一和第二位置,其中所述至少一个XTEN连接因子VIII氨基酸残基745和氨基酸残基1640、或氨基酸残基741和氨基酸残基1640、或氨基酸残基741和氨基酸残基1690、或氨基酸残基745和氨基酸残基1667、或氨基酸残基745和氨基酸残基1657、或氨基酸残基745和氨基酸残基1657、或氨基酸残基747和氨基酸残基1642、或氨基酸残基751和氨基酸残基1667。在CFXTEN的一个实施方案中,其中因子VIII包含连接在这个段落的实施方案中所述的B结构域缺失的第一位置和第二位置的XTEN,所述XTEN是当最优比对时,相较于选自表4、表13、表14、表15、表16和表17的任一者的具有类似长度的序列,具有至少80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的序列,其中所述CFXTEN保留天然FVIII的至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%促凝血活性。

[0333] 本发明涵盖XTEN插入在FVIII的结构域之间或内或在或邻近于表5、表6、表7、表8和表9的插入点或图8-9中说明的那些插入点处的所有可能排列,其中另一XTEN任选连接于FVIII的N末端或C末端,任选通过选自表12的另一裂解序列连接,从而产生CFXTEN组合物;其非限制性实例描绘于图5和12中。在一个实施方案中,CFXTEN包含表1的FVIII BDD序列,其中一个或多个相较于来自表3、4和13-17的任一者的序列或其片段各自具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或99%以上序列同一性的XTEN插入在FVIII BDD序列的任何两个残余B结构域氨基酸之间,从而产生单链FVIII融合蛋白,其中CFXTEN保留天然FVIII的至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%的促凝血活性。在前述实施方案中,CFXTEN可具有表4和13-17的任一者的连接于融合蛋白的N末端或C末端的另一XTEN序列。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在表8中阐述的位点处的至少第一XTEN,其中所述CFXTEN保留天然FVIII的至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%的促凝血活性。在式VII融合蛋白的一个实施方案中,CFXTEN包含表1的FVIII BDD序列,其中相较于来自表3、4和13-17的任一者的序列或其片段,各自具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%或100%序列同一性的两个或更多个XTEN连接于FVIII-BDD序列,其中至少一个XTEN自FVIII BDD序列的残余B结构域氨基酸的FVIII裂解位点氨基酸R740的约3至约20个氨基酸残基至C末端侧以及自FVIII裂解位点氨基酸R1689的约3至约20个氨基酸残基至N末端侧插入,从而产生单链FVIII融合蛋白,且一个或两个XTEN是由裂解序列连接于FVIII-BDD序列的N末端和/或C末端,其中在通过裂解裂解序列释放XTEN之后,CFXTEN展现天然FVIII的至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%的促凝血活性。

[0334] 在一个实施方案中,A3结构域包含a3酸性区域或其部分。在另一实施方案中,至少

一个XTEN插入在a3酸性区域或其部分内、a3酸性区域或其部分的N末端、a3酸性区域或其部分的C末端或其组合。在某些实施方案中,至少一个XTEN插入在C2结构域内、C2结构域的N末端、C2结构域的C末端或其组合。在其它实施方案中,因子VIII包含全部或一部分B结构域。在其它实施方案中,至少一个XTEN插入在全部或一部分B结构域内、B结构域的N末端、B结构域的C末端或其组合。

[0335] 2.具有内部XTEN的CFXTEN融合蛋白构型

[0336] 在另一方面,本发明提供用一个或多个位于FVIII序列内部的XTEN序列构造的CFXTEN。在一个实施方案中,本发明提供用一个或多个位于FVIII序列内部的XTEN序列构造以赋予如但不限于以下的性质的CFXTEN:相较于无并入的XTEN的FVIII,稳定性增加、对蛋白酶的抗性增加、对清除机制(包括但不限于与清除受体或FVIII抑制剂的相互作用)的抗性增加、以及亲水性增加。

[0337] 本发明涵盖FVIII的不同构型或序列变体可用作一个或多个XTEN插入其中的平台。这些构型包括但不限于天然FVIII、FVIII BDD和单链FVIII(scFVIII)以及那些构型的变体。在scFVIII的情况下,本发明提供可通过置换FVIII的加工位点的一个或多个氨基酸来构建的CFXTEN。在一个实施方案中,用于CFXTEN中的scFVIII是通过用甘氨酸或丙氨酸置换FVIII序列RHQREITR(SEQ ID NO:1698)中的R1648以防止蛋白水解加工成异二聚体形式来产生。明确涵盖的是本文公开的具有1648FVIII残基的任何CFXTEN实施方案可具有在位置1648处取代精氨酸的甘氨酸或丙氨酸。在一些实施方案中,本发明提供包含scFVIII的CFXTEN,其中围绕R1648加工位点的序列部分用XTEN置换,如图10中所说明。在一个实施方案中,B结构域的至少约60%、或约70%、或约80%、或约90%、或约95%、或约97%或更多是用本文公开的XTEN序列(包括R740、R1648或R1689裂解位点的一者或多者)置换。在另一实施方案中,CFXTEN的在于R740和R1689处的FXIa裂解位点之间的FVIII B结构域序列(其中也保留在XTEN的切割位点与起始位点之间的至少1-5个邻近B结构域氨基酸以允许蛋白酶进入切割位点)被XTEN置换。在另一实施方案中,CFXTEN的在于N745和P1640处的FXIa裂解位点之间的FVIII B结构域序列被XTEN置换。在其它实施方案中,本发明提供CFXTEN FVIII BDD序列变体,其中缺失B结构域的各部分但仅一个FXI R740或R1689活化位点(以及B结构域的1-5个邻近氨基酸)留在构建体内,其中在由FXIa裂解之后,XTEN保持连接在轻链或重链的一端处,如图5B和5D中所说明。在一个前述实施方案中,CFXTEN包含FVIII BDD序列,其中缺失N745至P1640之间或S743至Q1638之间或P747至V1642之间或N745与Q1656之间或N745与S1657之间或N745与T1667之间或N745与Q1686之间或R747与V1642之间或T751与T1667之间的氨基酸且XTEN序列连接在这些氨基酸之间,从而连接重链和轻链,且可进一步包含插入在外部表面环中、FVIII结构域之间、或FVIII BDD序列的N末端或C末端处(如一个或多个来自表5、表6、表7、表8和表9的插入位点或图8-9中说明的那些插入位点)的另一XTEN。在另一前述实施方案中,CFXTEN包含FVIII BDD序列,其中缺失K713至Q1686之间或残基741与1648之间的氨基酸且XTEN连接在两个氨基酸之间,且另一XTEN可插入在表面环中、FVIII结构域之间、或FVIII BDD序列的N末端或C末端处,包括但不限于一个或多个来自表5、表6、表7、表8和表9的插入位点或图8-9中说明的那些插入位点。在一些实施方案中,所述CFXTEN序列可具有一个或多个展现与来自表4和13-17的任一者的XTEN序列的至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约96%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%

或100％序列同一性的XTEN。

[0338] 本发明涵盖呈各种构型的具有内部XTEN的其它CFXTEN;示例性构型的示意图说明于图5和10中。适于XTEN插入位点的区域包括FVIII的已知结构域边界、外显子边界、通过X射线结晶学分析和由FVIII的分子动态模拟获得的结构模型鉴定的已知表面(外部)环和溶剂可及表面积位点、具有低有序度(通过图7图例中所述的程序评估)的区域、在不同物种间的同源性较低/缺乏保守性的区域、以及亲水性区域。在另一实施方案中,基于FVIII推定清除受体结合位点选择XTEN插入位点。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在以下位置处的XTEN:不在紧密邻近于牵涉于甲型血友病中的列于甲型血友病突变、搜寻、测试和资源中心(Haemophilia A Mutation,Search,Test and Resource Site,HAMSTeRS)数据库中的突变范围内(Kemball-Cook G等The factor VIII Structure and Mutation Resource Site:HAMSTeRS version 4.Nucleic Acids Res.(1998)26(1):216-219)。在另一实施方案中,XTEN插入的潜在位点包括在FVIII表位内能够由存在于敏化血友病患者中的抗FVIII抗体结合且不另外充当蛋白质相互作用位点的残基。被考虑排除作为XTEN插入位点的区域和/或位点包括因子VIII的在各种相互作用中重要的残基/区域,包括其它凝结蛋白、围绕由蛋白酶凝血酶、因子Xa、活化的蛋白质C所作用的各精氨酸活化/失活裂解位点的残基、围绕信号肽加工位点(残基1)的残基(如果构建体含有信号肽)、已知与如FIXa、FX/FXa、凝血酶、活化的蛋白质C、蛋白质C的蛋白质S辅因子、血管性血友病因子的其它蛋白质相作用的区域、已知在凝血中与磷脂辅因子相互作用的位点、结构域相互作用中涉及的残基、配位Ca^{++}或Cu^{++}离子的残基、S-S分子内键结中涉及的半胱氨酸残基、甲型血友病受试者中产生的FVIII中影响促凝血活性的记载氨基酸插入和点突变位点、以及在研究实验室中于FVIII中产生的影响促凝血活性的突变位点。考虑用于插入(以延长半衰期)或用于排除(为移除耗费的FVIIIa或FXa所需)的位点包括已知与硫酸肝素蛋白多糖(HSPG)或低密度脂蛋白受体相关蛋白质(LPR)相互作用的区域。

[0339] 通过分析如实施例34中所述的前述标准,不同插入位点或跨越FVIII BDD序列的插入位点的范围已被鉴定和/或确认为用于插入XTEN的候选位点,其非限制性实例列于表5、表6、表7、表8和表9中且示意性显示于图8和9中。在一个实施方案中,CFXTEN在FVIII的个别结构域之间,即在A1与A2之间、或在A2与B之间、或在B与A3之间、或在A3与C1之间、或在C1与C2结构域之间包含XTEN插入物。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在B结构域内或BDD序列的剩余残基之间的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在编码FVIII基因的已知外显子边界处的XTEN,因为外显子表示在其它蛋白质序列的情形下具有高起作用概率的进化保守序列模块。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在根据FVIII的x射线结构鉴定的表面环内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在通过X射线结构分析鉴定为具有低或不具有检测电子密度的低序区域内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在通过结构预测算法(如但不限于FoldIndex、RONN以及Kyte和Doolitlle算法)预测的低序区域内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在亲水性氨基酸的频率较高的序列区域内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在能够由敏化血友病患者中天然存在的抗FVIII抗体结合的表位内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含插入在于来自不同物种的FVIII序列间具有低序列保守性和/或序列区段长度差异的序列区域内的XTEN。在另一实施方案中,CFXTEN包含连接于N末端和/或C末端的XTEN。在另一实施方案中,本发明提供具有选自

两个或更多个来自以上所列的实施方案的准则的插入XTEN的CFXTEN构型。在另一实施方案中,本发明提供具有至少一个、或者至少两个、或者至少三个、或者至少四个、或者至少五个或更多个插入因子VIII序列中的XTEN的CFXTEN构型,其中插入点处于或邻近于选自表5、表6、表7、表8和表9的插入残基氨基酸或图8-9中说明的那些插入残基氨基酸的至少一个、两个、三个、四个或五个或六个或更多个氨基酸的N末端或C末端侧;或者在来自表5、表6、表7、表8和表9的插入残基氨基酸的一个、或两个、或三个、或四个、或五个、或六个氨基酸内;或在图9中对于示例性FVIII BDD序列示意性描绘的插入残基氨基酸的各种间距内。

[0340] 如上所述,一个或多个内部定位的XTEN或XTEN的片段的序列长度可为6至1000个或更多个氨基酸残基。在其中CFXTEN具有一个或两个或三个或四个或五个或更多个在FVIII内部的XTEN序列的一些实施方案中,所述XTEN序列可相同或可不同。在一个实施方案中,当最优比对时,相较于选自表3、4和13-17的任一者的XTEN的类似长度或片段或基序,各内部定位的XTEN具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。在另一实施方案中,本发明提供一种用一个或多个插入在FVIII BDD序列内部的XTEN构造的CFXTEN,所述FVIII BDD序列相较于表1的序列具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,其中插入位于表5、表6、表7、表8和表9、图8中指示的插入点或插入点范围处或在如图9中所说明的插入范围内。本领域技术人员应了解,在表5、表6、表7、表8和表9的插入点处插入在FVIII序列内的XTEN是通过它的N末端和C末端连接于侧接FVIII氨基酸(或通过如上所述的连接间隔子或裂解序列),而连接于FVIII的N末端或C末端的XTEN将仅连接于单一FVIII氨基酸(或连接于如上所述的连接间隔子或裂解序列氨基酸)。仅举例来说,具有三个内部XTEN的CFXTEN的变化形式可具有:并入在FVIII BDD残基741与1640、残基18与19、以及残基1656与1657之间的XTEN(如本文所述);或并入在FVIII BDD残基741与1640、残基1900与1901之间以及在于残基2332处的C末端处的XTEN;或并入在FVIII BDD残基26与27、残基1656与1657、以及残基1900与1901之间的XTEN;或并入在FVIII BDD残基741与1640、残基1900与1901之间以及在于残基2332处的C末端处的XTEN。

[0341] 在评估具有插入来自表5的位置中的XTEN的CFXTEN融合蛋白时,发现在某些区域中插入FVIII序列产生具有良好表达和促凝血活性保持的CFXTEN。因此,在优选实施方案中,本发明提供用一个或两个或三个或四个或五个或六个或更多个插入FVIII BDD序列内部或连接于FVIII BDD序列的XTEN构造的CFXTEN融合蛋白,所述XTEN相较于选自表4和13-17的任一者的XTEN各自具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,所述FVIII BDD序列相较于表1的序列具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,其中插入位于表7中阐述的一个或两个或三个或四个或五个或六个或更多范围内的插入点处。在前述实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,具有XTEN插入物的CFXTEN融合蛋白保留至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%或更高的促凝血活性。

[0342] 在评估具有插入一个或多个来自表5的位置中的XTEN的CFXTEN融合蛋白时,惊人

地发现高百分比的具有XTEN插入物的融合蛋白保留促凝血活性,如实施例25中所述。因此,本发明提供用一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个XTEN构造的CFXTEN融合蛋白,其中当通过本文所述的凝血测定加以测定时,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,所得融合蛋白展现至少约10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%、或90%或更高的促凝血活性。在一优选实施方案中,本发明提供包含一个或两个或三个或四个或五个或六个或更多个连接于FVIII BDD序列的XTEN的CFXTEN融合蛋白,所述XTEN相较于选自表4和13-17的任一者的XTEN,各自具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,所述FVIII BDD序列相较于表1的序列具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,其中插入位于一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的插入点处,且其中当通过本文所述的测定(例如显色测定)加以体外测定时,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,所得融合蛋白展现至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%或更高的促凝血活性。因为主题CFXTEN融合蛋白相较于天然FVIII通常展现终末半衰期增加,所以本领域技术人员应了解,当以治疗组合物形式向有需要的受试者施用时,相对于等摩尔量的天然FVIII具有较低促凝血活性的CFXTEN将然而是可接受的。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含一个或两个或三个或四个或五个或更多个连接于FVIII BDD序列的XTEN,所述XTEN相较于选自表4和13-17的任一者的XTEN各自具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,所述FVIII BDD序列相较于表1的序列具有至少约80%序列同一性、或者81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性,其中插入位于一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的插入点或插入点范围处,其中当在细胞培养基中表达且在显色测定中测定时,所得融合蛋白展现至少约0.5IU/ml、或至少约0.75IU/ml、或至少约1.0IU/ml、或至少约1.5IU/ml、或至少约2.0IU/ml、或至少约2.5IU/ml、或至少约3IU/ml、或至少约4IU/ml、或至少约5IU/ml、或至少约7IU/ml、或至少约10IU/ml、或至少约20IU/ml、或至少约30IU/ml FVIII活性,其中培养和表达是根据本文所述的方法;例如,实施例25的方法。

[0343] 据信发现其中FVIII保留至少一部分它的促凝血活性的插入位点也将允许插入当在那些相同位点的一者或多者中融合于FVIII蛋白时,具有与半衰期的延长相关的非结构化或结构化特征的其它肽和多肽。非限制性实例包括白蛋白、白蛋白片段、免疫球蛋白的Fc片段、人绒毛膜促性腺激素的C末端肽(CTP)的β亚单位、HAP序列、转铁蛋白、美国专利申请号20100292130的PAS多肽、聚甘氨酸接头、聚丝氨酸接头、具有6-40个选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的两种氨基酸类型的氨基酸的具有尤其自小于50%至大于50%的不同程度二级结构的肽和短多肽,所述实例将适于在鉴定的活性插入位点中插入FVIII。

[0344] 在本文所述的融合蛋白实施方案中,CFXTEN融合蛋白可进一步包含一个或多个来自表12的裂解序列或本领域中已知的其它序列,所述裂解序列位于FVIII和XTEN序列的交叉点的6个氨基酸残基之间或内,所述裂解序列可包括给定内部XTEN序列中的两个裂解序

列。在一个实施方案中,包含裂解序列的CFXTEN具有两个相同裂解序列,各自位于一个或多个内部XTEN的相应末端处或接近所述相应末端以使当由结合且裂解那个序列的蛋白酶裂解时,XTEN自融合蛋白释放。以下更充分描述可被裂解的序列且示例性序列提供于表12中。

[0345] 表5:连接于FVIII BDD序列的XTEN的插入位置

[0346]

编号	XTEN插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
1	0	(N末端)	ATR	A1
2	3	R	RYY	A1
3	17	M	QSD	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
6	24	L	PVD	A1
7	26	V	DAR	A1

[0347]

编号	XTEN插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
8	28	A	RFP	A1
9	32	P	RVP	A1
10	38	F	PFN	A1
11	40	F	NTS	A1
12	41	N	TSV	A1
13	60	N	IAK	A1
14	61	I	AKP	A1
15	65	R	PPW	A1
16	81	Y	DTV	A1
17	111	G	AEY	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
20	120	Q	REK	A1
21	128	V	FPG	A1
22	129	F	PGG	A1
23	130	P	GGS	A1
24	182	G	SLA	A1
25	185	A	KEK	A1
26	188	K	TQT	A1
27	205	G	KSW	A1
28	210	S	ETK	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
32	222	A	ASA	A1
33	223	A	SAR	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
36	243	P	GLI	A1
37	244	G	LIG	A1
38	250	R	KSV	A1
39	318	D	GME	A1
40	333	P	QLR	A1
42	334	Q	LRM	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
45	345	D	YDD	a1
46	357	V	VRF	a1
47	367	S	FIQ	a1
48	370	S	RPY	a1
49	375	A	KKH	A2
50	376	K	KHP	A2
51	378	H	PKT	A2
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
54	405	R	SYK	A2
55	409	S	QYL	A2

[0348]

编号	XTEN插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
56	416	P	QRI	A2
57	434	E	TFK	A2
58	438	T	REA	A2
59	441	A	IQH	A2
60	442	I	QHE	A2
61	463	I	IFK	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
64	492	P	KGV	A2
65	493	K	GVK	A2
66	494	G	VKH	A2
67	500	D	FPI	A2
68	506	G	EIF	A2
69	518	E	DGP	A2
70	556	K	ESV	A2
71	565	Q	IMS	A2
72	566	I	MSD	A2
73	598	P	AGV	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
76	616	S	ING	A2
77	686	G	LWI	A2
78	713	K	NTG	A2
79	719	Y	EDS	A2
80	730	L	LSK	A2
81	733	K	NNA	A2
82	745	N	PPV	B
83	1640	P	PVL	B
84	1652	R	TTL	B
85	1656	Q	SDQ	A3
86	1685	N	QSP	A3
87	1711	M	SSS	A3
88	1713	S	SPH	A3
89	1720	N	RAQ	A3
90	1724	S	GSV	A3
91	1725	G	SVP	A3
92	1726	S	VPQ	A3
93	1741	G	SFT	A3
94	1744	T	QPL	A3
95	1749	R	GEL	A3
96	1773	V	TFR	A3
97	1792	Y	EED	A3
98	1793	E	EDQ	A3
99	1796	Q	RQG	A3
100	1798	Q	GAE	A3
101	1799	G	AEP	A3
102	1802	P	RKN	A3

[0349]

编号	XTEN插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
103	1803	R	KNF	A3
104	1807	V	KPN	A3
105	1808	K	PNE	A3
106	1827	K	DEF	A3
107	1844	E	KDV	A3
108	1861	N	TLN	A3
109	1863	L	NPA	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
115	1920	A	ING	A3
116	1937	D	QRI	A3
117	1981	G	VFE	A3
118	2019	N	KCQ	A3
119	2020	K	CQT	C1
120	2044	G	QWA	C1
121	2068	F	SWI	C1
122	2073	V	DLL	C1
123	2090	R	QKF	C1
124	2092	K	FSS	C1
125	2093	F	SSL	C1
126	2111	K	WQT	C1
127	2115	Y	RGN	C1
128	2120	T	GTL	C1
129	2125	V	FFG	C1
130	2171	L	NSC	C1
131	2173	S	CSM	C2
132	2188	A	QIT	C2
133	2223	V	NNP	C2
134	2224	N	NPK	C2
135	2227	K	EWL	C2
136	2268	G	HQW	C2
137	2277	N	GKV	C2
138	2278	G	KVK	C2
139	2290	F	TPV	C2
140	2332	Y	FVIII的C末端	CT

[0350] 指示XTEN的基于成熟全长人FVIII的氨基酸编号的插入点,其中插入可在所指示氨基酸的N末端或C末端侧上

[0351] 具有746-1639缺失的FVIII BDD中的下游序列

[0352] 表6.连接于FVIII多肽的XTEN的示例性插入位置

[0353]

编号	XTEN 插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 结构域	离插入 残基的距离

[0354]

编号	XTEN 插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII 结构域	离插入残基的距离
9	32	P	RVP	A1	-3, +6
31	220	R	DAA	A1	-
34	224	S	ARA	A1	+5
43	336	R	MKN	a1	-1, +6
44	339	N	NEE	a1	-4, +5
52	399	V	LAP	A2	-6, +3
56	416	P	QRI	A2	+6
75	603	L	EDP	A2	_6, +6
85	1656	Q	SDQ	B	-3, +6
87	1711	M	SSS	A3	-6, +1
91	1725	G	SVP	A3	+6
113	1905	I	QME	A3	+6
114	1910	P	TFK	A3	-5, +6

[0355] 离插入残基的距离是指相距可进行插入所处的指定插入残基(残基“0”)的N末端(负数)或C末端(正数)的相对氨基酸数目。符号“-x”指插入位点相距指定插入残基的N末端侧x个氨基酸。类似地,符号“+x”是指插入位点相距指定插入残基的C末端侧x个氨基酸。

[0356] 举例来说,“-1,+2”指示在表示为-1、0、+1或+2的氨基酸残基的N末端或C末端进行插入。

[0357] 表7.连接于FVIII多肽的XTEN的其它示例性插入位置

[0358]

编号	XTEN 插入点范围	第一插入残基	FVIII结构域
3	18-32	Q	A1
8	40	F	A1
18	211-224	E	A1
27	336-403	R	A1, A2
43	599	A	A2
47	745-1640	N	B
50	1656-1728	Q	B, A3
57	1796-1804	R	A3
65	1900-1912	R	A3
81	2171-2332	L	C1, C2

[0359] 指示相对于成熟人FVIII的氨基酸编号加以编号的插入位点的范围

[0360] 表8.FVIII多肽的B结构域缺失的变体内的示例性XTEN插入位置

[0361]

XTEN插入点范围	第一插入残基	第二插入残基
740-1640	R	P
740-1690	R	S
741-1648	S	R
743-1638	S	Q
745-1638	N	Q
745-1640	N	P
745-1656	N	Q
745-1657	N	S

[0362]

XTEN插入点范围	第一插入残基	第二插入残基
745-1667	N	T
745-1686	N	Q
747-1642	R	V
751-1667	T	T

[0363] 指示连接在B结构域缺失的变体和邻近A3结构域内的氨基酸,其中氨基酸是相对于成熟人FVIII的氨基酸编号加以编号

[0364] 指示由插入BDD-FVIII中的XTEN连接的氨基酸

[0365] 表9.连接于FVIII多肽的XTEN的产生促凝血活性的示例性插入位置

[0366]

编号	XTEN 插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
2	3	R	RYY	A1
4	18	Q	SDL	A1
5	22	G	ELP	A1
7	26	V	DAR	A1
9	32	P	RVP	A1
11	40	F	NTS	A1
18	116	D	QTS	A1
19	119	S	QRE	A1
26	188	K	TQT	A1
29	211	E	TKN	A1
30	216	L	MQD	A1
31	220	R	DAA	A1
34	224	S	ARA	A1
35	230	K	MHT	A1
40	333	P	QLR	A1
43	336	R	MKN	a1
44	339	N	NEE	a1
52	399	V	LAP	A2
53	403	D	DRS	A2
55	409	S	QYL	A2
56	416	P	QRI	A2
60	442	I	QHE	A2
62	487	Y	SRR	A2
63	490	R	LPK	A2
66	494	G	VKH	A2
69	518	E	DGP	A2
74	599	A	GVQ	A2
75	603	L	EDP	A2
78	713	K	NTG	A2
82	745	N	PPV	B
85	1656	Q	SDQ	A3
87	1711	M	SSS	A3
89	1720	N	RAQ	A3
91	1725	G	SVP	A3
99	1796	Q	RQG	A3

[0367]

编号	XTEN 插入点	插入残基	FVIII BDD 下游序列	FVIII结构域
102	1802	P	RKN	A3
110	1896	E	RNC	A3
111	1900	R	APC	A3
112	1904	N	IQM	A3
113	1905	I	QME	A3
114	1910	P	TFK	A3
121	2068	F	SWI	C1
130	2171	L	NSC	C1
135	2227	K	EWL	C2
137	2277	N	GKV	C2
140	2332	Y	FVIII的C末端	C2

[0368] 具有746-1639缺失的FVIII BDD中的下游序列

[0369] 在另一方面,本发明提供组分的文库和用以产生源于编码FVIII区段、XTEN和连接于XTEN的适用于制备编码主题CFXTEN的基因的FVIII区段的核苷酸的文库的方法。在第一步骤中,产生、表达编码插入在表5中鉴定或图8-9中说明的插入位点的1-6个氨基酸处或内的各种单一位点中的FVIII和XTEN的基因的文库,且回收CFXTEN并评估活性和药代动力学,如图15中所说明。显示性质增强的那些CFXTEN接着用于产生编码FVIII区段和插入位点加XTEN的基因,其中来自各增强的插入的组分在文库中加以表示,如图11中所说明。在一个实施方案中,使用标准重组技术以如图11中所说明的组合方式装配文库组分,从而产生具有多个内部以及N和C末端XTEN的CFXTEN的各排列,所述CFXTEN可包括表5、表6、表7、表8和表9或如图8-9中所说明的插入位点或邻近于所述那些插入位点的插入位点。将接着评估所得构建体的活性和增强的药代动力学,且进一步评估相较于未连接于XTEN的FVIII,产生具有增强的性质,例如降低的主动清除、对蛋白酶的抗性、降低的免疫原性和增强的药代动力学的CFXTEN的那些候选物。

[0370] 3.XTEN容许环

[0371] 如在本文中其它地方详细所述以及如图33-36中所说明,发明者已认识到各FVIII“A”结构域包含XTEN序列可插入其中而不消除重组蛋白的促凝血活性、或重组蛋白在体内或在体外在宿主细胞中表达的能力的至少两个“XTEN容许环”。发明者已鉴定XTEN容许环为具有连同其它属性一起,高表面或溶剂暴露以及高构象可挠性的区域。A1结构域包含XTEN容许环-1(A1-1)区域和XTEN容许环-2(A1-2)区域,A2结构域包含XTEN容许环-1(A2-1)区域和XTEN容许环-2(A2-2)区域,A3结构域包含XTEN容许环-1(A3-1)区域和XTEN容许环-2(A3-2)区域。

[0372] 在某些方面,如上所述的重组FVIII蛋白包含至少一个插入XTEN容许环A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2的至少一者中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。在某些方面,如上所述的重组FVIII蛋白包含至少两个插入FVIII中,例如插入两个不同XTEN容许环A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。或者,如上所述的重组FVIII蛋白可包含两个或更多个插入单一XTEN容许环中的XTEN序列,其中有或无XTEN序列插入其它XTEN容许环中,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝

血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。在某些方面,如上所述的重组FVIII蛋白可包含至少一个插入至少一个如上所述的XTEN容许环中的XTEN序列,且可进一步包含一个或多个插入a3中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白可包含三个、四个、五个、六个或更多个插入一个或多个XTEN容许环中或插入a3中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。

[0373] 在某些方面,如上所述的重组FVIII蛋白包含至少一个插入a3中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白包含至少一个插入a3中的XTEN序列,且进一步包含一个或多个插入一个或多个如上所述的XTEN容许环中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。

[0374] 发明者已认识到本发明的重组FVIII蛋白在FVIII A结构域区域的各者中包含至少两个XTEN容许环,此允许插入XTEN序列,同时具有促凝血活性且仍然能够在体内或在体外由宿主细胞表达。已测定FVIII的具有不同分辨率程度的各种晶体结构。通过X射线结晶学和分子动态模拟测定的FVIII和FVIIIa的这些结构用于产生FVIII的可及表面积和构象可挠性的模型。举例来说,人FVIII的晶体结构已由Shen等Blood 111:1240-1247(2008)和Ngo等Structure 16:597-606(2008)所测定。这些结构的数据可自蛋白质数据库(ProteinData Bank)(pdb.org)分别根据登录号2R7E和3CDZ获得。

[0375] 人FVIII的重链和轻链的根据Shen等晶体结构预测的二级结构再现于图38和39中。根据Shen等晶体结构预测的各种β链在图38和39中进行连续编号。在某些实施方案中,XTEN容许环A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1和A3-2含在FVIII的A结构域中的表面暴露的可挠性环结构内。根据成熟FVIII的以PDB数据库的登录号2R7E(PDB:2R7E)储存且如图38和39中所示的二级结构,A1-1位于β链1与β链2之间,A1-2位于β链11与β链12之间,A2-1位于β链22与β链23之间,A2-2位于β链32与β链33之间,A3-1位于β链38与β链39之间且A3-2位于β链45与β链46之间。图38和39中所示的PDB登录号2R7E的二级结构对应于根据DSSP程序的标准化二级结构指定(Kabsch和Sander,Biopolymers,22:2577-2637(1983))。成熟FVIII的以PDB登录号2R7E储存的DSSP二级结构可在于万维网站点swift.cmbi.ru.nl/gv/dssp/处可用的DSSP数据库(2012年2月9日最后一次访问)处获取(Joosten等,39(增刊1):D411-D419(2010))。

[0376] 在某些方面,包含A1-1的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸15至约氨基酸45的区域。在某些方面,A1-1对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸18至约氨基酸41的区域。在某些方面,包含A1-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸201至约氨基酸232的区域。在某些方面,A1-2对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸218至约氨基酸229的区域。在某些方面,包含A2-1的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸395至约氨基酸421的区域。在某些方面,A2-1对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸397至约氨基酸418的区域。在某些方面,包含A2-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸577至约氨基酸635的区域。在某些方面,A2-2对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸595至约氨基酸607的区域。在某些方面,包含A3-1的表面暴露的

可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸1705至约氨基酸1732的区域。在某些方面,A3-1对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸1711至约氨基酸1725的区域。在某些方面,包含A3-2的表面暴露的可挠性环结构对应于天然成熟人FVIII中自图3的约氨基酸1884至约氨基酸1917的区域。在某些方面,A3-2对应于天然成熟人FVIII中自图30的约氨基酸1899至约氨基酸1911的区域。

[0377] 在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白包含一个或多个插入FVIII的一个或多个XTEN容许环中,或插入a3区域中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。待插入的XTEN序列包括使FVIII的体内半衰期或体内或体外稳定性增加的那些XTEN序列。

[0378] 在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白包含紧靠一个或多个对应于成熟天然人FVIII中包括但不限于以下的一个或多个氨基酸的氨基酸的下游插入的XTEN序列:图30的氨基酸18、图30的氨基酸26、图30的氨基酸40、图30的氨基酸220、图30的氨基酸224、图30的氨基酸399、图30的氨基酸403、图30的氨基酸599、图30的氨基酸603、图30的氨基酸1711、图30的氨基酸1720、图30的氨基酸1725、图30的氨基酸1900、图30的氨基酸1905、图30的氨基酸1910或其任何组合;包括本文所述的FVIII的BDD变体中的相应插入。

[0379] 在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白包含单独或与一个或多个插入A结构域的XTEN容许环(例如如上所述的A1-1、A1-2、A2-1、A2-2、A3-1或A3-2)中的XTEN序列组合的至少一个插入FVIII的a3区域中的XTEN序列,其中所述重组FVIII蛋白具有促凝血活性且可在体内或在体外在宿主细胞中表达。在某些方面,至少一个XTEN序列紧靠对应于图30的氨基酸1656的氨基酸的下游插入a3区域中。在某些方面,本发明的重组FVIII蛋白包含插入如所述的a3区域中的XTEN序列,且进一步包括一个或多个紧靠一个或多个对应于成熟天然人FVIII中包括但不限于以下的一个或多个氨基酸的氨基酸的下游插入的XTEN序列:图30的氨基酸18、图30的氨基酸26、图30的氨基酸40、图30的氨基酸220、图30的氨基酸224、图30的氨基酸399、图30的氨基酸403、图30的氨基酸599、图30的氨基酸603、图30的氨基酸1711、图30的氨基酸1720、图30的氨基酸1725、图30的氨基酸1900、图30的氨基酸1905、图30的氨基酸1910或其任何组合。

[0380] 本领域技术人员应了解,异源蛋白质可插入其中的天然FVIII蛋白的容许环的前述方面也可适用于本文所述的B结构域缺失的FVIII变体;例如表1中阐述的序列。在实施本发明时,应了解表1的BDD-FVIII序列可取代上述各种实施方案的重组FVIII蛋白,且据信所得构建体将类似地保留促凝血活性。

[0381] 4.干扰FVIII结合剂

[0382] 本发明的一个目标在于提供用于罹患如甲型血友病的凝血病变的人患者中的促凝血CFXTEN融合蛋白组合物,所述患者具有结合FVIII的影响CFXTEN融合蛋白的活性或半衰期的天然或获得性抗体、抑制剂或其它蛋白质或分子,其中CFXTEN相较于未连接于XTEN的相应FVIII保留更大量的促凝血活性。如本文所用,“FVIII结合剂”是指能够结合天然FVIII或本发明的包含天然、衍生或重组产生的因子VIII或其片段的重组因子VIII融合蛋白的任何分子。明确涵盖的是FVIII结合剂包括抗FVIII抗体和FVIII抑制剂以及能够特异性结合FVIII的其它蛋白质。在一方面,本发明提供展现与干扰FVIII的促凝血活性的抗FVIII抗体或FVIII抑制剂的结合降低的促凝血CFXTEN融合蛋白。如本文所用,“抗FVIII抗

体”或“抗因子VIII抗体”是指能够结合FVIII或本发明的CFXTEN的FVIII组分的抗体,所述抗体包括但不限于表10的抗体或来自具有FVIII抑制剂的甲型血友病患者的多克隆抗体。术语抗体包括单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段和抗体片段克隆。如本文所用,“FVIII抑制剂”或“抗FVIII抑制剂抗体”是指能够结合FVIII或本发明的CFXTEN的FVIII组分且通过任何手段降低FVIII或CFXTEN的FVIII组分的促凝血活性的抗体。在另一方面,本发明提供在FVIII抑制剂存在下保留促凝血活性的CFXTEN融合蛋白。在另一方面,本发明提供包含相较于未连接于XTEN的FVIII,在FVIII结合剂存在下展现终末半衰期增加的FVIII的CFXTEN融合蛋白。

[0383] 大多数针对人因子VIII的抑制性抗体通过结合位于因子VIII的A2结构域或C2结构域中的表位,从而破坏与这些结构域相关的特定功能来起作用(美国专利号6,770,744;Fulcher等Localization of human factor FVIII inhibitor epitopes to two polypeptide fragments.Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1985)82:7728-7732;Scandella等Epitope mapping of human factor VIII inhibitor-antibodies by deletion analysis of fVIII fragments expressed in Escherichia coli.Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1988)85:6152-6156)。尽管报道68％抑制性抗体是针对A2和/或C2结构域,但3％针对A1结构域起作用且46％针对a3酸性区域起作用(Lavigne-Lissalde,G等Characteristics,mechanisms of action,and epitope mapping of anti-factor VIII antibodies.Clin Rev Allergy Immunol(2009)37:67-79)。举例来说,某些重链特异性抑制剂与A2结构域的18.3kD氨基末端区段反应(Scandella D等1988);Lollar P等Inhibition of humanfactor VIIIa by anti-A2subunit antibodies.J Clin Invest 1 994;93:2497)。FVIII在C2结构域中在氨基酸2302与2332之间含有磷脂结合位点,且在C2结构域中也存在连同A3结构域中的氨基酸1649-1689一起起作用的血管性血友病因子结合位点。C2结构域也具有当由抑制剂结合时,阻断由凝血酶或因子Xa活化FVIII的表位。特异性结合轻链的抑制剂识别A3结构域中的表位或C2结构域中的主要抗原性区域且可通过阻止FVIII结合磷脂或降低FVIII自血管性血友病因子的解离速率来导致促凝血活性降低(Gilles JG等Anti-factor VIII antibodies of hemophiliac patients are frequently directed towards nonfunctional determinants and do not exhibit isotypic restriction.Blood(1993)82:2452;Shima M等A factor VIII neutralizing monoclonal antibody and a human inhibitor alloantibody recognizing epitopes in the C2domain inhibit factor VIII binding to von Willebrand factor and to phosphatidylserine.Thromb Haemost (1993)69:240)。单克隆FVIII抑制剂的非限制性实例列于表9中。在具有高效价抑制剂的患者中,存在发展在特定关节中复发性出血的风险增加,此可最终导致生活质量降低、残疾或因过度失血死亡(美国专利申请号20120065077;Zhang等,Clinic.Rev.Allerg.Immunol.,37:114-124(2009);Gouw和van den Berg,Semin.Thromb.Hemost.,35:723-734(2009))。

[0384] 在不意图受任何特定理论束缚下,据信并入CFXTEN融合蛋白中的XTEN的非结构化特征允许XTEN采用导致针对将另外结合FVIII表位的抑制剂的空间位阻的构象。如图6中所说明,当并入的XTEN采用各种无规卷曲构象时,它在空间上覆盖融合蛋白的FVIII组分的各区域且在空间上干扰抑制剂结合FVIII表位的能力。

[0385] 在一个实施方案中,本发明提供相较于未连接于XTEN的相应因子VIII和/或天然FVIII,展现促凝血活性以及在结合因子VIII的C2结构域的抗体存在下结合降低的CFXTEN。在另一实施方案中,本发明提供相较于未连接于XTEN的相应因子VIII或天然FVIII,展现促凝血活性以及在结合因子VIII的A2结构域的抗体存在下结合降低的CFXTEN。在另一实施方案中,本发明提供相较于未连接于XTEN的相应因子VIII或天然FVIII,展现促凝血活性以及在结合因子VIII的A2和C2结构域的抗体存在下结合降低的CFXTEN。在一个实施方案中,本发明提供相较于未连接于XTEN的相应FVIII,展现促凝血活性以及在选自由表10的抗体组成的组的抗体存在下结合降低的CFXTEN。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与抗体GMA8021的结合降低。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与抗体GMA8008的结合降低。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与抗体ESH4的结合降低。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与抗体ESH8的结合降低。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与抗体B02C11的结合降低。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,在来自具有多克隆抗体FVIII抑制剂的甲型血友病受试者的血浆存在下,CFXTEN融合蛋白展现结合降低以及更大程度的促凝血活性,其中所述更大程度的促凝血活性是通过如毕提斯达测定的体外测定或本文所述的其它测定来测定。

[0386] 展现由FVIII抑制剂的结合降低的CFXTEN可具有一个或两个或三个或四个或五个或六个或更多个个别XTEN,其实施方案在本文中加以公开。在这个段落的前述实施方案中,当在体外在能够测定抗体与FVIII的结合的测定(如本文以下所述的测定或本领域中已知的那些测定)中评估时,CFXTEN展现至少5%、或10%、或15%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%或更少与抗体的结合。或者,可如实施例中所述,通过相较于未连接于XTEN的FVIII,在抗体存在下保持较高程度的促凝血活性来评估主题CFXTEN与FVIII结合抗体的结合降低。因此,在关于由本文所述的FVIII抑制剂的结合降低的实施方案中,相较于未连接于XTEN且与抗体反应的相应FVIII,CFXTEN当与抗FVIII抗体反应时在凝血测定(如本文以下所述)中展现至少5%、或10%、或15%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%、或100%、或200%、或300%、或400%、或500%或更高的活性。在前述事项中,抗FVIII抗体可为来自表9的抗体或来自甲型血友病受试者的循环抗FVIII抗体。在另一实施方案中,本发明提供CFXTEN,其中当利用毕提斯达测定和选自表10的抗FVIII抗体或多克隆抗FVIII抗体制剂(如但不限于来自具有FVIII抑制剂的甲型血友病受试者的血浆)测定时,相较于未连接于XTEN且在类似条件下测定的FVIII,测定的融合蛋白产生的毕提斯达效价小至少约2、4、6、8、10、12、15、20、30、40、50、60、70、80、100或200个毕提斯达单位。在另一实施方案中,本发明提供CFXTEN,其中当在利用毕提斯达测定和多克隆抗FVIII抗体制剂(如但不限于来自具有FVIII抑制剂的甲型血友病受试者的血浆)的类似条件下测定时,相较于未连接于XTEN的FVIII,测定的融合蛋白产生小于50%、或小于40%、或小于30%、或小于25%、或小于20%、或小于15%、或小于14%、或小于13%、或小于12%、或小于11%、或小于10%毕提斯达单位。

[0387] 表10:抗因子VIII抗体

[0388]

抗体名称	表位	抑制剂效价 BU/mg	参考文献
BO2C11	C2结构域 Met2199/Phe2200	20000	U.S. 6,770,744 Blood (2007) 110:4234–4242
NMC VIII-5	C2结构域 Glu2181-Val2243		U.S. 6,770,744
ESH2	轻链		ADI
ESH4	轻链 2303-2332	39	U.S. 6,770,744 Blood(2007) 110:4234–4242
ESH8	C2结构域 2248-2285	10000	U.S. 6,770,744 Blood (2007) 110:4234–4242
RHD5 (LMBP 6165CB)	C1结构域		WO 2005/016455 美国专利申请 20090263380
LE2E9	C1结构域		美国专利申请 20090263380 Blood (2000) 95:156-163
I54	C2结构域	1300	Blood (2007) 110:4234–4242
F85	C2结构域	6	Blood (2007) 110:4234–4242
F100	C2结构域	5	Blood (2007) 110:4234–4242
F137	C2结构域	6	Blood (2007) 110:4234–4242
I89	C2结构域	1900	Blood (2007) 110:4234–4242
I117	C2结构域	1800	Blood (2007) 110:4234–4242
I109	C2结构域 Met2199/Phe2200	1500	Blood (2007) 110:4234–4242

[0389]

抗体名称	表位	抑制剂效价 BU/mg	参考文献
1B5	C2结构域	930	Blood (2007) 110:4234–4242
3C6	C2结构域	71	Blood (2007) 110:4234–4242
3D12	C2结构域 Phe2196	2600	Blood (2007) 110:4234–4242
D102	C2结构域	3800	Blood (2007) 110:4234–4242
3G6	C2结构域	25000	Blood (2007) 110:4234–4242
2–77	C2结构域	25000	Blood (2007) 110:4234–4242
B45	C2结构域	21000	Blood (2007) 110:4234–4242
B9	C2结构域	31000	Blood (2007) 110:4234–4242
B11	C2结构域	3300	Blood (2007) 110:4234–4242
B75	C2结构域	不确定	Blood (2007) 110:4234–4242
D105	C2结构域 Val2223/Lys2227	0.8	Blood (2007) 110:4234–4242
F77	C2结构域	26000	Blood (2007) 110:4234–4242
F178	C2结构域	18000	Blood (2007) 110:4234–4242
F67	C2结构域	21000	Blood (2007) 110:4234–4242
G99	C2结构域 Val2223/Lys2227	15000	Blood (2007) 110:4234–4242
G86	C2结构域	4300	Blood (2007) 110:4234–4242
I14	C2结构域	44000	Blood (2007) 110:4234–4242
I55	C2结构域	10000	Blood (2007) 110:4234–4242
2–117	C2结构域	>0.4	Blood (2007) 110:4234–4242
GMA012	A2结构域497-510; 584-593		GMA
GMA8001	A3结构域	156	GMA
GMA8002	A1结构域	<1	GMA
GMA8003	C2结构域		GMA
GMA8004	A1结构域		GMA
GMA8005	A1A3/A1结构域		GMA
GMA8006	C2结构域		GMA

[0390]

抗体名称	表位	抑制剂效价 BU/mg	参考文献
GMA8008	C2结构域	1047	GMA
GMA8009	A2结构域	7923	GMA
GMA8010	LC结构域		GMA
GMA8011	C1结构域	97	GMA
GMA8012	A1A3结构域	204	GMA
GMA8013	A3C2结构域	30	GMA
GMA8014	C2结构域	7799	GMA
GMA8015	A2结构域	17079	GMA
GMA8016	A2结构域	<1	GMA
GMA8017	A2结构域	334	GMA
GMA8018	LC结构域	242	GMA
GMA8019	CR-LC结构域		GMA
GMA8020	A1A3结构域	196	GMA
GMA8021	A2结构域	33928	GMA
4A4	A2结构域	40000	J Thromb Haemost (2009) 7:658-664
3E6	C2结构域	41	Blood (2007) 110:4234–4242

[0391] American Diagnostica Inc.因特网站点,URL在万维网上位于americandiagnostica.com/htmUProduct_Detail.asp?idCategory＝5&idSubCategory＝104&idpro＝ESH-8,按照它在2012年1月12目的原样

[0392] Green Mountain Antibodies因特网站点,URL在万维网上位于greenmoab.com/product_details/16316/21582.html,按照它在2012年1月12目的原样

[0393] 针对抑制剂和抗体结合的测定

[0394] 可使用本领域中已知的方法测定本发明的融合蛋白以确认由FVIII抑制剂的结合降低。可使用的测定包括但不限于使用如蛋白质印迹的技术的竞争性和非竞争性测定系统、放射免疫测定、ELISA、“夹心式”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、凝结测定、因子VIII抑制剂测定等。所述测定在本领域中是常规且熟知的(参见例如Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York,其以引用的方式整体并入本文)。以下简要描述示例但不意图具有限制性。

[0395] 毕提斯达测定和奈美根(Nijmegen)改进形式的毕提斯达测定是熟知为检测FVIII抑制剂的方法的因子VIII抑制剂测定(Kasper CK等Proceedings:A more uniform measurement of factor VIII inhibitors.Thromb Diath Haemorrh.(1975)34(2):612)。然而,测定可被改进来使用如多克隆或单克隆抗FVIII抗体(包括表10的抗体)的抑制剂和如实施例52中所述的方法测定抑制剂与FVIII组合物的结合。简而言之,改进的毕提斯达测定涉及在设定浓度下混合滴定体积的测试样本与等体积的抑制剂。在37℃下孵育混合物2小时,随后通过如显色测定的凝血测定分析因子浓度。类似地,孵育具有天然因子VIII水平的参照血浆,接着作为阳性对照加以测定。终点是产生阳性对照的50％FVIII活性的效价,以毕提斯达单位加以报道。在奈美根改进形式的毕提斯达测定中,用咪唑缓冲液使测定样

本稳定且使对照样本与不完全血浆而非缓冲液混合(Verbruggen B等The Nijmegen modification of the Bethesda assay for factor VIII:C inhibitors:improved specificity and reliability.Thromb Haemost.(1995)73(2):247-251)。

[0396] 蛋白质印迹分析通常包括制备蛋白质样本,在聚丙烯酰胺凝胶(例如,8%-20% SDS-PAGE,视抗原的分子量而定)中使蛋白质样本电泳,将蛋白质样本自聚丙烯酰胺凝胶转移至如硝酸纤维素、PVDF或尼龙的膜中,在封闭溶液(例如,具有3%BSA或脱脂奶的PBS)中封闭膜,在洗涤缓冲液(例如,PBS-吐温20)中洗涤膜,用于封闭缓冲液中稀释的一抗(目标抗体)封闭膜,在洗涤缓冲液中洗涤膜,用于封闭缓冲液中稀释的缀合于酶底物(例如,辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)或放射性分子(例如,32P或125I)的二抗(其识别一抗,例如抗人抗体)封闭膜,在洗涤缓冲液中洗涤膜,以及检测抗原的存在。本领域技术人员将可了解可改进参数以增加检测的信号以及降低背景噪声。对于关于蛋白质印迹方案的进一步讨论,参见例如Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,JohnWiley&Sons,Inc.,New York,10.8.1。

[0397] ELISA测定可检测针对FVIII的抗体而与它们阻断FVIII的促凝血活性的能力无关,且已被用于检测甲型血友病患者中产生的抗FVIII。在131名患有甲型血友病的具有抑制剂的患者的群体中,ELISA技术产生97.7%灵敏性和78.8%特异性,且具有高阴性预测值(98.6%)[Martin,P.G等Evaluation of a novel ELISA screening test for detection of factor VIII inhibitory antibodies in haemophiliacs.Clin Lab Haematol(1999)21:125-128]。其他研究者已发现在用于检测抗FVIIIAb的ELISA测定中,毕提斯达效价与吸光度值之间存在高度显著关联(Towfighi,F.等Comparative measurement of anti-factor VIII antibody by Bethesda assay and ELISA reveals restricted isotype profile and epitope specificity.Acta Haematol(2005)114:84-90),从而具有能够检测非抑制性抗FVIII抗体的附加优势。测定方案包括制备结合配体,其可包括包含因子VIII多肽或CFXTEN融合蛋白的样本,用抗体涂布96孔微量滴定板的孔,添加配体测试样本且孵育,接着添加检测抗体且孵育,随后洗涤且添加碱性磷酸酶或过氧化物酶缀合的二抗并再孵育一段时期,随后添加TMB底物且处理以由分光光度计在450nm下进行读数。在ELISA中,目标抗体或抑制剂不必缀合于可检测化合物;代之以可添加缀合于可检测化合物的二抗(其识别目标抗体或抑制剂)至孔中。此外,替代用抗体涂布孔,可将配体涂布至孔中。本领域技术人员将可了解可改进参数以增加检测的信号以及本领域中已知的ELISA的其它变化形式(参见例如,Ausubel等编,1994,Current Protocols in Molecular Biology,第1卷,John Wiley&Sons,Inc.,New York,11.2.1)。

[0398] 标准或改进凝血测定用于测量FVIII结合剂的结合降低。在一种示例性方法(进一步描述于实施例28中)中,首先通过使用不同量的抑制性抗体,在37℃下与表达含有His/Myc双重标签的野生型FVIII的基础载体一起孵育2小时进行滴定实验来确定待在测定中利用的给定FVIII抑制剂的最优浓度。通过本文所述的Coatest测定程序测量FVIII活性。导致最优抑制FVIII活性的最低浓度用于测定中。在测定中,使FVIII抑制剂抗体在最优浓度下与个别测试样本混合且在37℃下孵育2小时。接着收集所得测试样本且连同CFXTEN的未处理等分试样和阳性对照一起用于Coatest活性测定中以评估各测试样本的残余和基线FVIII活性。

[0399] 本发明提供制备展现与FVIII结合剂(包括FVIII抑制剂)的结合降低以及促凝血活性保持的CFXTEN的方法。在一个实施方案中,制备与FVIII抑制剂的结合降低的CFXTEN的方法包括以下步骤:选择与表1的序列具有至少90%序列同一性的FVIII序列,选择一个、两个、三个、四个、五个或六个或更多个各自与来自表4的具有类似长度的XTEN序列具有至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95-99%序列同一性的XTEN,产生被设计来在或邻近于选自表5、表6、表7、表8和表9的位置处定位所述XTEN的表达构建体,表达和回收所得CFXTEN,以及在本文所述的测定中测定所得融合蛋白以确认CFXTEN融合蛋白的结合降低。通过本发明方法,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,CFXTEN展现与FVIII结合剂(包括但不限于表10的抗体或来自甲型血友病受试者的抗FVIII抗体)的结合降低至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%,且保留至少约10%、或至少约20%、或至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约60%、或至少约70%的促凝血活性。

[0400] 多达8-10%甲型血友病患者具有结合FVIII而不影响它的促凝血性质的抗体;它们因此不被分类为FVIII抑制剂。然而,据信抗体结合FVIII会产生由先天性免疫反应清除或更易经受蛋白水解降解的免疫复合物(Kazatchkine MD.Circulating immune complexes containing anti-VIII antibodies in multi-transfused patients with haemophilia A.Clin Exp Immunol.(1980)39(2):315-320)。因此,本发明的一目标在于提供包含一个或多个XTEN的展现针对FVIII的不是抑制剂的抗体的结合降低的CFXTEN融合蛋白,其中相较于未连接于XTEN的相应FVIII或由所述抗体结合的天然FVIII,CFXTEN的降解或清除降低至少5%、或10%、或15%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%或更低。可通过体外和体内方法测定相较于未连接于XTEN的FVIII或天然FVIII,针对CFXTEN的抗体的结合降低。体外方法包括以上提及的ELISA和蛋白质印迹方法。可通过使用动物模型或在人临床试验中体内评估CFXTEN的降解或清除降低。在一种类型的试验中,优选通过静脉内输注向患有因子VIII缺乏症的具有促进治疗性人因子VIII的降解或清除的抗体的各组患者分别施用因子VIII或CFXTEN。施用的测试物品的剂量在介于5与50IU/kg体重、优选10-45IU/kg之间的范围内,且最优选是40IU/kg体重。在各施用之后约1小时,在功能性单级或显色凝血测定中测量因子VIII或CFXTEN自血液样本的回收率以评估活性且通过ELISA、HPLC或类似测定限定完整因子VIII等效物的量。在输注之后约5-10小时再次获取样本,且测量回收率。因子VIII自样本的总回收率和消失速率可预示抗体效价,且因子VIII与CFXTEN的结果比较指示CFXTEN的清除和/或降解的降低程度。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与促进清除但不另外抑制完整天然FVIII的促凝血活性的抗FVIII抗体的结合降低至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白展现与促进FVIII的降解的抗FVIII抗体的结合降低至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%。在这个段落的前述实施方案中,或者,抗FVIII抗体的结合降低的特征在于相较于与未连接于XTEN的相应FVIII的结合,FVIII抗体与融合蛋白的K_D值相较于FVIII增加至至少2倍、或3倍、或4倍、或5倍、或10倍、或33倍、或100倍、或330倍、或至少1000倍。在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN的FVIII,当向具有抗FVIII抗体的受试者施用时,包含一个或多个XTEN的展现与

抗FVIII抗体的反应性降低的CFXTEN融合蛋白展现终末半衰期增加至至少48小时、或至少72小时、或至少96小时、或至少120小时、或至少144小时、或至少14天、或至少21天。在前述实施方案中,受试者可为人甲型血友病受试者或它可为具有循环抗FVIII抗体的小鼠甲型血友病受试者。

[0401] 本发明的另一方面是CFXTEN融合蛋白用于具有FVIII抑制剂的受试者的凝血病变的特定疗法的用途。本发明提供一种治疗具有循环FVIII抑制剂的受试者的方法,其包括以下步骤:向所述受试者施用凝结有效量的CFXTEN融合蛋白,其中所述融合蛋白相较于未连接于XTEN的相应因子VIII或相较于使用类似量和施用途径向所述受试者施用的天然因子VIII展现更大促凝血活性和/或凝结有效浓度持续时间更长。在所述方法的一个实施方案中,受试者中的FVIII抑制剂是抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是中和抗FVIII抗体。在一个实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的A1结构域的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的A2结构域的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的A3结构域的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的C1结构域的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的C2结构域的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是结合FVIII的C2与A2结构域两者的抗FVIII抗体。在另一实施方案中,FVIII抑制剂结合能够由表10的一种或多种抗体结合的FVIII表位。在另一实施方案中,FVIII抑制剂是来自具有FVIII抑制剂抗体的甲型血友病受试者的多克隆抗体。

[0402] 本发明的一目标是产生具有XTEN的CFXTEN,插入XTEN以使对将另外结合FVIII且中和促凝血活性或导致FVIII清除或降解的FVIII结合剂的空间干扰最大化。因此,在一种方法中,本发明提供包含一个或多个XTEN的CFXTEN,其中所述XTEN邻近于FVIII抑制剂或抗FVIII抗体的结合位点插入。在一个实施方案中,XTEN在选自表5、表6、表7、表8和表9的在由表10的抗体结合的FVIII表位的约50、或约100、或约150、或约200、或约250、或约300个氨基酸内的位置处连接于FVIII。在另一实施方案中,XTEN在A2或C2结构域中由表10的抗体结合的FVIII表位的约50、或约100、或约150、或约200、或约250、或约300个氨基酸内连接于FVIII。因此,本发明提供包含一个或多个XTEN的CFXTEN融合蛋白,其中相较于未连接于XTEN的相应FVIII或天然FVIII,由FVIII抑制剂与融合蛋白的FVIII组分的结合降低,且CFXTEN保留促凝血活性。在上文于这个段落中所述的前述实施方案中,融合蛋白可通过本文以下所述的测定、实施例的测定或本领域中已知的其它测定加以测定,且抑制剂可为表10的抗体,可为多克隆抗FVIII,或可为来自具有FVIII抑制剂的甲型血友病受试者的血液或血浆。

[0403] 在另一方面,CFXTEN被设计来使XTEN可在其上采用覆盖融合蛋白的无规卷曲构象的区域最大化,由此对将另外结合融合蛋白的FVIII组分上的表位的抗FVIII抗体产生空间位阻。据信相较于具有较少XTEN,但具有近似相同总XTEN氨基酸数的CFXTEN,将多个XTEN并入CFXTEN中会提供XTEN组分的较高总流体动力学半径。根据经验,可基于尺寸排阻色谱计算蛋白质的流体动力学半径,且使用所述方法获得的若干融合蛋白的结果描述于实施例中。或者,XTEN多肽(如并入本文公开的实施方案中的那些XTEN多肽)的半径可通过数学公式加以估计,因为有限类型的所利用氨基酸具有可定量的已知特征。在一个实施方案中,根据由等式II给出的公式计算单一XTEN多肽的最大半径(在下文中称为“XTEN半径”):

[0404] XTEN半径＝(√XTEN长度0.2037)+3.4627 II

[0405] 在另一实施方案中,根据由等式III给出的公式计算CFXTEN中所有XTEN区段的最大XTEN半径的总和:

[0406] $$\text{XTEN 半径总和} = \sum_{i=1}^{n} XTEN\ 半径_i \qquad \text{III}$$

[0407] 其中:n＝XTEN区段的数目

[0408] 且i是迭代子

[0409] 在另一实施方案中,根据由等式IV给出的公式计算包含多个XTEN的CFXTEN的XTEN半径总和与相等长度(总氨基酸残基数与CFXTEN的总氨基酸残基数相等)的单一XTEN的XTEN半径的比率(下文称为"XTEN半径比率"):

[0410] $$\text{XTEN 半径比率} = \frac{\sum_{i=1}^{n} XTEN\ 半径_i}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} XTEN\ 长度_i} * 0.2037\right) + 3.4627} \qquad \text{IV}$$

[0411] 其中:n＝XTEN区段的数目

[0412] 且i是迭代子

[0413] 在将等式应用于XTEN时,本领域技术人员应了解,计算值表示可视用于表达XTEN多肽的宿主细胞而变化或降低的最大值。据信尽管大肠杆菌(E.coli)表达将产生实现计算值的XTEN,但在其中XTEN可被糖基化的真核宿主细胞中表达可导致多肽的半径小于最大计算值。所述差异可通过如尺寸排阻色谱的方法来定量,其方法详述于实施例中。

[0414] 为设计使XTEN可在其上采用无规卷曲构象的区域最大化的CFTEN,发现XTEN半径比率高于2的CFXTEN设计提供的在融合蛋白上的覆盖范围大于值＜2的设计。因此,在一个实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0、或2.1、或2.2、或2.3、或2.4、或2.5、或2.6、或2.7、或2.8、或2.9、或3.0、或3.1、或3.2、或3.3、或3.4、或3.5或更大的CFXTEN。在一些实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,其包含至少三个XTEN,其中各XTEN具有至少42至约288个氨基酸且其中至少两个XTEN连接于融合蛋白,其中两个XTEN之间相隔不少于约100、或约200、或约300、或约400、或约500个氨基酸。在其它实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,其包含至少四个XTEN,其中各XTEN具有至少42至约288个氨基酸且其中至少三个XTEN连接于融合蛋白,其中三个XTEN的任何两者之间相隔不少于约100、或约200、或约300、或约400个氨基酸。

[0415] 在另一实施方案中,本发明提供一种其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,所述CFXTEN包含至少三个XTEN,其中各XTEN具有至少42至约288个氨基酸且其中三个XTEN中连接于融合蛋白的至少两者由具有至少100、或约200、或约300至约400个氨基酸的氨基酸序列分隔,且第三XTEN连接在B结构域(或其片段)内或C结构域(或其末端)内。在另一实施方案中,本发明提供一种其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,所述CFXTEN包含至少四个XTEN,其中各XTEN具有至少42至约288个氨基酸且其中四个XTEN中连接于融合蛋白的至少三者由具有至少300至约400个氨基酸的氨基酸序列分隔且第四XTEN连接在B结构域(或其片段)内或C结构域(或其末端)内。

[0416] 在其它实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的

CFXTEN,所述CFXTEN包含至少五个XTEN,其中四个XTEN具有至少42至约144个氨基酸,其中至少四个XTEN连接于融合蛋白,其中四个XTEN的任何两者之间相隔不少于约100、200、或约300、或约400个氨基酸且第五XTEN连接在B结构域(或其片段)内或C结构域(或其末端)内。在一个实施方案中,本发明提供一种其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,所述CFXTEN包含至少五个XTEN,其中四个XTEN具有至少42至约144个氨基酸,其中连接于融合蛋白的至少三个XTEN由具有至少300至约400个氨基酸的氨基酸序列分隔,第四XTEN连接在B结构域(或其片段)内且第五XTEN连接在C结构域(或其末端)内。

[0417] 在一方面,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0、或2.1、或2.2、或2.3、或2.4、或2.5、或2.6、或2.7、或2.8、或2.9、或3.0、或3.1、或3.2、或3.3、或3.4、或3.5或更大的CFXTEN,且组合物不包含某些序列。在一个前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含来自表50或表51的任一者的序列。在另一前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含具有AG家族XTEN序列的序列。在另一前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含选自GTPGSGTASSSP(SEQ ID NO:31)、GSSTPSGATGSP(SEQ ID NO:32)、GSSPSASTGTGP(SEQ ID NO:33)、GASPGTSSTGSP(SEQ ID NO:34)的序列。在另一前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含选自GTPGSGTASSSP(SEQ ID NO:31)、GSSTPSGATGSP(SEQ ID NO:32)、GSSPSASTGTGP(SEQ ID NO:33)、GASPGTSSTGSP(SEQ ID NO:34)和

[0418] GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO:59)的任一序列。在另一前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含选自

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO: 59)、

[0419] PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS(SEQ ID NO:71)或

[0420] PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS(SEQ ID NO:80)的序列。在另一前述实施方案中,本发明提供其中XTEN半径比率是至少2.0-3.5或更大的CFXTEN,前提是融合蛋白不包含由

GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG

[0421] SEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO: 59)、

[0422] PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS(SEQ ID NO:71)或

[0423] PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS(SEQ ID NO:80)组成的XTEN序列。

[0424] 在一方面,本发明提供用以产生具有XTEN的CFXTEN的方法,插入XTEN以使对将另外结合FVIII且中和促凝血活性或导致FVIII清除或降解的FVIII结合剂的空间干扰最大化。因此,在一个实施方案中,本发明提供一种包括以下步骤的方法:选择与表1的序列具有至少90%序列同一性的FVIII序列,自表4选择三个或更多个XTEN,其中XTEN半径比率是至少2.0、或2.1、或2.2、或2.3、或2.4、或2.5、或2.6、或2.7、或2.8、或2.9、或3.0、或3.1、或3.2、或3.3、或3.4、或3.5或更大,产生被设计来在或邻近于选自表5、表6、表7、表8和表9的位置处定位所述XTEN的表达构建体,其中三个或更多个XTEN是至少300至400个氨基酸,表达和回收所得CFXTEN,以及在本文所述的测定中测定所得融合蛋白以确认CFXTEN融合蛋白的结合降低。通过本发明方法,CFXTEN展现与FVIII结合剂(包括但不限于表10的抗体)的结合降低至少5%、或至少10%、或至少15%、或至少20%、或至少25%、或至少40%、或至少50%、或至少60%、或至少70%、或至少80%,且展现促凝血活性。

[0425] 5.具有间隔子和裂解序列的CFXTEN融合蛋白构型

[0426] 在另一方面,本发明提供用一个或多个并入XTEN中或邻近于XTEN的间隔子序列构造的CFXTEN,所述间隔子序列被设计来向组合物并入或增强功能性或性质,或作为装配或制造融合蛋白组合物的辅助手段。所述性质包括但不限于包括裂解序列以允许释放组分,包括可与核苷酸限制位点相容以允许XTEN编码核苷酸键联于FVIII编码核苷酸或有助于构建表达载体的氨基酸,以及设计接头以降低CFXTEN融合蛋白的区域中的空间位阻。

[0427] 在一实施方案中,可在XTEN序列与FVIII组分之间引入间隔子序列以降低空间位阻以使得FVIII组分可采用它的所需三级结构和/或与它的靶标底物或加工酶适当相互作用。对于间隔子和鉴定合乎需要间隔子的方法,参见例如George等(2003)Protein Engineering15:871-879,其以引用的方式明确并入本文。在一个实施方案中,间隔子包含一种或多种长度在1-50个氨基酸残基、或约1-25个残基、或约1-10个残基之间的肽序列。排除裂解位点的间隔子序列可包含20种天然L氨基酸的任一者,且将优选具有XTEN样性质,因为大多数残基将为在空间上不受阻碍的亲水性氨基酸,如但不限于甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)、脯氨酸(P)和天冬氨酸(D)。间隔子可为单一甘氨酸残基、聚甘氨酸或聚丙氨酸,或主要是甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸残基的组合的混合物。在一个实施方案中,排除裂解位点氨基酸的间隔子序列具有约1至10个由选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)的氨基酸组成且大致上缺乏二级结构的氨基酸;例如如通过Chou-Fasman和/或GOR算法所确定,二级结构小于约10%、或小于约5%。在一个实施方案中,间隔子序列是GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。在另一实施方案中,间隔子序列是连接于表12的裂解序列的GPEGPS(SEQ ID NO:1612)。此外,间隔子序列被设计来

避免引入T细胞表位,此可通过避免或限制间隔子中所用疏水性氨基酸的数目来部分地加以实现;表位的确定在以上以及在实施例中加以描述。

[0428] 在一特定实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含一个或多个连接在有效负载FVIII序列与一个或多个并入融合蛋白中的XTEN的接合点处的间隔子序列,其中所述间隔子序列包含可与编码限制位点的核苷酸相容的氨基酸。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含一个或多个连接在有效负载FVIII序列与一个或多个并入融合蛋白中的XTEN的接合点处的间隔子序列,其中所述间隔子序列包含可与编码限制位点的核苷酸相容的氨基酸且所述氨基酸和所述一个或多个间隔子序列氨基酸选自甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)。在另一实施方案中,CFXTEN融合蛋白包含一个或多个连接在有效负载FVIII序列与一个或多个并入融合蛋白中的XTEN的接合点处的间隔子序列,其中所述间隔子序列包含可与编码限制位点的核苷酸相容的氨基酸且所述一个或多个间隔子序列选自表11的序列。选择各间隔子序列的精确序列以可与表达载体中用于特定CFXTEN构建体的克隆位点相容。在一个实施方案中,间隔子序列具有可与XTEN相容的性质。在一个实施方案中,间隔子序列是GAGSPGAETA(SEQ ID NO:178)。对于并入FVIII序列内部的XTEN序列,各XTEN将通常由两个包含可与限制位点相容的氨基酸的间隔子序列侧接,而连接于N末端或C末端的XTEN将仅需要在两个组分的接合点处的单一间隔子序列和在相反末端处的另一间隔子序列以并入载体中。如将为本领域普通技术人员显而易知,当合成产生整个CFXTEN基因时,包含可与在FVIII内部的限制位点相容的氨基酸的间隔子序列可自构建体忽略。

[0429] 表11:可与限制位点相容的间隔子序列

[0430]

间隔子序列	限制酶
GSPG(SEQ ID NO:174)	BsaI
ETET(SEQ ID NO:175)	BsaI
PGSSS(SEQ ID NO:176)	BbsI
GAP	AscI
GPA	FseI
GPSGP(SEQ ID NO:177)	SfiI
AAA	SacII
TG	AgeI
GT	KpnI
GAGSPGAETA(SEQ ID NO:178)	SfiI
ASS	XhoI

[0431] 在另一方面,本发明提供具有并入间隔子序列中的裂解序列的CFXTEN构型。在一些实施方案中,CFXTEN融合蛋白组合物中的间隔子序列包含一个或多个相同或不同裂解序列,其中所述裂解序列可由蛋白酶所作用(如图12中所示)以自融合蛋白释放FVIII、FVIII组分(例如,B结构域)或XTEN序列。在一个实施方案中,将裂解序列并入CFXTEN中被设计来允许释放FVIII组分,所述FVIII组分在它自XTEN释放后变得具有活性或更具有活性(就它充当因子IXa和X的膜结合位点的能力而言)。在前述实施方案中,相较于完整CFXTEN,在裂解之后,CFXTEN的FVIII组分的促凝血活性增加至少30%、或至少40%、或至少50%、或至少

60％、或至少70％、或至少80％、或至少90％。裂解序列足够靠近FVIII序列加以定位,通常在FVIII序列的18、或12、或6、或2个氨基酸内,以使在裂解之后,连接于FVIII的任何剩余残基都不明显地干扰FVIII的活性(例如,像结合凝结蛋白),但提供蛋白酶的足够通路以能够实现裂解序列的裂解。在一些情况下,包含裂解序列的CFXTEN也将在FVIII与裂解序列之间或XTEN与裂解序列之间具有一个或多个间隔子序列氨基酸以有助于蛋白酶进入;间隔子氨基酸包括任何天然氨基酸,包括作为优选氨基酸的甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸。在一个实施方案中,裂解位点是可由哺乳动物受试者内源性蛋白酶裂解以使CFXTEN在向受试者施用之后可被裂解的序列。在所述情况下,CFXTEN可充当FVIII的前药或循环储槽。在一前述特定构建体中,CFXTEN将具有一个或两个通过可由活化的凝血因子所作用的裂解序列连接于FVIII-BDD的N末端和/或C末端的XTEN,且将具有位于在位置R740和R1689处的加工氨基酸之间的另一XTEN以使所述XTEN可被释放,从而剩下与天然活化的FVIII类似的FVIII形式。在前述构建体的一个实施方案中,相较于完整CFXTEN融合蛋白,通过裂解序列的裂解自融合蛋白释放的FVIII展现活性增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约20倍。

[0432] 由本发明涵盖的裂解位点的实例包括但不限于可由选自FXIa、FXIIa、激肽释放酶、FVIIIa、FVIIIa、FXa、FIIa(凝血酶)、弹性蛋白酶-2、粒酶B(granzyme B)、MMP-12、MMP-13、MMP-17或MMP-20的哺乳动物内源性蛋白酶或由非哺乳动物蛋白酶(如TEV、肠激酶(enterokinase)、PreScission™蛋白酶(鼻病毒3C蛋白酶)和分选酶A(sortase A))裂解的多肽序列。已知由前述蛋白酶和其它蛋白酶裂解的序列在本领域中是已知的。由本发明涵盖的示例性裂解序列和序列内的相应切割位点呈现于表12中以及其序列变体。对于包含并入的裂解序列的CFXTEN,通常优选的是一个或多个裂解序列是活化的凝结蛋白的底物。举例来说,凝血酶(活化的凝结因子II)作用于序列LTPRSLLV(SEQ ID NO:1618)[Rawlings N.D.等(2008)Nucleic Acids Res.,36:D320],其在序列中于位置4处的精氨酸之后被切割。活性FIIa是通过在磷脂和钙存在下由FXa裂解FII来产生且在凝血路径中处于因子VIII的下游。一旦活化,它在凝血中的天然作用将裂解纤维蛋白原,所述纤维蛋白原接着又开始形成凝块。FIIa活性受严密控制且仅在凝血为适当止血所必需时存在。通过向CFXTEN中并入在FVIII与XTEN组分之间且连接FVIII和XTEN组分的LTPRSLLV序列(SEQ ID NO:1618),当生理需要凝血时,XTEN与外源性或内源性凝血路径的活化同时自邻接FVIII移除,由此选择性释放FVIII。在另一实施方案中,本发明提供其中FXIa裂解序列并入在仅通过启动内源性凝血系统而被作用的FVIII与XTEN组分之间的CFXTEN,其中促凝血形式的FVIII是由FXIa自XTEN释放以参与凝血级联。在不意图受任何特定理论束缚下,据信前述实施方案的CFXTEN将使FVIII与其它凝血因子隔离(在活性凝结部位处除外),由此允许在最小安全性顾虑下使用较大剂量(以及因此较长给药间隔)。

[0433] 因此,裂解序列,特别是易受表12中所列的促凝血活化的凝结蛋白影响的那些裂解序列将提供FVIII的持续释放,在CFXTEN的某些实施方案中,此可提供自CFXTEN的完整形式释放的FVIII组分的较高活性程度,以及向受试者施用高剂量CFXTEN的额外安全界限。在一个实施方案中,本发明提供包含一个或多个被可操作地定位来在裂解后自融合蛋白释放FVIII的裂解序列的CFXTEN,其中所述一个或多个裂解序列与选自表12的序列具有至少约86％、或至少约92％或100％序列同一性。

[0434] 在一些实施方案中,仅两个或三个侧接切割位点的两侧的氨基酸(总计四至六个氨基酸)并入裂解序列中,所述裂解序列又并入实施方案的CFXTEN中,从而提供例如XTEN释放位点。在其它实施方案中,表12的并入的裂解序列可具有一个或多个缺失或插入或已知序列中任何一个或两个或三个氨基酸的一个或两个或三个氨基酸取代,其中所述缺失、插入或取代导致易感性降低或增强而非不存在对蛋白酶的易感性,从而导致能够定制FVIII自XTEN的释放速率。用于本发明的CFXTEN中的裂解序列内的示例性取代显示于表12中。

[0435] 表12:蛋白酶裂解序列

[0436]

作用于序列的蛋白酶	示例性裂解序列	SEQ ID NO:	最小切割位点	SEQ ID NO:
FXIa	KLTR↓AET	179	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIa	DFTR↓VVG	180	KD/FL/T/R↓VA/VE/GT/GV	
FXIIa	TMTR↓IVGG	181	NA	
激肽释放酶	SPFR↓STGG	182	-/-/FL/RY↓SR/RT/-/-	
FVIIa	LQVR↓IVGG	183	NA	
FIXa	PLGR↓IVGG	184	-/-/G/R↓-/-/-/-	
FXa	IEGR↓TVGG	185	IA/E/GFP/R↓STI/VFS/-/G	

[0437]

FIIa(凝血酶)	LTPR↓SLLV	186	-/-/PLA/R↓SAG/-/-/-	
弹性蛋白酶-2	LGPV↓SGVP	187	-/-/-/VIAT↓-/-/-/-	
粒酶B	VAGD↓SLEE	188	V/-/-/D↓-/-/-/-	
MMP-12	GPAG↓LGGA	189	G/PA/-/G↓L/-/G/-	190
MMP-13	GPAG↓LRGA	191	G/P/-/G↓L/-/GA/-	192
MMP-17	APLG↓LRLR	193	-/PS/-/-↓LQ/-/LT/-	
MMP-20	PALP↓LVAQ	194	NA	
TEV	ENLYFQ↓G	195	ENLYFQ↓G/S	196
肠激酶	DDDK↓IVGG	197	DDDK↓IVGG	198
蛋白酶3C(PreScission™)	LEVLFQ↓GP	199	LEVLFQ↓GP	200
分选酶A	LPKT↓GSES	201	L/P/KEAD/T↓G/-/EKS/S	202

[0438] ↓指示裂解位点NA:不适用

[0439] 在斜线符号之前、之间或之后的多个氨基酸的清单指示可在所述位置处被取代的替代性氨基酸;“-”指示任何氨基酸都可取代在中间列中指示的相应氨基酸

[0440] 6.示例性CFXTEN融合蛋白序列

[0441] 含有连接于一个或多个XTEN的单一FVIII的融合蛋白的序列的非限制性实例呈现于表21中。表21的示例性氨基酸序列(和编码它们的DNA序列)出于纯化目的含有如将为本领域技术人员显而易知,可自序列缺失而不对CFXTEN融合蛋白的促凝血活性具有影响的his标签。在一个实施方案中,表21的CFXTEN进一步在N末端上包含对应于天然人FVIII的氨基酸的氨基酸(即序列MQIELSTCFFLCLLRFCFS(SEQ ID NO:1611))以有助于CFXTEN融合蛋白的表达和分泌。在一个实施方案中,CFXTEN组合物包含当最优比对时,相较于来自表21的CFXTEN具有至少约80%序列同一性,或者相较于来自表21的CFXTEN具有至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、

98％、99％、或约100％序列同一性的融合蛋白。在另一实施方案中,CFXTEN组合物包含来自表21的融合蛋白,其中C末端his-his-his-his-his-his序列(SEQ ID NO:1700)被缺失。然而,本发明也涵盖用表1的任何FVIII序列取代表21的CFXTEN的FVIII组分,和/或用表3、4和13-17的任一者的任何序列取代表21的CFXTEN的XTEN组分。通常,前述实例的所得CFXTEN保留未连接于XTEN的相应FVIII的至少一部分促凝血活性。在上文于这个段落中所述的前述融合蛋白中,CFXTEN融合蛋白可进一步包含一个或多个裂解序列;例如来自表12的序列,所述裂解序列位于FVIII与XTEN序列之间或由XTEN连接的邻近FVIII结构域之间。在包含裂解序列的一些实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,完整CFXTEN组合物以它的完整形式具有较小活性但较长半衰期,但被设计以使在向受试者施用后,FVIII组分通过由内源性蛋白酶在裂解序列处裂解而自融合蛋白逐渐释放,据此FVIII组分展现促凝血活性。

[0442] 可使用如本文所述的测定或体内参数(例如体外凝血测定、表49的测定、或在临床前血友病模型中或在人中进行的临床试验中的药效学作用,使用如实施例中所述的方法或本领域中已知的用于评估FVIII活性的其它方法)评估实施方案的CFXTEN组合物的活性以确定相较于天然FVIII序列保留至少约30％、或约40％、或约50％、或约55％、或约60％、或约70％、或约80％、或约90％、或约95％或更高活性的构型或FVIII序列变体和那些CFXTEN组合物(包括在裂解任何并入的XTEN释放性裂解位点之后)被认为适用于治疗FVIII相关病状的适合性。

[0443] V).本发明的CFXTEN组合物的性质

[0444] (a)CFXTEN的药代动力学性质

[0445] 本发明的一目标在于提供相较于未连接于XTEN的FVIII具有增强的药代动力学的CFXTEN融合蛋白和包含CFXTEN的药物组合物。通过使给定XTEN连接于FVIII而增强的FVIII药代动力学性质包括但不限于终末半衰期、曲线下面积(AUC)、C_{max}、分布体积、相较于未连接于XTEN的FVIII维持生物活性CFXTEN高于最小有效血液单位浓度持续较长时期。性质增强允许相较于类似剂量的未连接于XTEN的FVIII,给药频率较小和/或促凝血作用存在较长久。增强这些性质中的一者或多者可产生治疗因子VIII相关病状的益处。

[0446] 已报道当与正常血管性血友病因子蛋白复合时,外源施用的因子VIII在人中的终末半衰期是约12-14小时,而在不存在血管性血友病因子下,因子VIII的半衰期降低至2小时(Tuddenham EG等,Br J Haematol.(1982)52(2):259-267;Bjorkman,S.等Clin Pharmacokinet.(2001)40:815)。由于由XTEN赋予的性质增强,当在确定为适于受试者和它的潜伏病状的剂量和剂量方案下使用时,CFXTEN可实现相较于类似剂量的未连接于XTEN的相应FVIII,持续延长时期产生所需促凝血或临床作用的循环浓度。如本文所用,“类似剂量”是指向受试者施用的组合物的等效摩尔/kg或国际单位/kg(IU/kg)。在本领域中应了解,未连接于XTEN的FVIII的“类似剂量”将表示较小药物重量但就剂量而言将具有CFXTEN的基本上相同IU或摩尔当量。

[0447] 1国际单位(“IU”)的因子VIII在本领域中定义为1ml正常人血浆中存在的凝血活性。预期正常非血友病个别人具有约100IU/dL因子VIII活性。在甲型血友病中,为治疗所需的剂量取决于病状。对于轻微出血,必要时通常施用天然或重组因子VIII的剂量20至40IU/kg。对于中度出血,必要时施用剂量30至60IU/kg,且对于重度出血,可需要剂量80至100IU/kg,伴随每8至12小时给予重复剂量20至25IU/kg直至出血得以解决。对于防治患有重度甲

型血友病的患者的出血,天然或重组FVIII制剂的常用剂量是在间隔约2至3天下20至401U/kg体重。用于估计包含FVIII的组合物的适当剂量的标准等式是:

[0448] 所需单位＝体重(kg)x所需因子VIII升高(IU/dL或正常值%)x 0.5(每IU/dL的IU/kg)。

[0449] 在许多情况下,已确定FVIII在不同年龄或疾病程度的受试者中的治疗水平且可在公开文献中获得或在含有FVIII的核准产品的药物标签上加以陈述。举例来说,国际血栓形成和止血学会的科学和标准化委员会的因子VIII和因子IX附属委员会(Subcommittee on Factor VIII and Factor IX of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis)于2000年11月29日在ISTH网站上公布甲型血友病的最广泛使用的量度标准是通过测定血浆FVIII促凝血水平的循环浓度来确定,其中因子VIII<1%(<0.01IU/ml)的人士确定为重度;1-5%(0.01-0.05IU/ml)确定为中等重度;且＞5-40%(0.05-＜0.40IU/ml)确定为轻度,其中正常值是1IU/ml因子VIIIC(100%)。可使用标准方法确定新型组合物,包括本公开的那些CFXTEN和包含CFXTEN的药物组合物的治疗水平。在实施本发明时,应了解CFXTEN的任何有效剂量都可用于处理出血事件或维持止血。用于确定给定组合物的治疗水平和给药时程的方法为本领域技术人员所已知(参见例如Goodman&Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics,第11版,McGraw-Hill (2005))。举例来说,通过在患有靶标病状的受试者中使用剂量提高研究以确定功效或合乎需要的药理学作用、不利事件的出现以及循环血液水平的测定结果,可确定给定药物或生物制剂用于给定受试者或受试者群体的治疗血液水平。剂量提高研究将通过在1名受试者或1组甲型血友病受试者中进行研究来评估CFXTEN的活性。研究将监测促凝血剂的血液水平以及如本领域中已知或如本文对于一个或多个与因子VIII相关病状相关的参数所述的生理或临床参数、或与有益结果相关的临床参数以及观察和/或测量参数以确定无作用剂量、不利事件、最小有效剂量等、以及确定所测定或获得的循环血液水平的药代动力学参数的测量结果。结果可接着与施用的剂量和治疗剂的与前述测定参数或作用水平一致的血液浓度相关联。通过这些方法,一定范围的剂量和血液浓度可与所需作用存在或得以维持所处的最小有效剂量以及最大剂量和血液浓度、以及所需作用得以维持所可持续的时期相关联,由此确定组合物的治疗血液水平和给药时程。因此,通过前述方法,确定C_{min}血液水平,在低于所述C_{min}血液水平时,CFXTEN融合蛋白将不具有所需药理学作用;以及C_{max}血液水平,在高于所述C_{max}血液水平时,如血栓形成的副作用可发生(Brobrow,RS,JABFP(2005)18(2):147-149),从而确定组合物的治疗窗。

[0450] 本领域技术人员可通过本文公开的手段或通过本领域中已知的其它方法确认施用的CFXTEN保持在治疗血液水平下以维持止血持续所需间隔或需要在剂量或XTEN的长度或序列方面进行调整。此外,适于保持CFXTEN在治疗窗内的剂量和剂量频率的测定结果确定治疗有效剂量方案;用于使用治疗有效剂量的融合蛋白向有需要的受试者施用多个连续剂量,从而导致连续C_{max}峰值和/或C_{min}谷底值保持在治疗有效浓度以上且导致靶标病状的至少一个相关测量参数改进的时程。在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN且在类似剂量下施用的相应FVIII,在适当剂量下向受试者施用的CFXTEN或包含CFXTEN的药物组合物导致CFXTEN融合蛋白的血液浓度保持在用以维持止血的最小有效浓度以上持续的时期长至少约2倍;相较于未连接于XTEN且在类似剂量下施用的相应FVIII,或者长至少约3倍;或

者长至少约4倍;或者长至少约5倍;或者长至少约6倍;或者长至少约7倍;或者长至少约8倍;或者长至少约9倍;或者长至少约10倍;或至少长约20倍或更长。如本文所用,“适当剂量”是指药物或生物制剂当向受试者施用时将产生合乎需要的治疗或药理学作用(例如止血)和/或在治疗窗内的血液浓度的剂量。

[0451] 在实施本发明时,终末半衰期较长的CFXTEN通常是优选的,以便改进患者便利性,增加剂量之间的间隔且降低为实现持续作用所需的药物量。相较于未连接于XTEN的FVIII,增强的PK参数允许主题组合物的给药降低,特别是对于接受常规防治的那些甲型血友病受试者而言。

[0452] 如在关于包含XTEN的融合蛋白的药代动力学特征的实施例中更充分所述,观察到增加单一或组合XTEN的总长度会赋予包含XTEN的融合蛋白的终末半衰期不成比例增加。因此,本发明提供CFXTEN融合蛋白和包含CFXTEN的药物组合物,其中当向受试者施用时,所述CFXTEN展现半衰期增强。在一些实施方案中,本发明提供包含一个或多个XTEN的单体CFXTEN融合蛋白,其中选择所述XTEN的数目和位置以赋予相较于未连接于XTEN且在类似剂量下施用的相应FVIII,向受试者施用的CFXTEN的终末半衰期增加,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,增加是终末半衰期增加长至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约7倍、或至少约8倍、或至少约9倍、或至少约10倍、或至少约15倍、或至少20倍、或至少40倍或更长。在其它实施方案中,本发明提供CXTEN组合物和包含CFXTEN的药物组合物,其中相较于类似剂量的未连接于XTEN的FVIII,向有需要的受试者施用组合物导致终末半衰期长至少12小时、或至少约24小时、或至少约48小时、或至少约96小时、或至少约144小时、或至少约7天、或至少约14天、或至少约21天。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN且在类似剂量下施用的FVIII,向有需要的受试者施用凝血有效剂量的CFXTEN融合蛋白可导致为维持血液水平约0.1IU/ml所必需的连续剂量之间的时间增加至少48小时、或至少72小时、或至少约96小时、或至少约120小时、或至少约7天、或至少约14天、或至少约21天。

[0453] 在一个实施方案中,本发明提供CFXTEN融合蛋白和包含CFXTEN的药物组合物,其当向有需要的受试者施用时,相较于未连接于XTEN且在类似剂量下向受试者施用的相应FVIII,展现AUC增加至少约50%、或至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或至少约90%、或至少约100%、或至少约150%、或至少约200%、或至少约300%、或至少约500%、或至少约1000%、或至少约2000%。可通过标准方法确定CFXTEN的药代动力学参数,所述方法涉及给药,在定时间隔下获取血液样本,以及使用ELISA、HPLC、放射测定、凝结测定、表49的测定、或本领域中已知或如本文所述的其它方法测定蛋白质,随后对数据进行标准计算以获得半衰期和其它PK参数。

[0454] 在一个实施方案中,根据为维持止血所需的剂量方案,施用相较于未连接于XTEN的相应FVIII,小约2倍、或小约3倍、或小约4倍、或小约5倍、或小约6倍、或小约8倍、或小约10倍或更多的较小IU量的融合蛋白,且所述融合蛋白实现与为维持止血所需的相应IU量的未连接于XTEN的FVIII类似的曲线下面积。在另一实施方案中,对于甲型血友病受试者的常规防治而言,CFXTEN融合蛋白或包含CFXTEN的药物组合物需要的施用频率较小,其中约每4天、约每7天、约每10天、约每14天、约每21天、或约每月向受试者施用融合蛋白的剂量,且所述融合蛋白实现与未连接于XTEN且向受试者施用的相应FVIII类似的曲线下面积。在其它

实施方案中,根据为维持血液浓度0.1IU/ml所需的剂量方案,向受试者施用相较于相应IU量的未连接于XTEN的FVIII小约5%、或约10%、或约20%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%、或约80%、或约90%的累积较小IU量的融合蛋白,然而所述融合蛋白实现至少与未连接于XTEN的相应FVIII类似的曲线下面积。累积较小IU量持续至少约1周、或约14天、或约21天、或约1个月的时期被测量到。

[0455] 在一方面,本发明提供被设计来降低由FVIII结合剂结合,由此增加向受试者施用的CFXTEN的终末半衰期,同时仍然保留促凝血活性的CFXTEN组合物。据信本发明的CFXTEN具有相比较而言较高和/或持续活性,所述活性是通过向FVIII凝血因子中添加非结构化XTEN以降低分子的主动清除来实现。自循环移除FVIII的清除机制尚待充分阐明。凝血蛋白的摄取、消除和失活可发生在循环系统中以及血管外间隙中。凝血因子是与许多其它蛋白质、脂质和受体相互作用的复合蛋白质,且这些相互作用中的许多可有助于CF自循环消除。蛋白质血管性血友病因子是结合FVIII的FVIII结合剂的一个实例。因子VIII和血管性血友病因子(VWF)以紧密非共价连接的复合物形式在血液中循环,其中VWF充当可能有助于保护FVIII免遭主动裂解机制的载体,但然而会对FVIII的终末半衰期产生限制。举例来说:(i)VWF使FVIII的异二聚结构稳定;(ii)VWF保护FVIII免遭由磷脂结合蛋白酶(如活化的蛋白质C和活化的FX(FXa))的蛋白水解降解;(iii)VWF干扰FVIII结合在活化的血小板内暴露的带负电荷的磷脂表面;(iv)VWF抑制FVIII结合活化的FIX(FIXa),由此拒绝FVIII进入FX活化复合物;以及(v)VWF阻止细胞摄取FVIII(Lenting,P.J.等,J Thrombosis and Haemostasis(2007)5(7):1353-1360)。此外,LDL受体相关蛋白质(LRP1,也称为α2-巨球蛋白受体或CD91)已被鉴定为FVIII的候选清除受体,其中LRP1结合位点鉴定于FVIII的异二聚体形式的两条链上(Lenting PJ等,.J Biol Chem(1999)274:23734-23739;Saenko EL等,J Biol Chem(1999)274:37685-37692)。LRP涉及于包括蛋白酶、库尼茨(Kunitz)型抑制剂、蛋白酶丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(serpin)复合物、脂酶和脂蛋白的多种配体的清除中(Narita等,Blood(1998)2:555-560)。已显示因子VIII的轻链而非重链结合表面暴露的LRP1受体蛋白质(Lentig等(J Biol Chem(1999)274(34):23734-23739;以及美国专利号6,919,311),此表明LRP1可在如FVIII的蛋白质的主动清除中起主要作用。尽管VWF-FVIII相互作用具有高亲和力(<1nM),但然而复合物是处于动态平衡中,以使较小但显著部分的FVIII分子(5-8%)以游离蛋白质形式循环(Leyte A等,Biochem J(1989)257:679-683;Noe DA.Haemostasis(1996)26:289-303)。因此,一部分天然FVIII不受VWF保护,从而允许主动清除机制自循环移除未保护的FVIII。

[0456] 在一个实施方案中,本发明提供与VWF缔合但通过在FVIII分子内的一个或多个位置(例如,选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位置)处并入另外两个XTEN所赋予的免遭主动清除受体的保护作用增强的CFXTEN,其中所述XTEN干扰所得CFXTEN与那些清除受体的相互作用,从而相较于未连接于XTEN的相应FVIII,CFXTEN的药代动力学性质得以增强。在另一实施方案中,本发明提供与VWF的结合亲和力降低至少5%、或约10%、或约20%、或约40%、或约50%、或约60%、或约70%,但然而被构造来具有通过在FVIII分子内的一个或多个位置处并入XTEN所赋予的增强的免遭主动清除受体的保护作用的CFXTEN,其中所述XTEN干扰因子VIII与那些受体的相互作用。在前述实施方案中,相较于未连接于XTEN的FVIII,CFXTEN具有增加的终末半衰期至少约12小时、或24小时、或48小时、或72小时、或96小时、或

120小时、或144小时、或7天、或10天、或14天、或21天。本发明提供一种产生清除率降低的CFXTEN的方法,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,使用本文所述的体外结合测定或体内药代动力学模型或本领域中已知的其它测定,以及选择显示结合降低但保留促凝血FVIII活性的那些CFXTEN融合蛋白评估通过多个插入产生的CFXTEN融合蛋白与清除受体的结合所受的抑制。此外,前述融合蛋白可被最优化来具有增加的XTEN半径比率至少2.0-3.5以实现进一步增强的药代动力学性质。表5、表6、表7、表8和表9以及图8-9提供因子VIII序列内的XTEN插入点的非限制性实例。使用所述插入点,本发明涵盖具有多个插入的XTEN的构型的CFXTEN组合物,其中约100、或约200、或约300、或约400、或约500个氨基酸分隔至少三个XTEN以进一步增加针对主动清除机制的保护作用,且因此增加CFXTEN的终末半衰期。在不受特定理论束缚下,预期如上所述,CFXTEN组合物(例如包含AE家族XTEN的CFXTEN)的具有高净电荷的XTEN与如血管、组织或各种受体的各种带负电荷表面的非特异性相互作用较小,此将进一步有助于降低主动清除。相反,预期CFXTEN组合物(例如包含AG家族XTEN的CFXTEN)的具有低净电荷(或不具有净电荷)的XTEN与表面具有较高程度的相互作用,此尽管有助于主动清除,但鉴于细胞(例如,血小板)和血管表面对凝血过程和凝血因子活化强度的已知作用,可加强相关凝血因子的活性(Zhou,R.等,Biomaterials(2005)26(16):2965-2973;London,F.等Biochemistry(2000)39(32):9850-9858)。本发明部分地利用以下事实:由于缔合速率降低或解离速率增加而与清除受体的结合降低的某些配体可通过用形成无规卷曲的插入XTEN阻塞受体位点,从而导致结合降低来实现。对CFXTEN融合蛋白的特定构型的选择可通过本文公开的方法加以测试以确认降低与清除受体的结合程度以使主动清除速率降低得以实现的那些构型。在一个实施方案中,CFXTEN包含具有一个或多个插入在选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位置处的XTEN的FVIII-XTEN序列,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,所述CFXTEN的终末半衰期增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约20倍。在另一实施方案中,CFXTEN包含具有第一和至少第二插入在选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的第一和第二位置处的XTEN的FVIII-XTEN序列,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,所述CFXTEN的终末半衰期增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约20倍。在另一实施方案中,CFXTEN包含使用三个或更多个选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的由约100、或约200、或约300、或约400、或约500个氨基酸分隔的XTEN插入位置来并有多个XTEN序列的FVIII-XTEN序列,其中相较于未连接于XTEN的FVIII,所述CFXTEN的终末半衰期增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约20倍。在上文于这个段落中所述的前述实施方案中,并入CFXTEN构型中的XTEN可相同或它们可不同,且可与来自表3、4和13-17的任一者的序列具有至少约80%、或90%、或91%、或92%、或93%、或94%、或95%、或96%、或97%、或98%、或99%序列同一性,且可任选包括一个或多个来自表12的裂解序列,从而有助于自CFXTEN融合蛋白释放一个或多个XTEN。

[0457] 在一个实施方案中,本发明提供通过使一个或多个XTEN连接于融合蛋白的FVIII组分来增强融合蛋白的药代动力学的CFXTEN,其中所述融合蛋白的表观分子量因子增加至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约7倍、或至少约8倍、或至少约10倍、或至少约12倍、或至少约15倍,且其中相较于未连接于XTEN的相应

FVIII,当向受试者施用时,所述CFXTEN的终末半衰期增加至少约2倍、或至少约4倍、或至少约8倍、或至少约10倍或更多。在其中至少两个XTEN分子并入CFXTEN中的前述实施方案中,XTEN可相同或它们可具有不同的序列组成、净电荷或长度。XTEN可与来自表3、4和13-17的任一者的序列具有至少约80％、或90％、或91％、或92％、或93％、或94％、或95％、或96％、或97％、或98％、或99％序列同一性,且可任选包括一个或多个来自表12的裂解序列,从而有助于自CFXTEN融合蛋白释放一个或多个XTEN。

[0458] 因此,本发明提供CFXTEN组合物,其中融合蛋白的活性程度、生物可用度、半衰期或物理化学特征可通过选择CFXTEN组合物中的XTEN的类型和长度和在CFXTEN组合物中放置XTEN来定制。因此,本发明涵盖以下组合物:其中来自表1的FVIII和来自表3、4或13-17的任一者的XTEN或XTEN片段是例如以选自式I-VIII的任一者的构型产生或XTEN插入在选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位置处以使构建体具有所需性质。

[0459] 本发明提供用以产生CFXTEN组合物的方法,所述CFXTEN组合物相较于类似剂量的未连接于XTEN的相应FVIII,可维持有需要的受试者中的FVIII组分在治疗水平下持续的时期长至少2倍、或至少3倍、或至少4倍、或至少5倍。在所述方法的一个实施方案中,受试者正接受常规防治以预防出血事件。在所述方法的另一实施方案中,受试者正接受针对出血事件的治疗。在所述方法的另一实施方案中,受试者正接受治疗以相对于正常血浆中的FVIII浓度升高促凝血FVIII的循环血液浓度超过1％、或超过1-5％、或超过5-40％。如本文所用的“促凝血”具有它在本领域中的一般性含义且通常是指在体外测定中或在体内促进凝块形成的活性。用以产生可维持FVIII组分在治疗水平下的组合物的方法包括以下步骤:选择一个或多个适于缀合于FVIII以鉴于给定剂量和剂量方案提供所需药代动力学性质的XTEN,产生编码呈本文公开的构型中一种的CFXTEN的基因构建体,用包含编码基因的表达载体转化适当宿主细胞,在适合培养条件下表达融合蛋白,回收CFXTEN,向哺乳动物施用CFXTEN,随后进行测定以验证CFXTEN融合蛋白的药代动力学性质和活性(例如,维持止血或充当促凝血剂的能力)以及施用的组合物的安全性。选择展现所需性质的那些组合物以供进一步使用。通过本文提供的方法产生的CFXTEN可通过连同其它性质一起,维持促凝血FVIII组分的循环浓度在治疗水平下持续增加的时期而导致施用的组合物的功效增加。

[0460] 本发明提供用以测定不同组成或构型的CFXTEN融合蛋白以提供具有所需促凝血程度以及治疗活性和药代动力学性质、以及足够安全性分布的CFXTEN的方法。特定体外和体内测定或动物模型用于评估各构造的CFXTEN和/或待并入CFXTEN中的FVIII组分的活性和功能特征,包括但不限于实施例的测定、表49的那些测定、以及以下测定或本领域中已知的用于测定FVIII的性质和作用的其它所述测定。可进行允许测定凝血活性的功能性测定,如尤其单级凝结测定和两级凝结测定(Barrowcliffe TW,Semin Thromb Hemost.(2002)28(3):247-256)、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定(Belaaouaj AA等,J.Biol.Chem.(2000)275:27123-8;Diaz-Collier JA.Haemost(1994)71:339-46)、显色FVIII测定(Lethagen,S.等,Scandinavian J Haematology(1986)37:448-453)、或动物模型药力学测定,包括出血时间或血栓弹力描记术(TEG或ROTEM)。其它测定包括使用结合或竞争性结合测定来测定CFXTEN对靶标底物的结合亲和力,所述测定如用芯片结合的受体或结合蛋白的Biacore测定或ELISA测定(如美国专利5,534,617中所述)、本文实施例中所述的测定、放射受体测定或本领域中已知的其它测定。用以测定FVIII抑制剂与CFXTEN的结合的其它测定包括毕提

斯达测定或奈美根改进形式的毕提斯达测定。前述测定也可用于评估FVIII序列变体(以单一组分形式或以CFXTEN融合蛋白形式加以测定)且可与天然FVIII进行比较以确定它们是否与天然CF或其某一部分具有相同促凝血活性程度以使它们适于包括在CFXTEN中;例如相较于天然FVIII,活性是至少约10％、或至少约20$、或约30％、或至少约40％、或至少约50％、或至少约60％、或至少约70％、或至少约80％、或至少约90％。

[0461] 剂量最优化对于所有药物都是重要的。CFXTEN的治疗有效剂量或量根据如个体的疾病病况、年龄、性别和重量、以及施用的融合蛋白在个体中引发所需反应的能力的因素而变化。举例来说,FVIII用于呈现有不同出血病状或异常临床参数(例如,中和抗体)的所有患者的标准化单次剂量可能不总是有效的。已经历受手术或具有高效价的FVIII抑制性抗体的具有创伤的甲型血友病患者通常将需要较高剂量和更频繁给药。通常,在与各患者的出血事件的严重性和持续时间一致下在频率、持续时间和单位方面调整剂量水平。因此,CFXTEN是以足以向患者递送治疗有效量的融合蛋白以终止出血的量(如通过标准凝结测定所测量)包括在药学上可接受的载体、递送载体或稳定剂中。考虑这些因素完全属于普通熟练临床医师的知识范围以达成相对于将导致不足效能以使出血的临床改进或遏止得不到实现的那个量,确定CFXTEN的治疗或药理学有效量和适当给药时程的目的。

[0462] 本发明提供用以确定本发明的CFXTEN药物组合物的剂量方案的方法。所述方法包括使用剂量之间的可变时期施用连续多剂治疗有效量的CFXTEN药物组合物以确定足以实现和/或维持所需参数、血液水平或临床作用的给药间隔;在有效间隔下的所述连续多剂治疗有效量确定CFXTEN用于因子VIII相关疾病病况或病状的治疗有效剂量方案。防治有效量是指CFXTEN的为预防生理或临床结果或事件所必需的时期所需的量;所述结果或事件例如出血事件延迟发作或维持促凝血FVIII或等效物的血液浓度高于阈值水平(例如,正常值的1-5％至5-40％)。在治疗方法中,向受试者施用的CFXTEN的剂量在用于受试者的每剂约5至300IU/kg、或约10至100IU/kg、或约20至约65IU/kg、或约20至约40IU/kg的范围内。适合剂量也可取决于可影响对药物的反应的其它因素;例如,相较于防治,出血事件通常需要在更频繁间隔下的较高剂量。

[0463] 在一些实施方案中,方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含CFXTEN融合蛋白组合物和至少一种药学上可接受的载体的药物组合物,其中相较于通过施用包含未连接于XTEN的FVIII且在类似剂量下施用的药物组合物介导的对参数、病状或临床结果的作用,所述施用导致至少一个与FVIII缺乏或凝血病变相关的参数或生理病状得以较大改进,或产生由CFXTEN的FVIII组分介导的更有利临床结果。改进的参数的非限制性实例包括促凝血FVIII的血液浓度、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定时间减少、单级或两级凝结测定时间减少、出血事件的发作延迟、显色FVIII测定时间减少、出血时间减少、出血事件解决、或相对于天然FVIII,针对CFXTEN的毕提斯达效价降低。在一个前述实施方案中,改进是通过在实现促凝血FVIII(或等效物)的循环浓度高于阈值水平(例如,正常FVIII水平的1-5％至5-40％)的剂量下施用CFXTEN药物组合物,由此产生治疗有效剂量来实现。在另一前述实施方案中,改进是通过使用维持促凝血FVIII(或等效物)的循环浓度高于阈值水平(例如,正常FVIII水平的1-5％至5-40％)持续给药时期的时长的治疗有效剂量方案,施用连续多剂CFXTEN药物组合物来实现。在所述方法的另一实施方案中,使用维持促凝血FVIII(或等效物)的循环浓度高于正常FVIII水平的约1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、30％或

40％持续以下时期的治疗有效剂量方案施用至少连续两剂CFXTEN药物组合物:相较于未连接于XTEN且使用治疗有效剂量方案施用的FVIII,长至少约3倍;或者长至少约4倍;或者长至少约5倍;或者长至少约6倍;或者长至少约7倍;或者长至少约8倍;或者长至少约9倍或长至少约10倍。

[0464] 在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN且在类似剂量方案下向受试者施用的融合蛋白的相应生物活性蛋白质,在治疗有效剂量方案下施用的CFXTEN或包含CFXTEN的药物组合物导致融合蛋白的血液水平的至少两个连续C_{max}峰值和/或C_{min}谷底值之间的时间增加长至少约3倍;或者长至少约4倍;或者长至少约5倍;或者长至少约6倍;或者长至少约7倍;或者长至少约8倍;或者长至少约9倍或长至少约10倍。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN且使用FVIII的治疗有效剂量方案向受试者施用的相应生物活性蛋白质组分,使用较小频率给药或以IU计的较低总剂量的药物组合物的融合蛋白,在治疗有效剂量方案下施用的CFXTEN导致一个、或两个、或三个或更多个测量参数类似改进。测量参数包括本文公开的临床、生物化学或生理参数的任一者,或本领域中已知的用于评估患有因子VIII相关病状的受试者的其它参数。

[0465] (b)CFXTEN的药理学和医药性质

[0466] 本发明提供包含共价连接于XTEN的FVIII的CFXTEN组合物,其相较于未连接于XTEN的FVIII具有增强的医药和药理学性质,以及提供用以增强组合物的FVIII组分的治疗和/或促凝血作用的方法。此外,本发明提供相较于含有白蛋白、免疫球蛋白多肽配偶体、长度较短的多肽和/或具有重复序列的多肽配偶体的因子VIII的那些本领域已知融合蛋白,具有增强的性质的CFXTEN组合物。此外,CFXTEN融合蛋白提供超过化学缀合物(如FVIII的聚乙二醇化构建体)的显著优势,值得注意的是以下事实:重组CFXTEN融合蛋白可在宿主细胞表达系统中制备,相较于聚乙二醇化缀合物,此可降低在产物的研究和开发阶段与制造阶段两者的时间和成本,以及产生来自CFXTEN的产物与代谢物两者的毒性较小的更均质确定产物。

[0467] 作为治疗剂,CFXTEN具有超过不包含XTEN的治疗剂的许多优势,包括一种或多种以下非限制性性质:溶解度增加、热稳定性增加、免疫原性降低、表观分子量增加、肾清除率降低、蛋白水解降低、代谢降低、治疗效率增强、随着能够维持患有甲型血友病的受试者的止血的剂量之间的时间增加而使剂量方案的频率较小、能够皮下或肌肉内施用CFXTEN组合物、当皮下或肌肉内施用时“定制”的吸收速率、冻干稳定性增强、血清/血浆稳定性增强、终末半衰期增加、在血流中的溶解度增加、由中和抗体的结合降低、主动清除降低、定制的底物结合亲和力、对降解稳定、对冷冻一融化稳定性、对蛋白酶稳定、对泛素化稳定、施用简易、可与其它医药赋形剂或载体相容、在受试者中持久、储存稳定性增加(例如,保存期限增加)等。性质增强的净作用是相较于未连接于XTEN的FVIII,使用CFXTEN组合物可导致治疗作用总体增强,产生与给药频率较小相关的经济效益,和/或当向患有因子VIII相关病状的受试者施用时导致患者顺应性改善。

[0468] 本发明提供CFXTEN组合物和包含CFXTEN的药物组合物,其中施用组合物导致本文公开为适用于评估受试者疾病、病状或病症的临床或生物化学参数的至少一者改进。改进的参数的非限制性实例包括促凝血FVIII的血液浓度、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定时间减少、单级或两级凝结测定时间减少、出血事件的发作延迟、显色FVIII测定时间减少、出

血时间减少、出血事件解决、或相对于天然FVIII,针对CFXTEN的毕提斯达效价降低。主题CFXTEN的药代动力学性质增强允许相较于未连接于XTEN的相应FVIII组分,使用累积较低IU剂量的融合蛋白来维持参数。在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII组分,实施方案的CFXTEN的以IU计的为实现和维持至少一个参数持续约2-7天改进所需的总剂量低至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或低至少约10倍。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII组分,主题CFXTEN的以IU计的为历经连续两剂、三剂或四剂实现和维持至少一个参数改进所需的总剂量低至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或低至少约10倍。或者,本发明提供CFXTEN的某些实施方案,其中相较于未连接于XTEN且在类似IU剂量下施用的相应FVIII组分,导致实现和维持至少一个参数改进的连续使用之间的时期长至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍、或至少约8倍、或至少约10倍。或者,本发明提供CFXTEN的某些实施方案,其中当在施用之后约2-7天测定时,相较于25IU/kg未连接于XTEN的相应FVIII,施用25IU/kg导致甲型血友病受试者中的aPTT测定(或类似凝血测定)时间改进30%。在另一实施方案中,本发明提供CFXTEN,其中当在施用之后约2-7天测定时,相较于25IU/kg未连接于XTEN的相应FVIII,施用25IU/kg导致甲型血友病受试者中的出血时间测定时间改进30%。

[0469] 在一个实施方案中,作为融合配偶体的XTEN增加FVIII有效负载的溶解度。因此,当增强FVIII的医药或物理化学性质(如水溶性或稳定性程度)合乎需要时,可各自选择并入融合蛋白中的XTEN序列的长度和/或基序家族组成以对相应融合蛋白赋予不同溶解性和/或稳定性程度以使CFXTEN组合物的总体医药性质得以增强。可使用本文所述的方法构建和测定CFXTEN融合蛋白以确认XTEN长度序列的物理化学性质和选择或视需要调整的位置以产生所需性质。在一个实施方案中,相较于未连接于XTEN的FVIII,CFXTEN的水溶性大至少约25%,或大于未连接于XTEN的相应FVIII至少约30%、或至少约40%、或至少约50%、或至少约75%、或至少约100%、或至少约200%、或至少约300%、或至少约400%、或至少约500%、或至少约1000%。

[0470] 本发明提供用以自宿主细胞产生和回收表达的CFXTEN的方法,所述CFXTEN相较于未连接于XTEN的FVIII具有增强的溶解度和回收简易性。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:用编码具有一个或多个累积序列长度大于约100、或大于约200、或大于约400、或大于约600、或大于约800、或大于约1000、或大于约2000、或大于约3000个氨基酸残基的XTEN组分的CFXTEN的多核苷酸转化真核宿主细胞,在适合培养和诱导条件下在所述宿主细胞中表达CFXTEN融合蛋白,以及以可溶性形式回收表达的融合蛋白。在一个实施方案中,相较于一个或多个选自表4和13-17的任一者的XTEN或其片段,CFXTEN融合蛋白的一个或多个XTEN各自具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性,且相较于选自表1的FVIII,FVIII具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%、或约99%、或100%序列同一性,且CFXTEN组分是呈选自本文公开的任一构型实施方案的N末端至C末端构型。

[0471] VI).CFXTEN组合物的用途

[0472] 本发明提供用于通过施用包含CFXTEN的组合物来在因子VIII相关病状中实现有

益作用的方法和方案。如本文所用,“因子VIII相关病状”意图包括但不限于因子VIII缺乏症、与因子VIII缺乏相关的出血病症、甲型血友病、由抗FVIII抗体或其它因子VIII抑制剂中和因子VIII、以及由创伤或手术或血管损伤引起的出血事件和可通过向受试者施用FVIII来改善或纠正的其它此类病状。本发明方法在解决使用具有相对短暂终末半衰期,需要频繁施用,由抑制剂中和或具有不利药物经济学的因子VIII制剂的其它治疗方法的缺点和/或限制时实现有益作用。

[0473] 止血由多个蛋白质因子调控,且已发现所述蛋白质以及其类似物在治疗因子VIII相关病状方面具有效用。然而,在管理为所述病状所烦扰的受试者方面,可商购获得的FVIII的使用已遭遇未达到最优的成功。具体来说,给药的剂量最优化和频率对于FVIII用于为止血所需的维持循环FVIII浓度高于阈值水平以及治疗或预防甲型血友病受试者的出血事件而言是重要的。可商购获得的FVIII产品具有短暂半衰期的事实使得必须频繁给药以实现临床益处,此导致难以管理所述患者。

[0474] 如由国际血栓形成和止血学会的科学和标准化委员会的因子VIII和因子IX附属委员会所确定(于2000年11月29日在ISTH网站上公布),甲型血友病的最广泛使用的严重性量度标准是通过测定血浆FVIII促凝血水平的循环浓度来确定,其中因子VIII<1%(<0.01IU/ml)的人士确定为重度;1-5%(0.01-0.05IU/ml)确定为中等重度;且>5-40%(0.05-<0.40IU/ml)确定为轻度,其中正常值是1IU/ml因子VIIIC(100%)。

[0475] 本发明提供治疗罹患因子VIII相关病状或处于发展因子VIII相关病状的风险下的受试者的方法。更具体来说,本发明提供用于治疗或预防控制受试者的出血的方法。受试者可为任何动物,但优选是人。在一个实施方案中,所述方法包括向有需要的受试者施用凝血有效量的CFXTEN组合物。在另一实施方案中,所述方法包括以下步骤:向出血的受试者施用凝血有效量的包含CFXTEN的药物组合物,其中所述施用导致出血遏止或减弱。如本文所用,“凝血有效量”是当向受试者施用时,FVIII组合物足以实现止血或其它有益或所需治疗(包括预防)结果的量。在实施本发明时,应了解凝血有效量可以一次或多次施用加以施用。待施用的药物组合物的准确凝血有效量将由从业者的判断来指导,然而,单位剂量将通常取决于出血的严重性或原因以及受试者中预先存在的FVIII的量。在治疗出血的方法的一特定实施方案中,向遭受出血事件的受试者施用凝血有效量的包含CFXTEN的药物组合物,其中相较于未连接于XTEN且在类似剂量下向具有类似出血的类似受试者施用的FVIII,所述施用导致出血解决的持续时间长至少2倍、或至少3倍、或至少4倍。

[0476] 在另一实施方案中,当在施用之后2天与7天之间测量时,相较于未连接于XTEN的FVIII,向患有因子VIII相关病状的受试者施用凝血有效量的CFXTEN组合物导致一个或多个与所述FVIII病状相关的生物化学、生理或临床参数改进10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%或更多。在另一实施方案中,相较于由未连接于XTEN且在类似剂量下施用的FVIII实现的时期,向有需要的受试者施用凝血有效量的CFXTEN组合物导致一个或多个与所述FVIII病状相关的生物化学、生理或临床参数改进持续的时期长至少2倍、或长至少4倍、或长至少5倍、或长至少6倍。持续较长持续时间改进的参数的非限制性实例包括促凝血FVIII的血液浓度、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定时间减少、单级或两级凝结测定时间减少、出血事件的发作延迟、显色FVIII测定时间减少、出血时间减少以及本领域中已知的其它FVIII相关参数。在段落的前述实施方案中,施用的CFXTEN包含与表1的因子

VIII具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约97％、或至少约99％序列同一性的FVIII以及一个或多个与表4的XTEN具有至少约80％、或至少约90％、或至少约95％、或至少约97％、或至少约99％序列同一性的XTEN序列,所述XTEN序列在一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9或如图8-9中所描绘的位置处插入所述FVIII中。在某些实施方案中,CFXTEN的至少一个XTEN插入位点选自氨基酸32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910(相对于成熟天然人FVIII加以编号)。

[0477] 在治疗方法的一特定实施方案中,向罹患甲型血友病的受试者施用的CFXTEN融合蛋白的凝血有效量足以使循环FVIII促凝血浓度增加至大于0.05IU/ml且维持止血持续至少约24小时、或至少约48小时、或至少约72小时、或至少约96小时、或至少约120小时、或至少约144小时、或至少约168小时或更长。在另一实施方案中,相较于在施用类似量的未连接于XTEN的相应FVIII之后于受试者中的测定时间,向有需要的受试者施用凝血有效量的包含CFXTEN的药物组合物导致在施用之后2-7天,来自所述受试者的血液样本的单级凝结测定时间较大降低至少约5％、或约10％、或约20％、或约30％、或约40％、或约50％、或约60％、或约70％或更多。在另一实施方案中,相较于在施用类似量的未连接于XTEN的相应FVIII之后于受试者中的活化的部分凝血酶原时间,向有需要的受试者施用治疗有效量的CFXTEN或包含CFXTEN的药物组合物导致在施用之后2-7天,来自所述受试者的血液样本的活化的部分凝血酶原时间较大降低至少约5％、或约10％、或约20％、或约30％、或约40％、或约50％、或约60％、或约70％或更多。在另一实施方案中,相较于未连接于XTEN且使用类似剂量向受试者施用的FVIII的时期,使用治疗有效量向有需要的受试者施用CFXTEN或包含CFXTEN的药物组合物导致维持来自所述受试者的血液样本的活化的部分凝血酶原时间在正常值的30％内持续的时期长至少2倍、或至少约3倍、或至少约4倍。

[0478] 在治疗方法的一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白是以包含CFXTEN与药学上可接受的赋形剂的混合物的药物组合物形式配制和施用。用于制备医药制剂的方法在本领域中是熟知的。技术和制剂通常可见于Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.,Easton,Pa.1990中(也参见Wang和Hanson,Parenteral Formulations ofProteins and Peptides:Stability and Stabilizers,Journal of Parenteral Science and Technology,Technical Report第10期,增刊42-2S(1988))。

[0479] 在另一方面,本发明提供一种用于治疗甲型血友病患者的方案,所述方案包括包含CFXTEN融合蛋白的组合物。在用于治疗甲型血友病患者的方案的一个实施方案中,所述方案进一步包括确定为在患者中实现止血所需的包含CFXTEN的药物组合物的量的步骤。在方案的一些实施方案中,相较于在另外相同剂量方案下的未连接于XTEN的相应凝血因子,向有需要的受试者施用小约2倍、或小约3倍、或小约4倍、或小约5倍、或小约6倍、或小约8倍、或小约10倍的较小IU量的包含CFXTEN的药物组合物,且融合蛋白实现与未连接于XTEN的相应FVIII类似的曲线下面积(以IU/ml计)和/或类似的治疗作用;(ii)相较于在另外相同剂量量下的未连接于XTEN的相应FVIII,药物组合物是以较小频率(例如每3天、约每7天、约每10天、约每14天、约每21天、或约每月)施用,且融合蛋白实现与未连接于XTEN的相应凝血因子类似的曲线下面积和/或类似的治疗作用;或(iii)相较于在另外相同剂量时程下的未连接于XTEN的相应FVIII,施用小于至少约20％、或约30％、或约40％、或约50％、或约60％、或约70％、或约80％、或约90％的累积较小IU量的药物组合物且CFXTEN融合蛋白实现

与未连接于XTEN的相应FVIII类似的治疗作用。累积较小IU量持续至少约1周、或约14天、或约21天、或约1个月的时期被测量到。在前述实施方案中,治疗作用可由本文所述的任何测量参数来确定,所述参数包括但不限于促凝血FVIII的血液浓度、活化的部分凝血酶原(aPTT)测定时间减少、单级或两级凝结测定时间减少、出血事件的发作延迟、显色FVIII测定时间减少、出血时间减少、出血事件解决、或相对于天然FVIII,针对CFXTEN的毕提斯达效价降低、纤维蛋白原水平、或本领域中已知的用于评估FVIII的凝血病变的其它测定值。在另一实施方案中,本发明提供用于治疗甲型血友病受试者的方案中的CFXTEN,所述方案包括在有效量下以连续两剂或更多剂向受试者施用CFXTEN组合物,其中相较于未连接于XTEN且使用类似剂量施用的FVIII,所述施用导致至少一个、两个或三个与疾病相关的参数较大改进至少10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%、或90%。

[0480] 在一方面,本发明涉及一种预防或治疗具有预先存在的针对FVIII的抑制剂的患者,任选甲型血友病患者的出血的方法。针对FVIII的抑制性抗体通常在血友病患者中产生,其中产生抑制剂的总体发生率是15-30%,特别是在大量暴露于FVIII浓缩物的血友病患者中(Algiman等Natural antibodies to factor VIII(anti-hemophilic factor)in healthy individuals.PNAS USA (1992)89:3795-3799)。然而,抑制性抗体也存在于患有自体免疫病症、恶性肿瘤(如淋巴组织增生病症、淋巴瘤和实体肿瘤)、处于妊娠期间以及处于分娩后状态下的患者中。抑制也可发生在抗体干扰FVIII结合FIX和FX时。同时或或者,抗FVIII抗体可干扰血管性血友病因子和/或磷脂结合FVIII,从而影响FVIII的凝血作用和/或半衰期。常首先与如容易瘀血和出血不受控制的症状一起检测到抑制性抗体的存在,且通常称为获得性血友病。可通过包括在凝血测定中定量抗FVIII活性、针对FVIII抑制剂的ELISA以及使用色谱和免疫吸附进行纯化的不同方法测定抗FVIII抗体(Algiman等,1992)。因此,本发明方法用于治疗或预防与存在针对FVIII的抑制性抗体相关或特征在于存在针对FVIII的抑制性抗体的任何病状。在一个实施方案中,本发明提供一种治疗具有预先存在的针对FVIII的抑制剂的患者的方法,所述方法包括向患者施用必须施用以实现止血的凝血有效量的CFXTEN融合蛋白的步骤,其中相较于未连接于XTEN的FVIII(或天然FVIII)的必须施用以实现止血的量,施用的融合蛋白的所述凝血有效量降低。在所述方法中,相较于未连接于XTEN的相应FVIII,以IU/kg计,CFXTEN的降低的量是小约2倍、或3倍、或4倍、或5倍。在所述方法的另一实施方案中,相较于为实现止血所需的未连接于XTEN的相应FVIII或天然FVIII,CFXTEN的以用以实现止血的剂量施用的量小至少20至40IU/kg、或30至60IU/kg、或40至80IU/kg、或60至100IU/kg、或100至140IU/kg、或120至180IU/kg、或140至200IU/kg。在另一实施方案中,本发明提供一种处理针对未连接于XTEN的FVIII的效价是至少10、或20、或30、或40、或50、或75、或100、或150、或200个或200个以上毕提斯达单位的甲型血友病受试者的出血事件的方法,其中相较于未连接于XTEN的FVIII(或天然FVIII)的必须施用以在类似受试者中实现止血的量,CFXTEN融合蛋白的为遏止所述出血事件所需的剂量小至少2倍、或3倍、或4倍、或5倍、或6倍、或7倍、或8倍、或9倍、或10倍。本领域技术人员将了解,施用以维持止血的促凝血剂的量将取决于FVIII缺乏的严重性和/或出血的频率或持续时间。

[0481] 本发明的一特定目标涉及由结合因子VIII的A2和/或C2结构域的FVIII抑制剂的结合降低的CFXTEN作为药物的用途。所述药物有利地用于在罹患血友病的患者中维持止血,其中所述患者具有针对因子VIII的A2结构域和/或C2结构域的循环FVIII抑制剂。在一

个实施方案中,本发明提供一种治疗方法,所述方法包括向具有A2结构域结合抑制剂的患者施用凝血有效量的CFXTEN融合蛋白的步骤,其中相较于未连接于XTEN的FVIII或天然FVIII,CFXTEN展现至少10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%或更低与结合FVIII的A2结构域的抑制剂的结合,且其中所述施用导致止血。在另一实施方案中,本发明提供一种治疗方法,所述方法包括向具有C2结构域结合抑制剂的患者施用凝血有效量的CFXTEN融合蛋白的步骤,其中相较于未连接于XTEN的FVIII或天然FVIII,CFXTEN展现至少10%、或20%、或30%、或40%、或50%、或60%、或70%、或80%或更低与结合FVIII的C2结构域的抑制剂的结合,且其中所述施用导致止血。可通过检测FVIII抑制剂的ELISA直接测定主题CFXTEN的结合降低,或通过证明在如通过如本文所述的因子VIII显色测试或一步测定或本领域中已知的其它适合凝血方法测量的抑制剂存在下,相较于天然FVIII,对CFXTEN的FVIII活性的抑制降低来间接测量主题CFXTEN的结合降低。或者,可通过使用改进毕提斯达测定,在已知抑制剂存在下测量对主题CFXTEN的抑制降低(或不存在抑制)。根据本发明的一特定方面,适用于方法中的CFXTEN与来自表10的一种或多种抗体以及见于血友病患者中的天然存在的抗体的反应性降低。出于测试目的,所述抑制性抗体和其它抑制性抗体可自人(即自具有抑制性抗体的患者的血清)获得或可通过用FVIII或其片段,更具体来说用包含全部或部分A2或C2结构域的片段(无论呈多克隆或单克隆形式)免疫来自小鼠、天竺鼠、马、山羊、非人灵长类动物和其它哺乳动物获得。

[0482] 本发明进一步涵盖根据本文提供的方法使用的CFXTEN可连同适用于治疗因子VIII相关病状或凝血因子是其辅助疗法的病状;例如归因于损伤或手术的出血事件的其它治疗方法和组合物(例如,其它凝血蛋白质)一起施用。

[0483] 在另一方面,本发明提供制备用于因子VIII相关病状的药物的方法,其包括组合选自表1的因子VIII序列与一个或多个选自表4的插入一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的插入位点中的XTEN以产生保留天然FVIII的至少一部分活性的药物。本发明提供一种制备药物组合物的方法,其包括组合前述实施方案的药物与至少一种药学上可接受的载体的步骤。在制备用于因子VIII相关病状的药物的方法的一个实施方案中,因子VIII具有相较于选自表1的序列,具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或至少约99%序列同一性的序列,且一个或多个XTEN具有相较于选自表3、4和13-17的任一者的序列或其片段,具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或至少约99%序列同一性的序列,其中所述一个或多个XTEN插入一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的位置中。在一特定前述实施方案中,至少一个XTEN插入位点选自氨基酸32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910(相对于成熟天然人FVIII加以编号)。在所述方法的另一实施方案中,CFXTEN包含相较于选自表21的任一者的序列具有至少约80%、或至少约90%、或至少约95%、或至少约97%、或至少约99%序列同一性的序列。

[0484] 在另一方面,本发明提供一种用以实现所需药代动力学、药理学或医药性质的制备CFXTEN组合物的方法。一般来说,如图11-13中所说明,设计和产生本发明融合蛋白组合物的步骤包括:(1)选择用以治疗特定病状的FVIII(例如。天然蛋白质、表1的序列、具有活性的类似物或衍生物);(2)选择一个或多个将对所得CFXTEN赋予所需药代动力学和物理化学特征的XTEN(例如,与表4中阐述的序列具有至少80%一致性的序列)(例如,相较于未连

接于XTEN的FVIII,向受试者施用CFXTEN组合物导致融合蛋白维持在0.05-0.4IU/ml以上持续较长时期);(3)确定CFXTEN的所需N末端至C末端构型以实现所需功效或PK参数(例如,选择一个或多个来自表5、表6、表7、表8和表9的插入位点);(4)确定编码构造的CFXTEN的表达载体的设计;(5)用所述表达载体转化适合宿主;以及(6)表达和回收所得分离的CFXTEN融合蛋白。在制备CFXTEN的方法的一个实施方案中,通过应用等式IV评估用于插入的XTEN以使融合蛋白构建体的XTEN半径比率最大,其中产生大于2.0、或2.1、或2.2、或2.3、或2.4、或2.5、或2.6、或2.7、或2.8、或2.9、或3.0的值的XTEN是优选的。对于需要半衰期增加或在最小凝血有效浓度以上花费的时期增加的那些CFXTEN,选择用于并入的XTEN通常具有至少约144、或约288、或约432、或约576、或约864、或约875、或约912、或约923个氨基酸残基,其中单一XTEN将并入CFXTEN中。在另一实施方案中,CFXTEN包含前述长度的第一XTEN,以及约36、或约42、或约72、或约144、或约288、或约576、或约864、或约875、或约912、或约923、或约1000个或更多个氨基酸残基的至少第二XTEN。XTEN在融合蛋白内的位置可包括一个、两个、三个、四个、五个或更多个选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位置。在一个实施方案中,设计方法包括将XTEN插入FVIII中的至少一个选自氨基酸32、220、224、336、339、390、399、416、603、1656、1711、1725、1905和1910(相对于成熟天然人FVIII加以编号)的位点。

[0485] 在另一方面,本发明提供用以相较于天然FVIII,改进制造简易性,导致稳定性增加、水溶性增加和/或容易配制的制备CFXTEN组合物的方法。在一个实施方案中,本发明包括一种增加FVIII的水溶性的方法,其包括在一个、两个、三个、四个、五个或更多个选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位置处使与来自表1的序列具有至少约80%、或约90%、或约95%同一性的所述FVIII连接于一个或多个XTEN的步骤,其中所述XTEN是相较于来自表3、4和13-17的任一者的序列具有至少约80%、或约90%、或约95%序列同一性的序列以使相较于处于未融合状态的FVIII,可在生理条件下实现呈可溶性形式的所得CFXTEN的较高浓度。在一特定实施方案中,CFXTEN包含连接于两个、三个、四个或五个具有至少约24、或约36、或约48、或约60、或约72、或约84、或约96、或约144、或约288个氨基酸残基的插入在选自表5、表6、表7、表8和表9或图8-9的位点处的XTEN的FVIII,其中在生理条件下,融合蛋白的溶解度比未连接于XTEN的相应FVIII大至少3倍,或者比未连接于XTEN的FVIII大至少4倍、或5倍、或6倍、或7倍、或8倍、或9倍、或至少10倍、或至少20倍、或至少30倍、或至少50倍、或至少60倍或更大。当并入融合蛋白中时,有助于XTEN赋予CF的水溶性增加的性质的因素包括XTEN融合配偶体的溶解度较高和在溶液中在XTEN的分子之间的自聚集的程度较低,以及使其中插有XTEN的FVIII外部环的亲水性扩大。在一些实施方案中,所述方法产生一种CFXTEN融合蛋白,其中相较于未融合FVIII,在生理条件下,水溶性大至少约20%、或至少约30%、或至少约50%、或至少约75%、或至少约90%、或至少约100%、或至少约150%、或至少约200%、或至少约400%、或至少约600%、或至少约800%、或至少约1000%、或至少约2000%。在一个实施方案中,CFXTEN融合蛋白的XTEN是相较于来自表3、4和13-17的任一者的序列具有至少约80%、或约90%、或约95%序列同一性的序列。在另一实施方案中,本发明包括一种增加FVIII的保存期限的方法,其包括在一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的位点处使所述FVIII与一个或多个XTEN连接的步骤,其中相较于处于未融合状态的FVIII,所得CFXTEN的保存期限得以延长。如本文所用,保存期限是指呈溶液、冻干、或某一其它储存制剂形式的FVIII或CFXTEN的促凝血活性保持稳定而不过度损失活性或保持在对

于药物组合物确定的发布规格内所历经的时期。相较于保持溶解的FVIII,降解或聚集的FVIII通常具有降低的功能活性或降低的生物可用度。当并入融合蛋白中时,有助于所述方法延长FVIII的储存期限的能力的因素包括水溶性增加、在溶液中的自聚集降低、以及XTEN融合配偶体的热稳定性增加。具体来说,XTEN聚集的倾向较低有助于配制含有较高药物浓度的CF的药物制剂的方法,且XTEN的热稳定性有助于CFXTEN融合蛋白持续延长时期保持可溶和功能活性的性质。所述方法产生具有伸长或延长的保存期限的CFXTEN融合蛋白,其相对于已经受相同储存和处理条件的FVIII标准物展现较大活性。标准物可为未融合全长FVIII或可商购获得的FVIII药物组合物。在一个实施方案中,所述方法包括与一种或多种药学上可接受的赋形剂一起配制分离的CFXTEN的步骤,所述赋形剂增强XTEN保留它的非结构化构象的能力以及对于CFXTEN而言,增强CFXTEN在制剂中保持可溶持续的时间大于相应未融合FVIII的时间的能力。在一个实施方案中,所述方法包括使选自表1的FVIII连接于一个或多个选自表3、4和13-17的任一者的插入在一个或多个选自表5、表6、表7、表8和表9的位点处的XTEN以及与至少一种药学上可接受的赋形剂混合以产生药物组合物,当在至少90天、或至少6个月、或至少12个月的时间点下比较时,所述药物组合物保留经受相同储存和处理条件的FVIII标准物的大于约100%促凝血活性、或大于约105%、110%、120%、130%、150%或200%促凝血活性。也可关于在储存之后剩余的相对于储存开始时的功能活性标准化的功能活性评估保存期限。在一些实施方案中,当在各种温度条件下持续多达2周、或4周、或6周、或6周以上的相同时期经受相同条件时,本发明的CFXTEN药物组合物保留FVIII标准物的多约50%促凝血活性、或多约60%、70%、80%或90%促凝血活性。在一个实施方案中,当在80℃下加热10分钟时,CFXTEN药物组合物保留至少约50%、或约60%、或至少约70%、或至少约80%、且最优选至少约90%或更高它在溶液中的原始活性。在另一实施方案中,当在37℃下加热或维持约7天时,CFXTEN药物组合物保留至少约50%、优选至少约60%、或至少约70%、或至少约80%、或者至少约90%或更高它在溶液中的原始活性。在另一实施方案中,在历经约1小时至约18小时的时期暴露于约30℃至约70℃的温度之后,CFXTEN药物组合物保留至少约80%或更高它的功能活性。在上文于这个段落中所述的前述实施方案中,在给定时间点下,CFXTEN药物组合物的保留活性比包含未连接于XTEN的FVIII的相应药物组合物的保留活性大至少约2倍、或至少约3倍、或至少约4倍、或至少约5倍、或至少约6倍。

[0486] VII).本发明的核酸序列

[0487] 本发明提供编码CFXTEN嵌合融合蛋白的分离的聚核酸和互补于编码CFXTEN嵌合融合蛋白的聚核酸分子的序列,包括其同源变体。在另一方面,本发明涵盖用以产生编码CFXTEN嵌合融合蛋白的聚核酸和互补于编码CFXTEN嵌合融合蛋白的聚核酸分子的序列,包括其同源变体的方法。一般来说且如图11-13中所说明,产生编码CFXTEN融合蛋白的多核苷酸序列以及表达所得基因产物的方法包括装配编码FVIII和XTEN的核苷酸,同框连接组分,将编码基因并入适于宿主细胞的表达载体中,用所述表达载体转化所述适当宿主细胞,以及在导致或允许所述融合蛋白在转化的宿主细胞中表达的条件下培养所述宿主细胞,由此产生生物活性CFXTEN多肽,其是通过本领域中已知的标准蛋白质纯化方法以分离的融合蛋白形式加以回收。分子生物学中的标准重组技术用于制备本发明的多核苷酸和表达载体。

[0488] 根据本发明,编码CFXTEN的核酸序列(或它的互补序列)用于产生指导在适当宿主

细胞中表达CFXTEN融合蛋白的重组DNA分子。出于本发明的目的,编码对应于天然人FVIII的信号肽的信号肽(编码MQIELSTCFFLCLLRFCFS(SEQ ID NO:1611))的核酸可添加至本文所述的任何编码构建体中以有助于CFXTEN融合蛋白的表达和分泌。在一个实施方案中,核酸添加物是ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT(SE QID NO:1613)或其互补序列。

[0489] 若干克隆策略适于执行本发明,其中许多策略用于产生包含编码本发明的CFXTEN组合物的融合蛋白的基因或它的互补序列的构建体。在一些实施方案中,克隆策略用于产生编码包含至少第一FVIII和至少第一XTEN多肽的单体CFXTEN的基因或它们的互补序列。在一个前述实施方案中,基因包含编码FVIII的序列或序列变体。在其它实施方案中,克隆策略用于产生编码单体CFXTEN的基因,其包含编码至少第一FVIII分子的核苷酸或它的互补序列以及编码第一和至少第二XTEN的核苷酸或它们的互补序列,所述核苷酸或互补序列用于转化宿主细胞以表达CFXTEN组合物的融合蛋白。在上文于这个段落中所述的前述实施方案中,基因可进一步包含编码间隔子序列的也编码裂解序列的核苷酸。

[0490] 在设计所需XTEN序列时,发现尽管在产生XTEN编码序列时使用“构筑嵌段”分子方法,但本发明组合物的XTEN的非重复性质也得以实现。这是通过使用编码上述肽序列基序的多核苷酸的文库来实现,所述多核苷酸接着加以连接和/或多聚化以产生编码XTEN序列的基因(参见图11和12以及实施例)。因此,尽管表达的融合蛋白的XTEN可由少至四种不同序列基序的多个单元组成,因为所述基序自身由非重复氨基酸序列组成,所以致使总体XTEN序列是非重复的。因此,在一个实施方案中,XTEN编码多核苷酸包含编码非重复序列或基序的多个多核苷酸,所述多核苷酸被可操作地同框连接且其中所得表达的XTEN氨基酸序列是非重复的。

[0491] 在一种方法中,首先制备含有对应于CFXTEN融合蛋白的DNA序列的构建体。编码组合物的FVIII的DNA是合成获得,自商业来源获得或自使用标准方法自据信具有FVIII mRNA且在可检测水平下表达所述FVIII mRNA的组织或分离的细胞制备的cDNA文库获得。必要时,可使用如Sambrook等(上文)中所述的常规引物延伸程序获得编码序列以检测mRNA的可能尚未逆转录成cDNA的前体和加工中间体。可接着使用聚合酶链反应(PCR)方法来扩增靶标DNA或RNA编码序列以获得足以制备含有FVIII基因的CFXTEN构建体的材料。可接着进行测定以确认杂交全长基因是所需FVIII基因。通过这些常规方法,DNA可自由所述来源制备的cDNA文库方便地获得。FVIII编码基因也可使用自公开可用的数据库、专利或参考文献获得的DNA序列,通过本领域中已知的标准合成程序(例如,使用例如Engels等(Agnew.Chem.Int.Ed.Engl.,28:716-7341989))中所述的一种方法进行的自动化核酸合成)来产生。所述程序在本领域中是熟知的且充分描述于科学和专利文献中。举例来说,序列可根据化学文摘服务(CAS)登记号(由美国化学学会(American Chemical Society)公布)和/或可通过国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)网页(可在万维网上在ncbi.nlm.nih.gov处获得)获得的GenBank登录号(例如基因座ID、NP XXXXX和XP XXXXX)模型蛋白质标识符获得,所述标识符对应于CAS登记或GenBank数据库中的含有目标蛋白质或蛋白质的片段或变体的氨基酸序列的条目。在一个实施方案中,FVIII编码基因编码来自表1的蛋白质序列或其片段或变体。

[0492] 在表达的融合蛋白包含单一FVIII的情况下,接着将编码主题CFXTEN蛋白的FVIII

部分的基因或多核苷酸克隆至在适当转录和翻译序列控制下的是质粒或其它载体的构建体中以在生物系统中达成高水平蛋白质表达。在随后步骤中,通过将编码XTEN的第二基因或多核苷酸邻近编码FVIII的基因且与编码FVIII的基因同框克隆至构建体中来使它遗传融合于编码FVIII基因的N末端和/或C末端的核苷酸。这个第二步骤通过连接或多聚化步骤来发生。在上文于这个段落中所述的前述实施方案中,应了解产生的基因构建体可或者为编码相应融合蛋白的相应基因的互补序列。

[0493] 可在一个或多个步骤中以完全合成方式或通过合成与酶促组合方法(如限制酶介导的克隆、PCR和重叠延伸,包括更充分描述于实施例中的方法)制备编码XTEN的基因。本文公开的方法可例如用于将编码XTEN的多核苷酸的短序列连接至具有所需长度和序列的较长XTEN基因中。在一个实施方案中,方法连接两个或更多个编码约9至14个氨基酸、或约12至20个氨基酸、或约18至42个氨基酸、或约42至约144个氨基酸、或约144至约288个氨基酸、或288至约864个氨基酸或更长、或前述基序或区段长度范围的任何组合的XTEN基序或区段序列的密码子优化寡核苷酸。

[0494] 或者,公开的方法用于使XTEN编码序列多聚化成具有所需长度的较长序列,例如编码XTEN的36个氨基酸的基因可二聚化成编码72个氨基酸的基因,接着144,接着288等。即使在多聚化下,也可通过设计被选择用于所用最短单元的基序的密码子来构建XTEN多肽以使XTEN编码基因具有低重复性或实际上不具有重复性,此可降低重组且增加编码基因在转化的宿主中的稳定性。

[0495] 使用标准基因合成技术自寡核苷酸装配编码具有非重复序列的XTEN的基因。可使用使密码子使用和氨基酸组成最优化的算法进行基因设计。在本发明的一种方法中,产生且接着如上所述装配相对较短XTEN编码多核苷酸构建体的文库。接着将所得基因与编码FVIII或FVIII的区域的基因一起装配,如图11和12中所说明,且所得基因用于转化宿主细胞且产生并回收CFXTEN以评估它的如本文所述的性质。

[0496] 在另一方面,本发明提供包含编码本文所述的CFXTEN融合蛋白实施方案的多核苷酸序列的分离的核酸。在一个实施方案中,分离的核酸包含选自以下的多核苷酸序列:(a)当最优比对时,相较于选自表21的具有类似长度的序列具有至少约80%序列同一性、或约90%、或约91%、或约92%、或约93%、或约94%、或约95%、或约96%、或约97%、或约98%或约99%至约100%序列同一性的序列,或(b)(a)的多核苷酸的互补序列。在另一实施方案中,分离的核酸包含连接于(a)的核酸的5'末端的序列ATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGT(SE Q ID NO:1613)或所述序列的连接于(b)的3'末端的互补序列。

[0497] 多核苷酸文库

[0498] 在另一方面,本发明提供编码XTEN序列的用于装配编码具有所需长度和序列的XTEN的基因的多核苷酸的文库。

[0499] 在某些实施方案中,XTEN编码文库构建体包含编码固定长度的多肽区段的多核苷酸。作为初始步骤,可装配编码9-14个氨基酸残基的基序的寡核苷酸的文库。在一优选实施方案中,装配编码12个氨基酸的基序的寡核苷酸的文库。

[0500] XTEN编码序列区段可二聚化或多聚化成较长编码序列,如图13中所示意性描绘。可通过连接、重叠延伸、PCR装配或本领域中已知的类似克隆技术来进行二聚化或多聚化。

这个方法可重复多次直至所得XTEN编码序列已达到序列和所需长度的组构,从而提供XTEN编码基因。如将了解,编码例如12个氨基酸的基序的多核苷酸的文库可二聚化和/或连接成编码36个氨基酸的多核苷酸的文库。本发明涵盖编码不同长度的基序的文库;所述基序例如是产生编码27至42个氨基酸的文库的9-14个氨基酸的基序。反过来,编码27至42个氨基酸,且优选36个氨基酸(如实施例中所述)的多核苷酸的文库可连续二聚化成含有连续较长长度的编码具有所需长度的XTEN序列的多核苷酸的文库,所述XTEN序列用于并入编码如本文公开的CFXTEN融合蛋白的基因中。

[0501] 一种用以使编码XTEN的DNA序列最优化的更高效方式是基于组合文库。编码XTEN的基因可以区段形式设计和合成以获得各区段的多个密码子形式。这些区段可随机装配成基因的文库以使各文库成员编码相同氨基酸序列,但文库成员包含许多密码子形式。可筛选所述文库中的导致截短产物的高水平表达和/或低丰度的基因。组合基因装配的方法说明于图18中。图18中的基因是自6个碱基片段装配且各片段可以4种不同密码子形式获得。这允许实现理论多样性数值4096。

[0502] 在一些实施方案中,文库是由编码限于特定序列XTEN家族;例如表4的AD、AE、AF、AG、AM或AQ序列的氨基酸的多核苷酸所装配。在其它实施方案中,文库包含编码两个或更多个来自表3的基序家族序列的序列。文库的编码36mer的代表性非限制性多核苷酸序列的名称和序列呈现于表13-17中,且用于产生它们的方法更充分描述于相应实施例中。在其它实施方案中,编码XTEN的文库是由连接在随机化序列中的编码氨基酸的多核苷酸密码子的区段构建,其中至少约80%、或至少约90%、或至少约91%、或至少约92%、或至少约93%、或至少约94%、或至少约95%、或至少约97%、或至少约98%、或至少约99%密码子选自由甘氨酸(G)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)、谷氨酸(E)和脯氨酸(P)氨基酸的密码子组成的组。文库可反过来用于连续二聚化或连接以获得编码XTEN序列的多核苷酸序列文库,所述XTEN序列例如具有42、48、72、144、288、576、864、875、912、923、1318个氨基酸,或多达总长度约3000个氨基酸以及中间长度,其中当作为CFXTEN融合蛋白的组分表达时,编码的XTEN可具有一种或多种本文公开的性质。在一些情况下,多核苷酸文库序列也可包括用作以下更充分描述的“测序岛”的其它碱基。

[0503] 图14是在装配本发明的实施方案中的XTEN多核苷酸构建体和CFXTEN多核苷酸构建体时的代表性非限制性步骤的示意流程图。个别寡核苷酸501退火成序列基序502(如含12个氨基酸的基序(“12-mer”)),502被连接于来自文库的其它序列基序以产生涵盖所需长度的XTEN 504的集合(pool),且502连接于较小浓度的含有BbsI和KpnI限制位点的寡聚物503。将连接产物的所得集合进行凝胶纯化且切割具有所需长度的XTEN的条带,从而产生具有封堵序列(stopper sequence)505的分离的XTEN基因。将XTEN基因克隆至填充载体(stuffervector)中。在这个情况下,载体编码任选CBD序列506和GFP基因508。接着用BbsI/HindIII进行消化以移除507和508且放置终止密码子。接着将所得产物克隆至BsaI/HindIII消化的含有编码FVIII的基因的载体中,从而产生编码FVIII-XTEN融合蛋白的基因500。

[0504] 可将XTEN编码基因的文库克隆至一种或多种本领域中已知的表达载体中。为有助于鉴定良好表达性文库成员,可将文库构建成与报道体蛋白质的融合物。适合报道体基因的非限制性实例是绿色荧光蛋白、荧光素酶(luciferace)、碱性磷酸酶和β-半乳糖苷酶。通

过筛选,可鉴定可以高浓度在所选宿主生物体中表达的短XTEN序列。随后,可产生随机XTEN二聚体的文库且重复针对高水平表达的筛选。随后,可针对许多性质,如表达水平、蛋白酶稳定性或与抗血清的结合来筛选所得构建体。

[0505] 本发明的一个方面在于提供编码融合蛋白的组分的多核苷酸序列,其中序列的产生已经受密码子优化。特别感兴趣的是目标在于改进多肽组合物的表达的密码子优化以及改进编码基因在产生宿主中的遗传稳定性。举例来说,密码子优化对于富含甘氨酸或具有极度重复氨基酸序列的XTEN序列特别重要。密码子优化是使用计算机程序(Gustafsson,C.等(2004)Trends Biotechnol,22:346-53)来进行,其中一些计算机程序使核糖体暂停最小(Coda Genomics Inc.)。在一个实施方案中,可通过构建密码子文库来进行密码子优化,其中文库的所有成员都编码相同氨基酸序列,但其中密码子使用不同。可筛选所述文库中的特别适于大规模产生含有XTEN的产物的高度表达且遗传稳定的成员。当设计XTEN序列时,可考虑许多性质。可使编码DNA序列中的重复性最小。此外,可避免使用或最小化使用产生宿主很少使用的密码子(例如在大肠杆菌中,AGG和AGA精氨酸密码子和一个亮氨酸密码子)。在大肠杆菌的情况下,两个甘氨酸密码子GGA和GGG很少用于高度表达的蛋白质中。因此,编码XTEN序列的基因的密码子优化可极其合乎需要。具有高水平的甘氨酸的DNA序列倾向于具有可导致不稳定性或低表达水平的高GC含量。因此,当可能时,优选的是选择密码子以使XTEN编码序列的GC含量适于将用于制造XTEN的产生生物体。

[0506] 在一个实施方案中,多核苷酸文库是使用公开的方法构建,其中文库的所有成员都编码相同氨基酸序列,但其中序列中相应氨基酸的密码子使用针对预定宿主细胞而不同或加以优化。可筛选所述文库中的特别适于大规模产生含有XTEN的产物的高度表达且遗传稳定的成员。在一个实施方案中,文库是针对在真核宿主细胞中的表达来加以最优化。

[0507] 任选地,可对文库中的克隆进行测序以消除含有不合需要序列的分离物。短XTEN序列的初始文库允许氨基酸序列有某一变化。举例来说,可使一些密码子随机化以使许多亲水性氨基酸可存在于特定位置中。在迭代多聚化的过程期间,除针对高水平表达进行筛选之外,也可筛选所得文库成员的如溶解性或蛋白酶抗性的其它特征。

[0508] 一旦选择编码具有所需长度和性质的XTEN的基因,即通过以下手段使它在所需位置处基因融合于编码FVIII基因的核苷酸:将它邻近编码FVIII的基因且与编码FVIII的基因同框、或者在编码FVIII的邻近结构域的核苷酸之间、或者在编码给定FVIII结构域的序列内、或者与编码连接于末端XTEN的间隔子/裂解序列的核苷酸同框克隆至构建体中。视待编码的CFXTEN而定,本发明提供前述事项的各种排列。举例来说,就编码如由如上描绘的式VI体现的包含FVIII和两个XTEN的CFXTEN融合蛋白的基因而言,所述基因将具有编码FVIII、编码两个在组成和序列长度方面可相同或不同的XTEN的多核苷酸。在一个非限制性前述实施方案中,FVIII多核苷酸将编码因子VIII且编码C末端XTEN的多核苷酸将编码288个氨基酸的XTEN且编码邻近于A2结构域的C末端的内部XTEN的多核苷酸将编码144个氨基酸的XTEN。将FVIII基因克隆至XTEN构建体中的步骤可通过如图14中所示的连接或多聚化步骤来发生。编码CFXTEN融合蛋白的构建体可设计成组分XTEN、CF和间隔子序列的不同构型,如式I-VIII的构型。在一个实施方案中,构建体包含互补于编码各组分按以下顺序(5’至3’)FVIII、在B结构域内部的XTEN、和C末端XTEN的单体多肽的多核苷酸序列的多核苷酸序列,或编码各组分按以下顺序(5’至3’)FVIII、在B结构域内部的XTEN、和C末端XTEN的单

体多肽的多核苷酸序列。在另一实施方案中,构建体包含互补于编码各组分按以下顺序(5'至3')FVIII、连接于C末端的间隔子序列、和XTEN的单体多肽的多核苷酸序列的多核苷酸序列,或编码各组分按以下顺序(5'至3')FVIII、连接于C末端的间隔子序列、和XTEN的单体多肽的多核苷酸序列。间隔子多核苷酸可任选地包含编码裂解序列的序列。如将为本领域技术人员显而易知,FVIII结构域和插入的XTEN的多种排列是可能的。

[0509] 核苷酸或氨基酸序列的同源性、序列相似性或序列同一性也可通过使用已知软件或计算机程序(如BestFit或Gap成对比较程序)常规确定(GCG Wisconsin Package,Genetics Computer Group,575Science Drive,Madison,Wis.53711)。BestFit使用Smith和Waterman(Advances in App;ied Mathematics.1981.2:482-489)的局部同源性算法来得到在两个序列之间具有同一性或相似性的最佳区段。Gap进行整体比对:使用Needleman和Wunsch(Journal of Molecular Biology.1970.48:443-453)的方法比对一个序列的全部与另一类似序列的全部。当使用如BestFit的序列比对程序来确定序列同源性、相似性或同一性的程度时,可使用缺省设置,或可选择适当计分矩阵来使同一性、相似性或同源性计分最优化。

[0510] "互补"的核酸序列是能够根据标准Watson-Crick互补性规则进行碱基配对的核酸序列。如本文所用,术语"互补序列"是指大致上互补的核酸序列,如可通过上述相同核苷酸比较所评估,或如定义为能够在严格条件(如本文所述的那些)下与编码CFXTEN序列的多核苷酸杂交。

[0511] 编码CFXTEN嵌合融合蛋白的所得多核苷酸可接着个别地克隆至表达载体中。核酸序列是通过多种程序插入载体中。一般来说,DNA是使用本领域中已知的技术插入适当的限制核酸内切酶位点中。载体组分通常包括但不限于以下一或多者:信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。构建含有这些组分的一者或多者的适合载体采用为熟练技术人员所知的标准连接技术。所述技术在本领域中是熟知的且充分描述于科学和专利文献中。

[0512] 各种载体是公开可得的。载体可例如呈可方便地经受重组DNA程序的质粒、粘粒、病毒粒子或噬菌体形式,且对载体的选择将常取决于它将引入其中的宿主细胞。因此,载体可为自主复制载体,即以染色体外实体形式存在的载体,其复制不依赖于染色体复制,例如质粒。或者,载体可为当引入宿主细胞中时,整合至宿主细胞基因组中且连同它已整合至其中的染色体一起复制的载体。代表性质粒说明于图17中,其中描绘FVIII和XTEN组分的不同构型的编码区域。

[0513] 本发明提供含有可与宿主细胞相容并由宿主细胞识别,且可操作地连接于CFXTEN基因以控制CFXTEN融合蛋白的表达的复制和控制序列的质粒载体的使用。载体通常携带复制位点以及编码能够提供在转化的细胞中进行表型选择的蛋白质的序列。熟知用于多种细菌、酵母和病毒的所述载体序列。可使用的适用表达载体包括例如染色体、非染色体和合成DNA序列的区段。"表达载体"是指含有可操作地连接于能够实现在适合宿主中表达编码融合蛋白的DNA的适合控制序列的DNA序列的DNA构建体。要求是载体在所选宿主细胞中可复制且可有活力。低或高拷贝数载体可根据需要加以使用。

[0514] 其它适合载体包括但不限于SV40和pcDNA的衍生物以及如由Smith等,Gene 57:31-40(1988)所述的已知细菌质粒(如col EI、pCRl、pBR322、pMal-C2、pET、pGEX)、pMB9及其

衍生物、质粒(如RP4)、噬菌体DNA(如噬菌体I的众多衍生物,如NM989)、以及其它噬菌体DNA(如M13和丝状单链噬菌体DNA);酵母质粒(如2微米质粒或2m质粒的衍生物)以及着丝粒型和整合型酵母穿梭载体;适用于真核细胞中的载体,如适用于昆虫或哺乳动物细胞中的载体;源于质粒和噬菌体DNA的组合的载体,如已被修饰来采用噬菌体DNA或表达控制序列的质粒;等。也可用于本发明中的酵母表达系统包括但不限于非融合pYES2载体(Invitrogen)、融合pYESHisA、pYESHisB、pYESHisC(Invitrogen)、pRS载体等。

[0515] 载体的控制序列包括用以实现转录的启动子、用以控制所述转录的任选操纵子序列、编码适合mRNA核糖体结合位点的序列、以及控制转录和翻译的终止的序列。启动子可为在所选宿主细胞中显示转录活性的任何DNA序列且可源于编码宿主细胞同源或异源蛋白质的基因。

[0516] 适用于在哺乳动物细胞中指导编码FVIII多肽变体的DNA转录的启动子的实例是SV40启动子(Subramani等,Mol.CellBiol.1(1981),854-864)、MT-1(金属硫蛋白基因)启动子(Palmiter等,Science 222(1983),809-814)、CMV启动子(Boshart等,Cell41:521-530,1985)或腺病毒2主要晚期启动子(Kaufman和Sharp,Mol.Cell.Biol,2:1304-1319,1982)。载体也可携带如UCOE(遍在染色质开放元件)的序列。

[0517] 适用于丝状真菌宿主细胞中的启动子的实例是例如ADH3启动子或tpiA启动子。其它适用启动子的实例是源于编码以下的基因的启动子:米曲菌(A.oryzae)TAKA淀粉酶、米黑根毛霉(Rhizomucor miehei)天冬氨酸蛋白酶、黑曲霉(A.niger)中性α-淀粉酶、黑曲霉酸稳定性α-淀粉酶、黑曲霉或泡盛曲霉(A.awamori)葡糖淀粉酶(gluA)、米黑根毛霉脂酶、米曲菌碱性蛋白酶、米曲菌磷酸丙糖异构酶或构巢曲霉(A.nidulans)乙酰胺酶。优选的是TAKA-淀粉酶和gluA启动子。

[0518] 适用于关于原核宿主的表达载体中的启动子包括β-内酰胺酶和乳糖启动子系统[Chang等,Nature,275:615(1978);Goeddel等,Nature,281:544(1979)]、碱性磷酸酶色氨酸(trp)启动子系统[Goeddel,Nucleic Acids Res.,8:4057(1980);EP 36,776]、和杂交启动子,如tac启动子[deBoer等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,80:21-25(1983)],其全部是可操作地连接于编码CFXTEN多肽的DNA。用于细菌系统中的启动子也可含有可操作地连接于编码CFXTEN多肽的DNA的Shine-Dalgarno(S.D.)序列。

[0519] 本发明涵盖使用其它表达系统,包括例如杆状病毒表达系统,所述表达系统与非融合转移载体(如但不限于pVL941(Summers等,Virology 84:390-402(1978))、pVL1393(Invitrogen)、pVL1392(Summers等,Virology 84:390-402(1978)以及Invitrogen)和pBlueBacIII(Invitrogen))与融合转移载体(如但不限于pAc700(Summers等,Virology84:390-402(1978))、pAc701和pAc70-2(与pAc700相同,具有不同阅读框)、pAc360(Invitrogen))两者一起使用,且可使用pBlueBacHisA、pBlueBacHisB、pBlueBacHisC(;Invitrogen)。

[0520] 适用于在哺乳动物细胞中指导编码FVIII多肽变体的DNA转录的启动子的实例是CMV启动子(Boshart等,Cell41:521-530,1985)、SV40启动子(Subramani等,Mol.Cell.Biol.1(1981),854-864)、MT-1(金属硫蛋白基因)启动子(Palmiter等,Science 222(1983),809-814)、腺病毒2主要晚期启动子(Kaufman和Sharp,Mol.Cell.Biol,2:1304-1319,1982)。载体也可携带如UCOE(遍在染色质开放元件)的序列。

[0521] 必要时,编码CFXTEN的DNA序列也可可操作地连接于适合终止子,如hGH终止子(Palmiter等,Science 222,1983,第809-814页)或TPI1终止子(Alber和Kawasaki,J.Mol.Appl.Gen.1,1982,第419-434页)或ADH3(McKnight等,The EMBOJ.4,1985,第2093-2099页)。表达载体也可含有一组位于启动子下游以及CFXTEN序列自身的插入位点上游的RNA剪接位点,包括自腺病毒获得的剪接位点。表达载体中也含有位于插入位点下游的聚腺苷酸化信号。特别优选的聚腺苷酸化信号包括来自SV40的早期或晚期聚腺苷酸化信号(Kaufman和Sharp(同上))、来自腺病毒5E1b区域的聚腺苷酸化信号,即hGH终止子(DeNoto等Nucl.Acids Res.9:3719-3730,1981)。表达载体也可包括位于启动子与RNA剪接位点之间的非编码性病毒前导序列,如腺病毒2三联前导物;和增强子序列,如SV40增强子。

[0522] 为将本发明的CFXTEN引导至宿主细胞的分泌路径中,分泌信号序列(也称为前导序列、前原序列或前序列)可包括在重组载体中。分泌信号序列可操作地连接于编码CFXTEN的DNA序列,通常位于编码CFXTEN融合蛋白的DNA序列的5′。分泌信号序列可通常与天然FVIII蛋白相关或可来自编码另一分泌蛋白的基因。非限制性实例包括用于大肠杆菌表达的OmpA、PhoA和DsbA;用于酵母表达的ppL-α、DEX4、转化酶信号肽、酸性磷酸酶信号肽、CPY或INU1;以及用于哺乳动物表达的IL2L、SV40、IgGκ和IgGλ。信号序列通常在易位和分泌过程期间自蛋白质以蛋白水解方式移除,从而产生确定的N末端。方法公开于Arnau等,Protein Expression and Purification 48:1-13(2006)中。

[0523] 用于连接分别编码CFXTEN、启动子和任选终止子和/或分泌信号序列的DNA序列以及将它们插入含有为复制所必需的信息的适合载体中的程序为本领域技术人员所熟知(参见例如Sambrook,J.等,“Molecular Cloning:A Laboratory Manual,”第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001)。以此方式,在构建体内产生编码单体CFXTEN融合蛋白的嵌合DNA分子。任选地,这个嵌合DNA分子可转移或克隆至作为更适当表达载体的另一构建体中。此时,能够表达嵌合DNA分子的宿主细胞可用嵌合DNA分子转化。

[0524] 用于本发明中的哺乳动物细胞系的非限制性实例是COS-1(ATCC CRL 1650)、COS-7(ATCC CRL 1651)、BHK-21(ATCC CCL 10))和BHK-293(ATCC CRL 1573;Graham等,J.Gen.Virol.36:59-72,1977)、BHK-570细胞(ATCC CRL 10314)、CHO-K1(ATCC CCL 61)、CHO-S(Invitrogen 11619-012)和293-F(Invitrogen R790-7)以及本领域中已知的适用于表达FVIII的亲本和衍生细胞系。tk-ts13BHK细胞系也可根据登录号CRL 1632自ATCC获得。此外,许多其它细胞系可用于本发明内,包括大鼠Hep I(大鼠肝细胞瘤;ATCC CRL 1600)、大鼠Hep II(大鼠肝细胞瘤;ATCC CRL 1548)、TCMK(ATCC CCL 139)、人肺(ATCC HB 8065)、NCTC 1469(ATCC CCL 9.1)、CHO(ATCC CCL 61)和DUKX细胞(Urlaub和Chasin,Proc.Natl.Acad Sci.USA 77:421 6-4220,1 980)。

[0525] 适合的酵母细胞的实例包括酵母属某种(Saccharomyces spp.)或裂殖酵母属某种(Schizosaccharomyces spp.),特别是酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)菌株或克鲁维酵母(Saccharomyces kluyveri)菌株的细胞。用于用异源DNA转化酵母细胞以及自其产生异源多肽的方法例如描述于美国专利号4,599,311、美国专利号4,931,373、美国专利号4,870,008、5,037,743和美国专利号4,845,075中,所述专利全部据此以引用的方式并入本文。转化的细胞是根据由可选择标记物确定的表型、通常抗药性或在不存在特定营养物(例如亮氨酸)下成长的能力来选择。用于酵母中的一优选载体是美国专利号4,931,373中

公开的POT1载体。编码CFXTEN的DNA序列之前可为信号序列和任选例如如上所述的前导序列。适合的酵母细胞的其它实例是克鲁维酵母属(Kluyveromyces)菌株(如乳酸克鲁维酵母(K.lactis))、汉逊酵母属(Hansenula)菌株(例如多形汉逊酵母(H.polymorpha))或毕赤酵母属(Pichia)菌株(例如毕赤酵母(P.pastoris))(参见Gleeson等,J.Gen.Microbiol.132,1986,第3459-3465页;美国专利号4,882,279)。其它真菌细胞的实例是丝状真菌,例如曲霉属某种(Aspergillus spp.)、链孢霉属某种(Neurospora spp.)、镰刀菌属某种(Fusarium spp.)或木霉属某种(Trichoderma spp.),特别是米曲菌菌株、构巢曲霉菌株或黑曲霉菌株的细胞。使用曲霉属某种表达蛋白质描述于例如EP 272277、EP 238023、EP 184438中。尖孢镰刀菌(F.oxysporum)的转化可例如如由Malardier等,1989,Gene 78:147-156所述来进行。木霉属某种的转化可例如如EP244234中所述来进行。

[0526] 可用于本发明中的其它适合细胞包括但不限于原核宿主细胞菌株,如大肠杆菌,(例如菌株DH5-α)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)或假单胞菌属(Pseudomonas)菌株、链霉菌属(Streptomyces)菌株和葡萄球菌属(Staphylococcus)菌株。适合的原核生物的非限制性实例包括来自以下属的那些:游动放线菌属(Actinoplanes);古球状菌属(Archaeoglobus);蛭弧菌属(Bdellovibrio);包柔螺旋体属(Borrelia);绿屈挠菌属(Chloroflexus);肠球菌属(Enterococcus);埃希氏菌属(Escherichia);乳酸杆菌属(Lactobacillus);李斯特菌属(Listeria);海洋芽胞杆菌属(Oceanobacillus);副球菌属(Paracoccus);假单胞菌属(Pseudomonas);葡萄球菌属(Staphylococcus);链球菌属(Streptococcus);链霉菌属(Streptomyces);热原体属(Thermoplasma);和弧菌属(Vibrio)。

[0527] 转染哺乳动物细胞以及表达引入细胞中的DNA序列的方法例如描述于Kaufman和Sharp,J.Mol.Biol.159(1982),601-621;Southern和Berg,J.Mol.Appl.Genet.1(1982),327-341;Loyter等,Proc.Natl.Acad Sci.USA 79(1982),422-426;Wigler等,Cell14(1978),725;Corsaro和Pearson,Somatic CellGenetics 7(1981),603;Graham和van der Eb,Virology52(1973),456;以及Neumann等,EMBOJ 1(1982),841-845中。

[0528] 克隆的DNA序列是通过例如磷酸钙介导的转染(Wigler等,Cell 14:725-732,1978;Corsaro和Pearson,Somatic Cell Genetics 7:603-616,1981;Graham和Van der Eb,Virology52d:456-467,1973)、用如FuGENEG Roche Diagnostics,Mannheim,Germany)或转脂胺(lipofectamine)(Invitrogen)的许多可商购获得的试剂进行转染或通过电穿孔(Neumann等,EMBO J.1:841-845,1982)来引入培养的哺乳动物细胞中。为鉴定和选择表达外源性DNA的细胞,通常将赋予可选择表型的基因(可选择标记物)连同目标基因或cDNA一起引入细胞中。优选的可选择标记物包括赋予对如新霉素(neomycin)、潮霉素(hygromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、博莱霉素(zeocin)和甲氨蝶呤(methotrexate)的药物的抗性的基因。可选择标记物可为可扩增可选择标记物。一优选可扩增可选择标记物是二氢叶酸还原酶(DHFR)序列。可选择标记物的其它实例为本领域技术人员所熟知且包括报道体,如增强的绿色荧光蛋白(EGFP)、β-半乳糖苷酶(β-gal)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。可选择标记物由Thilly(Mammalian Cell Technology,Butterworth Publishers,Stoneham,Mass.,以引用的方式并入本文)加以综述。本领域技术人员将易于能够选择适合的可选择标记物。任何已知的可选择标记物都可加以采用,只要它能够与编码基因产物的核酸同时

表达即可。

[0529] 可选择标记物可与目标基因同时于单独质粒上引入细胞中,或它们可于同一质粒上引入。如果于同一质粒上,那么可选择标记物和目标基因可在不同启动子或相同启动子控制下,后述排列产生双顺反子信息。这个类型的构建体在本领域中是已知的(例如Levinson和Simonsen,美国专利号4,713,339)。也可有利的是向引入细胞中的混合物中添加称为"载体DNA"的其它DNA。

[0530] 在细胞已摄取DNA之后,使它们在适当生长培养基中生长通常1-2天以开始表达目标基因。如本文所用,术语"适当生长培养基"是指含有为细胞生长和目标CFXTEN表达所需的营养物和其它组分的培养基。培养基通常包含碳源、氮源、必需氨基酸、必需糖、维生素、盐、磷脂、蛋白质和生长因子。对于产生γ-羧化蛋白质,培养基将含有优选浓度为约0.1μg/ml至约5μg/ml的维生素K。接着应用药物选择以针对以稳定方式表达可选择标记物的细胞的生长进行选择。对于已用可扩增可选择标记物转染的细胞,可增加药物浓度以针对克隆的序列的拷贝数增加进行选择,由此增加表达水平。接着筛选表达目标FVIII多肽变体的稳定转染的细胞的克隆。

[0531] 接着在允许表达CFXTEN多肽的条件下,在适合营养培养基中培养转化或转染的宿主细胞,此后可自培养物以分离的融合蛋白形式回收所得肽。用于培养细胞的培养基可为适于使宿主细胞生长的任何常规培养基,如含有适当补充物的最小或复合培养基。适合培养基可自商业供应商获得或可根据公开的配方(例如在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的目录中)进行制备。如温度、pH等的培养条件是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,且将为普通熟练技术人员显而易知。

[0532] 可例如通过常规DNA印迹、用以定量mRNA的转录的RNA印迹[Thomas,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:5201-5205(1980)]、点印迹(DNA分析)、或使用基于本文提供的序列的适当标记的探针进行原位杂交来直接测量样本中的基因表达。或者,可采用可识别特定双链体,包括DNA双链体、RNA双链体以及DNA-RNA杂交双链体或DNA-蛋白质双链体的抗体。抗体反过来可被标记且可进行测定,其中双链体结合于表面,以致在表面上形成双链体后,可检测到存在结合于双链体的抗体。

[0533] 或者,基因表达可通过免疫荧光方法来测量,所述方法如细胞或组织切片的免疫组织化学染色以及细胞培养物或体液的测定或可选择标记物的检测以直接定量基因产物的表达。适用于免疫组织化学染色和/或测定样本流体的抗体可为单克隆或多克隆的,且可在任何哺乳动物中制备。合宜的是,抗体可针对天然序列FVIII多肽,或针对基于本文提供的DNA序列的合成肽,或针对融合于FVIII且编码特定抗体表位的外源性序列进行制备。可选择标记物的实例为本领域技术人员所熟知且包括报道体,如增强的绿色荧光蛋白(EGFP)、β-半乳糖苷酶(β-gal)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。

[0534] 表达的CFXTEN多肽产物可通过本领域中已知的方法或通过本文公开的方法加以纯化。可使用如凝胶过滤、亲和纯化(例如使用抗FVIII抗体柱)、盐分级分离、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、羟磷灰石吸附色谱、疏水性相互作用色谱和凝胶电泳的程序;各程序被定制来回收和纯化由相应宿主细胞产生的融合蛋白。额外纯化可通过常规化学纯化手段,如高效液相色谱实现。一些表达的CFXTEN可能需要在分离和纯化期间再折叠。纯化方法描述于Robert K.Scopes,Protein Purification:Principles and Practice,Charles

R.Castor(编),Springer-Verlag 1994以及Sambrook等(上文)中。多步纯化分离也描述于Baron等,Crit.Rev.Biotechnol.10:179-90(1990)以及Below等,J.Chromatogr.A.679:67-83(1994)中。出于治疗目的,优选的是本发明的CFXTEN融合蛋白大致上是纯净的。因此,在本发明的一优选实施方案中,将本发明的CFXTEN纯化至至少约90至95％均质性,优选纯化至至少约98％均质性。纯度可通过例如凝胶电泳、HPLC和氨基末端氨基酸测序来评估。

[0535] VIII).药物组合物

[0536] 本发明提供包含CFXTEN的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含本文公开的CFXTEN融合蛋白与至少一种药学上可接受的载体的混合物。本发明的CFXTEN多肽可根据已知用以制备医药适用组合物的方法来配制,借此多肽与药学上可接受的载体媒介物以混合物形式组合,所述媒介物如水溶液、缓冲剂、溶剂和/或药学上可接受的混悬液、乳剂、稳定剂或赋形剂。非水性溶剂的实例包括丙基乙二醇、聚乙二醇和植物油。通过如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中所述,混合具有所需纯度的活性CFXTEN成分与任选生理可接受的载体、赋形剂(例如,氯化钠、钙盐、蔗糖或聚山梨醇酯)或稳定剂(例如,蔗糖、海藻糖、棉子糖、精氨酸、钙盐、甘氨酸或组氨酸)来以冻干制剂或水溶液形式制备药物组合物的制剂以供储存。

[0537] 药物组合物可以待在施用之前复水的冻干粉末形式供应。在另一实施方案中,药物组合物可以液体形式供应于小瓶中,所述小瓶的内含物可直接向患者施用。或者,组合物是以液体形式供应于用于施用组合物的预填充注射器中。在另一实施方案中,组合物是以液体形式供应于可并入泵中的预填充小瓶中。

[0538] 药物组合物可通过任何适合手段或途径加以施用,包括皮下、通过输注泵皮下、肌肉内和静脉内。应了解优选途径将随接受者的疾病和年龄以及所治疗病状的严重性而变化。

[0539] 在一个实施方案中,呈液体形式或在复水(当以冻干粉末形式供应时)之后的CFXTEN药物组合物包含活性是至少50IU/ml、或至少100IU/ml、或至少200IU/ml、或至少300IU/ml、或至少400IU/ml、或活性是至少500IU/ml或活性是至少600IU/ml的凝血因子VIII,在向需要常规防治的受试者施用因子VIII药物组合物之后,所述组合物能够使因子VIII活性增加至血液中正常血浆水平的至少1.5％持续至少约12小时、或至少约24小时、或至少约48小时、或至少约72小时、或至少约96小时、或至少约120小时。在另一实施方案中,呈液体形式或在复水(当以冻干粉末形式供应时)之后的CFXTEN药物组合物包含活性是至少50IU/ml、或至少100IU/ml、或至少200IU/ml、或至少300IU/ml、或至少400IU/ml、或至少500IU/ml,或活性是至少600IU/ml的凝血因子VIII,在向需要常规防治的受试者施用之后,所述组合物能够使因子VIII活性增加至血液中正常血浆水平的至少2.5％持续至少约12小时、或至少约24小时、或至少约48小时、或至少约72小时、或至少约96小时、或至少约120小时。明确涵盖的是前述药物组合物可被配制来包括一种或多种赋形剂、缓冲剂或本领域中已知的可与通过静脉内途径或皮下途径或肌肉内途径施用相容的其它成分。因此,在上文于这个段落中所述的实施方案中,药物组合物是皮下、肌肉内或静脉内施用。

[0540] 本发明的组合物可使用多种赋形剂来配制。适合的赋形剂包括微晶纤维素(例如Avicel PH102、Avicel PH101)、聚甲基丙烯酸酯、聚(丙烯酸乙酯、甲基丙烯酸甲酯、氯化甲基丙烯酸三甲基铵基乙酯)(如Eudragit RS-30D)、羟丙基甲基纤维素(Methocel K100M、

Premium CR Methocel K100M、Methocel E5、Opadry®)、硬脂酸镁、滑石、柠檬酸三乙酯、水性乙基纤维素分散液(Surelease®)和硫酸鱼精蛋白(protamine sulfate)。缓慢释放剂也可包含载体,其可包括例如溶剂、分散介质、包衣剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂。药学上可接受的盐也可用于这些缓慢释放剂中,例如矿物盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐或硫酸盐;以及有机酸盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐或苯甲酸盐。组合物也可含有液体,如水、生理盐水、甘油和乙醇;以及如湿润剂、乳化剂或pH缓冲剂的物质。脂质体也可用作载体。

[0541] 在另一实施方案中,本发明的组合物被囊封在脂质体中,所述脂质体已显示在以控制方式历经延长时期递送有益活性剂方面具有效用。脂质体是含有包埋水性体积的闭合双层膜。脂质体也可是具有单一膜双层的单层囊泡或具有多个膜双层的多层囊泡,所述膜双层各自由水层与下一膜双层分开。所得膜双层的结构是如此以致脂质的疏水性(非极性)尾部朝向双层的中心定向而亲水性(极性)头部朝向水相定向。在一个实施方案中,脂质体可用避免由单核吞噬细胞系统的器官(主要是肝脏和脾脏)摄取的可挠性水溶性聚合物涂布。适用于围绕脂质体的亲水性聚合物包括但不限于PEG、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙烯甲醚、聚甲基噁唑啉、聚乙基噁唑啉、聚羟基丙基噁唑啉、聚羟基丙基甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酰胺、聚二甲基丙烯酰胺、聚甲基丙烯酸羟丙酯、聚丙烯酸羟乙酯、羟甲基纤维素、羟乙基纤维素、聚乙二醇、聚天冬酰胺和亲水性肽序列,如美国专利号6,316,024;6,126,966;6,056,973;6,043,094中所述,所述专利的内容以引用的方式整体并入本文。其它脂质体技术描述于美国专利号6,759,057;6,406,713;6,352,716;6,316,024;6,294,191;6,126,966;6,056,973;6,043,094;5,965,156;5,916,588;5,874,104;5,215,680;和4,684,479中,所述专利的内容以引用的方式并入本文。这些专利描述脂质体和脂质涂布的微泡以及它们的制造方法。因此,本领域技术人员在考虑本发明的公开内容与这些其它专利的公开内容两者下可产生用于延长释放本发明的多肽的脂质体。

[0542] 对于液体制剂,所需性质是制剂是以可穿过25、28、30、31、32号针的形式供应以达成静脉内、肌肉内、关节内或皮下施用。

[0543] 注射器泵也可用作缓慢释放工具。所述装置描述于美国专利号4,976,696;4,933,185;5,017,378;6,309,370;6,254,573;4,435,173;4,398,908;6,572,585;5,298,022;5,176,502;5,492,534;5,318,540;和4,988,337中,所述专利的内容以引用的方式并入本文。本领域技术人员在考虑本发明的公开内容与这些其它专利的公开内容两者下可产生用于延长释放本发明的组合物的注射器泵。

[0544] IX).药物试剂盒

[0545] 在另一方面,本发明提供一种有助于CFXTEN多肽的使用的试剂盒。所述试剂盒包括本文提供的药物组合物、容器和在所述容器上或与所述容器相伴的标签或药品说明书。适合的容器包括例如由多种材料(如玻璃或塑料)形成的瓶、小瓶、注射器等。容器容纳呈有效治疗FVIII相关病状的制剂形式的药物组合物且可具有无菌入口(例如容器可为具有可由皮下注射针刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。药品说明书可列出核准的药物适应症、用于复水和/或施用药物以用于核准的适应症的说明书、适当剂量和安全性信息、以及标识药物的批号和失效期的信息。在另一前述实施方案中,试剂盒可包括可携带药物组合物的适合稀释剂的第二容器,使用所述稀释剂将向使用者提供待向受试者递送的适当浓度。

[0546] 实施例

[0547] 实施例1:XTEN AD36基序区段的构建

[0548] 以下实施例描述构建一批编码36个氨基酸的基序序列的密码子优化基因。作为第一步,基于pET载体构建填充载体pCW0359且其包括T7启动子。pCW0359编码纤维素结合结构域(CBD)和TEV蛋白酶识别位点,继之以由BsaI、BbsI和KpnI位点侧接的填充序列。插入BsaI和BbsI位点以使在消化之后它们产生可相容的突出。填充序列继之以截短形式的GFP基因和His标签。填充序列含有终止密码子且因此携带填充质粒pCW0359的大肠杆菌细胞形成非荧光菌落。填充载体pCW0359用BsaI和KpnI消化以移除填充区段且所得载体片段通过琼脂糖凝胶纯化加以分离。序列被指定为反映AD基序家族的XTEN_AD36。它的区段具有氨基酸序列[X]3,其中X是具有以下序列的12mer肽:GESPGGSSGSES(SEQ ID NO:19)、GSEGSSGPGESS(SEQ ID NO:20)、GSSESGSSEGGP(SEQ ID NO:21)或GSGGEPSESGSS(SEQ ID NO:22)。插入物是通过使以下数对磷酸化合成寡核苷酸对退火来获得:

[0549] AD1for:AGGTGAATCTCCDGGTGGYTCYAGCGGTTCYGARTC(SEQ ID NO:1619)

[0550] AD1rev;ACCTGAYTCRGAACCGCTRGARCCACCHGGAGATTC(SEQ ID NO:1620)

[0551] AD2for:AGGTAGCGAAGGTTCTTCYGGTCCDGGYGARTCYTC(SEQ ID NO:1621)

[0552] AD2rev:ACCTGARGAYTCRCCHGGACCRGAAGAACCTTCGCT(SEQ ID NO:1622)

[0553] AD3for:AGGTTCYTCYGAAAGCGGTTCTTCYGARGGYGGTCC(SEQ ID NO:1623)

[0554] AD3rev:ACCTGGACCRCCYTCRGAAGAACCGCTTTCRGARGA(SEQ ID NO:1624)

[0555] AD4for:AGGTTCYGGTGGYGAACCDTCYGARTCTGGTAGCTC(SEQ ID NO:1625)

[0556] 我们也使磷酸化寡核苷酸3KpnIstopperFor:AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQID NO:1626)和非磷酸化寡核苷酸pr_3KpnIstopperRev:CCTCGAGTGAAGACGA(SEQ ID NO:1627)退火。连接退火的寡核苷酸对,此产生具有表示不同数目的连接于一个BbsI/KpnI区段的12mer重复序列的不同长度的产物的混合物。通过制备型琼脂糖凝胶电泳自混合物分离对应于36个氨基酸的长度的产物且连接至BsaI/KpnI消化的填充载体pCW0359中。指定为LCW0401的所得文库中的大多数克隆在诱导之后显示绿色荧光,此显示XTEN AD36的序列已与GFP基因同框连接且XTEN AD36的大多数序列具有良好表达水平。

[0557] 我们通过将分离物压印于含有IPTG的琼脂板上来筛选96个来自文库LCW0401的分离物中具有高荧光水平的分离物。通过PCR评估相同分离物且48个分离物被鉴定含有具有36个氨基酸的区段以及强烈荧光。对这些分离物进行测序且39个克隆被鉴定含有正确XTEN AD36区段。这些区段的核苷酸和氨基酸构建体的文件名称和序列列于表13中。

[0558] 表13:AD 36-mer基序的DNA和氨基酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO203-278)

[0559]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0401_001_GFP-N_A01.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_002_GFP-N_B01.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSSESGSSEGGP	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_003_GFP-N_C01.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_004_GFP-N_D01.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_007_GFP-N_F01.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_008_GFP-N_G01.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGTGAATCCTCA
LCW0401_012_GFP-N_H01.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAGTCTTCA
LCW0401_015_GFP-N_A02.ab1	GSSESGSSEGGPGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_016_GFP-N_B02.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA

[0560]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0401_020_GFP-N_E02.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSSESGSSEGGP	GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAATCTTCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA
LCW0401_022_GFP-N_F02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_024_GFP-N_G02.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_026_GFP-N_H02.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_027_GFP-N_A03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAGTCA GGTTCTGGTGGTGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_028_GFP-N_B03.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCA
LCW0401_030_GFP-N_C03.ab1	GESPGGSSGSESGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGTGAGTCCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAGTCTTCA
LCW0401_031_GFP-N_D03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGP	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA
LCW0401_033_GFP-N_E03.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGTGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_037_GFP-N_F03.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSEGSSGPGESS	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGCGAGTCTTCA
LCW0401_038_GFP-N_G03.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGTGAGTCTTCA GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_039_GFP-N_H03.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_040_GFP-N_A04.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSSESGSSEGGP	GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGCGGTCCA GGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA GGTTCTTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGTGGTCCA
LCW0401_042_GFP-N_C04.ab1	GSEGSSGPGESSGESPGG SSGSESGSEGSSGPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAGTCTTCA GGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCCTCA
LCW0401_046_GFP-N_D04.ab1	GSSESGSSEGGPGSSESG SSEGGPGSSESGSSEGGP	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGTGGTCCA
LCW0401_047_GFP-N_E04.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCTTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_051_GFP-N_F04.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGCGAGTCTTCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAGTCA
LCW0401_053_GFP-N_H04.ab1	GESPGGSSGSESGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTGAATCTCCTGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAGTCA GGTGAATCTCCTGGTGGTTCTAGCGGTTCTGAATCA
LCW0401_054_GFP-N_A05.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCAGGTGAATCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_059_GFP-N_D05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGESPGGSSGSES	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAATCTTCA GGTGAATCTCCAGGTGGCTCTAGCGGTTCCGAATCA

[0561]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0401_060_GFP-N_E05.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCCGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCCGAGGGTGGTCCA GGTTCCGGTGGTGAACCTTCTGAGTCTGGTAGCTCA
LCW0401_061_GFP-N_F05.ab1	GSSESGSSEGGPGSGGEP SESGSSGSEGSSGPGESS	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAGGGCGGTCCA GGTTCTGGTGGCGAACCATCTGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCGGGTGAATCTTCA
LCW0401_063_GFP-N_H05.ab1	GSGGEPSESGSSGSEGSS GPGESSGSEGSSGPGESS	GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_066_GFP-N_B06.ab1	GSGGEPSESGSSGSSESG SSEGGPGSGGEPSESGSS	GGTTCTGGTGGCGAACCATCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCTTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGCGGTCCA GGTTCTGGTGGTGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA
LCW0401_067_GFP-N_C06.ab1	GSGGEPSESGSSGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGCGAACCTTCCGAATCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCTAGCGGTTCCGAATCA GGTGAATCTCCAGGTGGTTCTAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_069_GFP-N_D06.ab1	GSGGEPSESGSSGSGGEP SESGSSGESPGGSSGSES	GGTTCCGGTGGTGAACCATCTGAGTCTGGTAGCTCA GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAGTCTGGTAGCTCA GGTGAATCTCCGGGTGGTTCCAGCGGTTCCGAATCA
LCW0401_070_GFP-N_E06.ab1	GSEGSSGPGESSGSSESG SSEGGPGSEGSSGPGESS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCGGGCGAATCCTCA GGTTCCTCCGAAAGCGGTTCTTCCGAAGGTGGTCCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGTGAATCTTCA
LCW0401_078_GFP-N_F06.ab1	GSSESGSSEGGPGESPGG SSGSESGESPGGSSGSES	GGTTCCTCTGAAAGCGGTTCTTCTGAAGGCGGTCCA GGTGAATCTCCGGGTGGCTCCAGCGGTTCTGAATCA GGTGAATCTCCTGGTGGCTCCAGCGGTTCCGAGTCA
LCW0401_079_GFP-N_G06.ab1	GSEGSSGPGESSGSEGSS GPGESSGSGGEPSESGSS	GGTAGCGAAGGTTCTTCTGGTCCAGGCGAGTCTTCA GGTAGCGAAGGTTCTTCCGGTCCTGGCGAGTCTTCA GGTTCCGGTGGCGAACCGTCCGAATCTGGTAGCTCA

[0562] 实施例2:vTEN_AE36区段的构建

[0563] 构建编码36个氨基酸长度的XTEN序列的密码子文库。XTEN序列被指定为XTEN_AE36。它的区段具有氨基酸序列$[X]_3$,其中X是具有以下序列的12mer肽:GSPAGSPTSTEE(SEQ ID NO:23)、GSEPATSGSETP(SEQ ID NO:24)、GTSESATPESGP(SEQ ID NO:25)或GTSTEPSEGSAP(SEQ ID NO:26)。插入物是通过使以下数对磷酸化合成寡核苷酸对退火来获得:

[0564] AE1for:AGGTAGCCCDGCWGGYTCTCCDACYTCYACYGARGA(SEQ ID NO:1628)

[0565] AE1rev:ACCTTCYTCRGTRGARGTHGGAGARCCWGCHGGGCT(SEQ ID NO:1629)

[0566] AE2for:AGGTAGCGAACCKGCWACYTCYGGYTCTGARACYCC(SEQ ID NO:1 630)

[0567] AE2rev:ACCTGGRGTYTCAGARCCRGARGTWGCMGGTTCGCT(SEQ ID NO:1 631)

[0568] AE3for:AGGTACYTCTGAAAGCGCWACYCCKGARTCYGGYCC(SEQ ID NO:1632)

[0569] AE3rev:ACCTGGRCCRGAyTCMGGRGTWGCGCTTTCAGARGT(SEQ ID NO:1633)

[0570] AE4for:AGGTACTCTACYGAACCKTCYGARGGYAGCGCWCC(SEQ ID NO:1634)

[0571] AE4rev:ACCTGGWGCGCTRCCYTCRGAMGGTTCRGTAGARGT(SEQ ID NO:1635)

[0572] 我们也使磷酸化寡核苷酸3KpnIstopperFor:AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQ ID NO:1626)和非磷酸化寡核苷酸pr_3KpnIstopperRev:CCTCGAGTGAAGACGA(SEQ ID NO:1627)退火。连接退火的寡核苷酸对,此产生具有表示不同数目的连接于一个BbsI/KpnI区段的12mer重复序列的不同长度的产物的混合物。通过制备型琼脂糖凝胶电泳自混合物分离对应于36个氨基酸的长度的产物且连接至BsaI/KpnI消化的填充载体pCW0359中。指定为LCW0402的所得文库中的大多数克隆在诱导之后显示绿色荧光,此显示XTEN_AE36的序列已与GFP基因同框连接且XTEN_AE36的大多数序列显示良好表达。

[0573] 我们通过将分离物压印于含有IPTG的琼脂板上来筛选96个来自文库LCW0402的分离物中具有高荧光水平的分离物。通过PCR评估相同分离物且48个分离物被鉴定含有具有

36个氨基酸的区段以及强烈荧光。对这些分离物进行测序且37个克隆被鉴定含有正确XTEN_AE36区段。这些区段的核苷酸和氨基酸构建体的文件名称和序列列于表14中。

[0574] 表14:AE 36-mmer基序的DNA和氨基酸序列(按照出现顺序分别是SEO ID NO279-352)

[0575]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0402_002_GFP-N_A07.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_003_GFP-N_B07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_004_GFP-N_C07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTACCTCTACCGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCCGGTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCTGGCCCA
LCW0402_005_GFP-N_D07.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGTAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCCGGCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCA
LCW0402_006_GFP-N_E07.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCCCGGCAGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAA
LCW0402_008_GFP-N_F07.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_009_GFP-N_G07.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACCTCCACTGAAGAA GGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA
LCW0402_011_GFP-N_A08.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCA GGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_012_GFP-N_B08.ab1	GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA
LCW0402_013_GFP-N_C08.ab1	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA
LCW0402_014_GFP-N_D08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA GGTAGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_015_GFP-N_E08.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCA GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCA
LCW0402_016_GFP-N_F08.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATP	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCA

[0576]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
	ESGP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_020_GFP-N_G08.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCGTCTGAAGGCAGCGCACCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCCAGCAGGTTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_023_GFP-N_A09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCAACCTCCACCGAAGAA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACCCCA
LCW0402_024_GFP-N_B09.ab1	GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCCGGCCCA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCAACTTCTACTGAAGAA
LCW0402_025_GFP-N_C09.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_026_GFP-N_D09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_027_GFP-N_E09.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAA GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCA
LCW0402_032_GFP-N_H09.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGTTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCGGAGTCTGGTCCA GGTAGCCCTGCAGGTTCTCCTACCTCCACTGAGGAA
LCW0402_034_GFP-N_A10.ab1	GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCA GGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_036_GFP-N_C10.ab1	GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA
LCW0402_039_GFP-N_E10.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCACCA
LCW0402_040_GFP-N_F10.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCCA GGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_041_GFP-N_G10.ab1	GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA GGTAGCCCAGCAGGTTCTCCTACCTCCACCGAGGAA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA
LCW0402_050_GFP-N_A11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_051_GFP-N_B11.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCGGCAACTTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGCCCA GGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCTGAAACCCCA
LCW0402_059_GFP-N_E11.ab1	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCA GGTAGCGAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCA GGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCA
LCW0402_060_GFP-N_F11.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP	GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAATCTGGCCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_061_GFP-N_G11.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCA
LCW0402_065_GFP-N_A12.ab1	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCA GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCA
LCW0402_066_GFP-N_B12.ab1	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP	GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAAACTCCA GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGTTCTGAAACTCCA GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCA
LCW0402_067_GFP-N_C12.ab1	GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACTCCA

[0577]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0402_069_GFP-N_D12.ab1	GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCA GGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCA GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCA
LCW0402_073_GFP-N_F12.ab1	GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCA GGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCA GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAA
LCW0402_074_GFP-N_G12.ab1	GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGP	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCA GGTAGCCCAGCTGGTTCTCCAACCTCTACTGAGGAA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAATCTGGTCCA
LCW0402_075_GFP-N_H12.ab1	GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP	GGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCA GGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCA GGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTGGTCCA

[0578] 实施例3:XTEN_AF36区段的构建

[0579] 构建编码36个氨基酸长度的序列的密码子文库。序列被指定为XTEN_AF36。它的区段具有氨基酸序列$[X]_3$,其中X是具有以下序列的12mer肽:GSTSESPSGTAP(SEQ ID NO:27)、GTSTPESGSASP(SEQ ID NO:28)、GTSPSGESSTAP(SEQ ID NO:29)或GSTSSTAESPGP(SEQ ID NO:30)。插入物是通过使以下数对磷酸化合成寡核苷酸对退火来获得:

[0580] AF1for:AGGTTCTACYAGCGAATCYCCKTCTGGYACYGCWCC(SEQ ID NO:1636)

[0581] AF1rev:ACCTGGWGCRGTRCCAGAMGGRGATTCGCTRGTAGA(SEQ OD NO:1637)

[0582] AF2for:AGGTACYTCTACYCCKGAAAGCGGYTCYGCWTCTCC(SEQ ID NO:1638)

[0583] AF2rev:ACCTGGAGAWGCRGARCCGCTTTCMGGRGTAGARGT(SEQ ID NO:1639)

[0584] AF3for:AGGTACYTCYCCKAGCGGYGAATCTTCTACYGCWCC(SEQ ID NO:1640)

[0585] AF3rev:ACCTGGWGCRGTAGAAGATTCRCCGCTMGGRGARGT(SEQ ID NO:1641)

[0586] AF4for:AGGTTCYACYAGCTCTACYGCWGAATCTCCKGGYCC(SEQ ID NO:1 642)

[0587] AF4rev:ACCTGGRCCMGGAGATTCWGCRGTAGAGCTRGTRGA(SEQ ID NO:1643)

[0588] 我们也使磷酸化寡核苷酸3KpnIstopperFor:AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQ ID NO:1626)和非磷酸化寡核苷酸pr_3KpnIstopperRev:CCTCGAGTGAAGACGA(SEQ ID NO:1627)退火。连接退火的寡核苷酸对,此产生具有表示不同数目的连接于一个BbsI/KpnI区段的12mer重复序列的不同长度的产物的混合物。通过制备型琼脂糖凝胶电泳自混合物分离对应于36个氨基酸的长度的产物且连接至BsaI/KpnI消化的填充载体pCW0359中。指定为LCW0403的所得文库中的大多数克隆在诱导之后显示绿色荧光,此显示XTEN_AF36的序列已与GFP基因同框连接且XTEN_AF36的大多数序列显示良好表达。

[0589] 我们通过将分离物压印于含有IPTG的琼脂板上来筛选96个来自文库LCW0403的分离物中具有高荧光水平的分离物。通过PCR评估相同分离物且48个分离物被鉴定含有具有36个氨基酸的区段以及强烈荧光。对这些分离物进行测序且44个克隆被鉴定含有正确XTEN AF36区段。这些区段的核苷酸和氨基酸构建体的文件名称和序列列于表15中。

[0590] 表15:AF 36.mer基序的DNA和氨基酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO353-440)

[0591]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0403_004_GFP-N_A01.ab1	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_005_GFP-N_B01.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_006_GFP-N_C01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCA
LCW0403_007_GFP-N_D01.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_008_GFP-N_E01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_010_GFP-N_F01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_011_GFP-N_G01.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA
LCW0403_012_GFP-N_H01.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCA
LCW0403_013_GFP-N_A02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_014_GFP-N_B02.ab1	GSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGCTCTGCATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_015_GFP-N_C02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_017_GFP-N_D02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_018_GFP-N_E02.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_019_GFP-N_F02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_023_GFP-N_H02.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGTACTGCACCA
LCW0403_024_GFP-N_A03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_025_GFP-N_B03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAP	GGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_028_GFP-N_D03.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA

[0592]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0403_029_GFP-N_E03.ab1	GTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGP	GGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_030_GFP-N_F03.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_031_GFP-N_G03.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_033_GFP-N_H03.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCACCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCCACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCA
LCW0403_035_GFP-N_A04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCCACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCA
LCW0403_036_GFP-N_B04.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTACTTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_039_GFP-N_C04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_041_GFP-N_D04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCA
LCW0403_044_GFP-N_E04.ab1	GTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCA
LCW0403_046_GFP-N_F04.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCA
LCW0403_047_GFP-N_G04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCCACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_049_GFP-N_H04.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASP	GGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCAGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCATCTCCA
LCW0403_051_GFP-N_A05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCA
LCW0403_053_GFP-N_B05.ab1	GTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCCCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCCACCAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_054_GFP-N_C05.ab1	GSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_057_GFP-N_D05.ab1	GSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCACCA
LCW0403_058_GFP-N_E05.ab1	GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCA
LCW0403_060_GFP-N_F05.ab1	GTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGP	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCA
LCW0403_063_GFP-N_G05.ab1	GSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_064_GFP-N_H05.ab1	GTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAP	GGTACCTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCA
LCW0403_065_	GSTSSTAESPGPGTST	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG

[0593]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
GFP-N_A06.ab1	PESGSASPGSTSESPS GTAP	GTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_066_ GFP-N_B06.ab1	GSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGTSPSGES STAP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCCAG GTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGG TACTTCCCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCA
LCW0403_067_ GFP-N_C06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGSTSSTAE SPGP	GGTTCTACTAGCGAATCTCCTTCTGGTACCGCTCCAG GTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGG TTCCACTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGTCCA
LCW0403_068_ GFP-N_D06.ab1	GSTSSTAESPGPGSTS STAESPGPGSTSESPS GTAP	GGTTCCACTAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAG GTTCTACCAGCTCTACCGCTGAATCTCCTGGCCCAGG TTCTACCAGCGAATCTCCGTCTGGCACCGCACCA
LCW0403_069_ GFP-N_E06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCA GGTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCTGCTTCTCCAG GTACTTCTACCCCGGAAAGCGGCTCCGCATCTCCA
LCW0403_070_ GFP-N_F06.ab1	GSTSESPSGTAPGTST PESGSASPGTSTPESG SASP	GGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAG GTACTTCTACTCCTGAAAGCGGTTCCGCTTCTCCAGG TACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCTCCA

[0594] 实施例4:XTEN_AG36区段的构建

[0595] 构建编码36个氨基酸长度的序列的密码子文库。序列被指定为XTEN_AG36。它的区段具有氨基酸序列$[X]_3$,其中X是具有以下序列的12mer肽:GTPGSGTASSSP(SEQ ID NO:31)、GSSTPSGATGSP(SEQ ID NO:32)、GSSPSASTGTGP(SEQ ID NO:33)或GASPGTSSTGSP(SEQ ID NO:34)。插入物是通过使以下数对磷酸化合成寡核苷酸对退火来获得:

[0596] AG1for:AGGTACYCCKGGYAGCGGTACYGCWTCTTCYTCTCC(SEQ ID NO:1644)

[0597] AG lrev:ACCTGGAGARGAAGAWGCRGTACCGCTRCCMGGRGT(SEQ ID NO:1645)

[0598] AG2for:AGGTAGCTCTACYCCKTCTGGTGCWACYGGYTCYCC(SEQ ID NO:1646)

[0599] AG2rev:ACCTGGRGARCCRGTWGCACCAGAMGGRGTAGAGCT(SEQ ID NO:1647)

[0600] AG3for:AGGTTCTAGCCCKTCTGCWTCYACYGGTACYGGYCC(SEQ ID NO:1648)

[0601] AG3rev:ACCTGGRCCRGTACCRGTRGAWGCAGAMGGGCTAGA(SEQ ID NO:1649)

[0602] AG4for:AGGTGCWTCYCCKGGYACYAGCTCTACYGGTTCTCC(SEQ ID NO:1650)

[0603] AG4rev:ACCTGGAGAACCRGTAGAGCTRGTRCCMGGRGAWGC(SEQ ID NO:1651)

[0604] 我们也使磷酸化寡核苷酸3KpnIstopperFor:AGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQ ID NO:1626)和非磷酸化寡核苷酸pr_3KpnIstopperRev:CCTCGAGTGAAGACGA(SEQ ID NO:1627)退火。连接退火的寡核苷酸对,此产生具有表示不同数目的连接于一个BbsI/KpnI区段的12聚体重复序列的不同长度的产物的混合物。通过制备型琼脂糖凝胶电泳自混合物分离对应于36个氨基酸的长度的产物且连接至BsaI/KpnI消化的填充载体pCW0359中。指定为LCW0404的所得文库中的大多数克隆在诱导之后显示绿色荧光,此显示XTEN_AG36的序列已与GFP基因同框连接且XTEN_AG36的大多数序列显示良好表达。

[0605] 我们通过将分离物压印于含有IPTG的琼脂板上来筛选96个来自文库LCW0404的分离物中具有高荧光水平的分离物。通过PCR评估相同分离物且48个分离物被鉴定含有具有36个氨基酸的区段以及强烈荧光。对这些分离物进行测序且44个克隆被鉴定含有正确XTEN_AG36区段。这些区段的核苷酸和氨基酸构建体的文件名称和序列列于表16中。

[0606] 表16:AG 36.mer基序的DNA和氨基酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO441-528)

[0607]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0404_001_GFP-N_A07.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGGTACTCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_003_GFP-N_B07.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_006_GFP-N_C07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_007_GFP-N_D07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTGCATCCCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_009_GFP-N_E07.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGSRPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCCCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGACCTTCTGCATCCACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_011_GFP-N_F07.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_012_GFP-N_G07.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCA
LCW0404_014_GFP-N_H07.ab1	GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCATCCCCTGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_015_GFP-N_A08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_016_GFP-N_B08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_017_GFP-N_C08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_018_GFP-N_D08.ab1	GTPGSGTASSSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_023_GFP-N_F08.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_025_GFP-N_G08.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_029_GFP-N_A09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP	GGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACCGGTACCGGCCCA
LCW0404_030_GFP-N_B09.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_031_GFP-N_C09.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGS	GGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGG

[0608]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
	P	TGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_034_GFP-N_D09.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCATCCCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_035_GFP-N_E09.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCA
LCW0404_036_GFP-N_F09.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTTCTAGCCCGTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCA
LCW0404_037_GFP-N_G09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCA
LCW0404_040_GFP-N_H09.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCCCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_041_GFP-N_A10.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSP	GGTACCCCTGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCATCTTCTTCTCCA
LCW0404_043_GFP-N_C10.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_045_GFP-N_D10.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCTCCTGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_047_GFP-N_F10.ab1	GTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_048_GFP-N_G10.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_049_GFP-N_H10.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCA
LCW0404_050_GFP-N_A11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSP	GGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_051_GFP-N_B11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_052_GFP-N_C11.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSP	GGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACTGCATCTTCCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_053_GFP-N_D11.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	GGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCAACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCCACTGGTACCGGTCCAGGTGCTTCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_057_GFP-N_E11.ab1	GASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP	GGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACCGGTACTGGTCCA
LCW0404_060_GFP-N_F11.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_062_GFP-N_G11.ab1	GSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCCCCA
LCW0404_066_GFP-N_H11.ab1	GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCA
LCW0404_067_GFP-N_A12.ab1	GTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSNPSASTGTGP	GGTACCCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTAACCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCCA

[0609]

文件名称	氨基酸序列	核苷酸序列
LCW0404_068_GFP-N_B12.ab1	GSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP	GGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCA
LCW0404_069_GFP-N_C12.ab1	GSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCATCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTCCGGGTAGCGGTACCGCTTCTTCCTCTCCA
LCW0404_070_GFP-N_D12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP	GGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCA
LCW0404_073_GFP-N_E12.ab1	GASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSP	GGTGCTTCTCCTGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCCCTGGTAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGTTCCCCA
LCW0404_075_GFP-N_F12.ab1	GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCATCTACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_080_GFP-N_G12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGP	GGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTTCTACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACTGGTCCA
LCW0404_081_GFP-N_H12.ab1	GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSP	GGTGCTTCCCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTACCCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCA

[0610] 实施例5:XTEN_AE864的构建

[0611] 由XTEN_AE36连续二聚化成AE72、144、288、576和864来构建XTEN_AE864。由XTEN_AE36的37个不同区段构建一批XTEN_AE72区段。混合具有全部37个不同的36个氨基酸的区段的大肠杆菌的培养物且分离质粒。这个质粒集合用BsaI/NcoI消化以产生小片段作为插入物。相同质粒集合用BbsI/NcoI消化以产生大片段作为载体。连接插入物和载体片段,从而产生加倍长度且将连接混合物转化至BL21Gold(DE3)中细胞以获得具有XTEN_AE72的菌落。

[0612] XTEN_AE72区段的这个文库被指定为LCW0406。组合来自LCW0406的所有克隆且使用与以上所述相同的方法再次二聚化,从而产生XTEN_AE144的文库LCW0410。组合来自LCW0410的所有克隆且使用与以上所述相同的方法再次二聚化,从而产生XTEN_AE288的文库LCW0414。自文库随机挑选两个分离物LCW0414.001和LCW0414.002且测序以验证身份。组合来自LCW0414的所有克隆且使用与以上所述相同的方法再次二聚化,从而产生XTEN_AE576的文库LCW0418。我们筛选96个来自文库LCW0418的分离物中具有高GFP荧光水平的分离物。对8个根据PCR具有正确插入物尺寸以及强烈荧光的分离物进行测序且基于测序和表达数据选择2个分离物(LCW0418.018和LCW0418.052)供未来使用。

[0613] 通过使用与以上所述相同的二聚化方法组合XTEN_AE576的LCW0418.018和XTEN_AE288的LCW0414.002来构建XTEN_AE864的特定克隆pCW0432。

[0614] 实施例6:XTEN_AM144的构建

[0615] 自37个不同XTEN_AE36区段、44个XTEN_AF36区段和44个XTEN_AG36区段起始构建一批XTEN_AM144区段。

[0616] 混合具有全部125个不同的36个氨基酸的区段的大肠杆菌的培养物且分离质粒。这个质粒集合用BsaI/NcoI消化以产生小片段作为插入物。相同质粒集合用BbsI/NcoI消化以产生大片段作为载体。连接插入物和载体片段,从而产生加倍长度且将连接混合物转化至BL21Gold(DE3)中细胞以获得具有XTEN_AM72的菌落。

[0617] XTEN_AM72区段的这个文库被指定为LCW0461。组合来自LCW0461的所有克隆且使用与以上所述相同的方法再次二聚化,从而产生文库LCW0462。针对蛋白质表达筛选1512个

来自文库LCW0462的分离物。将个别菌落转移至96孔板中且作为起始培养物(starter culture)培养过夜。将这些起始培养物稀释至新鲜自身诱导培养基中且培养20-30小时。使用荧光板读取器在395nm激发和510nm发射下测量表达。192个分离物显示高水平表达且提交供DNA测序。文库LCW0462中的大多数克隆显示良好表达和类似物理化学性质,从而表明XTEN_AM36区段的大多数组合产生适用的XTEN序列。来自LCW0462的30个分离物被选作XTEN_AM144区段的优选集合以构建含有多个XTEN区段的多官能蛋白质。这些区段的核苷酸和氨基酸构建体的文件名称和序列列于表17中。

[0618] 表17:AM144区段的DNA和氨基酸序列(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 529-594)

克隆	修整的序列	蛋白质序列
LCW462_r1	GGTACCCCGGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAGGTAGC TCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCC CGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTC CTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTG AGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGCCCAGG TTCTAGCCCGTCTGCTTCTACCGGTACTGGTCCAGGTGCTTCT CCGGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTACCTCTACCGAAC CGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTG AGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTG AAACTCCA	GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGS SPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEG SAPGSEPATSGSETP
LCW462_r5	GGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTA CTAGCGAATCCCCTTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCGAG CGGCGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGT CCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCCC GGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCT CCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCTG GCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCTT CTCCA	GSTSESPSGTAPGST SESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSTEPSEG SAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGA SPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGASPGTS STGSPGSTSESPSGT APGSTSESPSGTAP GTSTPESGSASP
LCW462_r9	GGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCTT	GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSE

[0619]

[0620]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
	CTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCGG AGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCG CACCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAG GTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCC CGGCTGGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAAGGTGCTTCTCCTG GCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTC TACCGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCCACTGGT ACTGGTCCA	GSAPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGASPGT SSTGSPGSSPSASTG TGPGSSPSASTGTG P
LCW462_r10	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCT CCTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTG GTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGC ACCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT TCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTCTA CCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACCCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCT ACTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCGGTT CTCCA	GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAP GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGS P
LCW462_r15	GGTGCTTCTCCGGGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTA GCCCTTCTGCATCCACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAATCTGGCCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGTTCT GAAACCCCAGGTAGCGAACCGGCTACCTCCGGTTCTGAAACT CCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGT ACCTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCT ACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAA CCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACTGAACCGTCT GAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCT GAAACTCCA	GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGTSESAT PESGPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP
LCW462_r16	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC CCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAA CTCCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCCGGCT CTGAGACTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAATCTG GTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAG GTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTC TACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGC TACTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCC GAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCT GAAACTCCA	GTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP
LCW462_r20	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACCGAACCG TCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAG GGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCTTCTGAAGGTAGC GCACCAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAGGGCAGCGCACCA GGTACTTCTGAAAGCGCTACCCCTGAGTCCGGCCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTT CTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCGACCT CCACCGAGGAA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEE
LCW462_r23	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCCC CTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGG CACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCT CCAGGTAGCGAACCTGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGT ACCTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTA CTGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAAC CGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCC	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES

[0621]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
	CGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGT CCGGCCCA	GPGTSESATPESGP
LCW462_r24	GGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTTCTA GCCCGTCTGCTTCTACCGGTACCGGTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCTA CTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTC CAGGTGCTTCCCCGGGCACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTC TAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTACTCCGGGC AGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACTG CTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTC TACCGCTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCTGCATCT CCA	GSSTPSGATGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESST APGTSTPESGSASP
LCW462_r27	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACT GAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTACTGAACCG TCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG GAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCC GGCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCTTCTTCTTCTCCAG GTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTGCTTC TCCGGGCACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGC TCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCG ACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGT AGCGCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGA SPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTS TEEGTSTEPSEGSAP
LCW462_r28	GGTAGCCCAGCAGGCTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTACT TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCACCAGGTACCTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCG TCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCT GAGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCT GGCCCAGGTACCCCGGGTAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTGCTTC TCCGGGCACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACCTCTACTGAA CCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACC CCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGT AGCGCACCA	GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GTPGSGTASSSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTSTEPS EGSAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP
LCW462_r38	GGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACTCCAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCCGGCCCAGGTAGCGAACCG GCTACTTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTG GTGCAACCGGCTCCCCAGGTACTCCTGGTAGCGGTACCGCTT CTTCTTCTCCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTC CCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGT AGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCCC CGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCTA CTTCTGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGA GGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCTGCTACTTCTGGTTCTGA AACTCCA	GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSEPA TSGSETPGSSTPSGA TGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSEPATS GSETPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETP
LCW462_r39	GGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAA AGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCT CCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACT TCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGC GCTCCAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAA GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTGCTTCCCCG GGCACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT CTACTGGTACTGGTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGG TACTGGTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGASPGTS STGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGP
LCW462_r41	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTT CTCCTGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCC GTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTCCA ACCTCCACCGAAGAAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCTGAA	GSSTPSGATGSPGA SPGTSSTGSPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPES

[0622]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
	TCCGGCCCAGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGTTCTGAAACC CCAGGTGCATCTCCTGGTACTAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTA GCTCTACTCCGTCTGGTGCAACCGGCTCTCCAGGTTCTAGCCC TTCTGCATCTACCGGTACTGGTCCAGGTTCTACCAGCGAATCC CCTTCTGGTACTGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTG GCACCGCACCAGGTACTTCTACCCCTGAAAGCGGCTCCGCTT CTCCA	GPGSEPATSGSETP GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP
LCW462_r42	GGTTCTACCAGCGAATCTCCTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTA CTAGCGAATCCCCGTCTGGTACCGCACCAGGTACTTCTCCTAG CGGCGAATCTTCTACCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCTAC TCCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGG TAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGC ACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGCAGCGCTCCAGG TACTTCTGAAAGCGCTACCCCGGAGTCCGGTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCT CTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG CTCTCCA	GSTSESPSGTAPGST SESPSGTAPGTSPSG ESSTAPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSP
LCW462_r43	GGTTCTACTAGCTCTACTGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTACCT CTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCTCCGAG CGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCT GAATCTCCGGGTCCAGGTTCTACCAGCTCTACTGCAGAATCTC CTGGCCCAGGTACTTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCTTCTCC AGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTTCT ACCAGCTCTACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTACTTCTACCC CGGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTTCTACCAGCTCTACCG CTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGG CACCGCACCAGGTACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCA CCA	GSTSSTAESPGPGTS PSGESSTAPGTSPSG ESSTAPGSTSSTAES PGPGSTSSTAESPGP GTSTPESGSASPGTS PSGESSTAPGSTSST AESPGPGTSTPESGS ASPGSTSSTAESPGP GSTSESPSGTAPGTS PSGESSTAP
LCW462_r45	GGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAGGTTCTA CCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTACTAGCT CTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCTTC CGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGG CAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGG TCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGG TACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCT ACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGC GCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCC GAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGT AGCGCTCCC	GTSTPESGSASPGST SESPSGTAPGSTSST AESPGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAP
LCW462_r47	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGTAGCGCACCAGGTACC TCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTAGCGAACCG GCAACCTCCGGTTCTGAAACTCCAGGTACTTCTACTGAACCGT CTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGG AATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCG GCCCAGGTGCATCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAG GTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACTGGTACCGGCCCAGGTAGCTC TACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCG TCTGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTG CTACTGGCTCCCCAGGTGCATCCCCTGGCACCAGCTCTACCG GTTCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGSEPA TSGSETPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGS SPSASTGTGPGSSTP SGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGAT GSPGASPGTSSTGS P
LCW462_r54	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACTCCAGGTAGC GAACCTGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTACT GAACCTTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTAGCGAACCTGCAACC TCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCAGGTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAG GTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTGCTTC TCCGGGTACCAGCTCTACTGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCG TCTGGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCT CTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGG	GSEPATSGSETPGS EPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGSEPATS GSETPGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GSSTPSGATGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGS

[0623]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
	CTCTCCA	P
LCW462_r55	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT	GTSTEPSEGSAPGT
	TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG	STEPSEGSAPGTSTE
	AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCTA	PSEGSAPGTSESATP
	CTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAAG	ESGPGTSTEPSEGS
	GCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCG	APGTSTEPSEGSAP
	CTCCAGGTTCTACTAGCGAATCTCCGTCTGGCACTGCTCCAGG	GSTSESPSGTAPGTS
	TACTTCTCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCTCCAGGTACTTCC	PSGESSTAPGTSPSG
	CCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCTCCAGGTAGCCCGGCTGGC	ESSTAPGSPAGSPTS
	TCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTC	TEEGTSESATPESGP
	CTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTA	GTSTEPSEGSAP
	GCGCTCCA	
LCW462_r57	GGTACTTCTACTGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC	GTSTEPSEGSAPGS
	GAACCTGCTACTTCTGGTTCTGAAACCCCAGGTAGCCCGGCT	EPATSGSETPGSPA
	GGCTCTCCGACCTCCACCGAGGAAGGTAGCCCGGCAGGCTCT	GSPTSTEEGSPAGSP
	CCGACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCG	TSTEEGTSESATPES
	GAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCTGAGGGCAGC	GPGTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTACCTCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT
	GGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCACCAGGTACT	STEPSEGSAPGTSES
	TCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCTCTACT	ATPESGPGSSTPSG
	CCGTCTGGTGCAACCGGCTCCCCAGGTTCTAGCCCGTCTGCTT	ATGSPGSSPSASTG
	CCACTGGTACTGGCCCAGGTGCTTCCCCGGGCACCAGCTCTA	TGPGASPGTSSTGS
	CTGGTTCTCCA	P
LCW462_r61	GGTAGCGAACCGGCTACTTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTAGC	GSEPATSGSETPGSP
	CCTGCTGGCTCTCCGACCTCTACCGAAGAAGGTACCTCTGAA	AGSPTSTEEGTSES
	AGCGCTACCCCTGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCTT	ATPESGPGTSTEPSE
	CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGG	GSAPGTSTEPSEGS
	GCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCG	APGTSESATPESGP
	GTCCAGGTACCTCTACTCCGGAAAGCGGTTCCGCATCTCCAG	GTSTPESGSASPGST
	GTTCTACCAGCGAATCCCCGTCTGGCACCGCACCAGGTTCTA	SESPSGTAPGSTSST
	CTAGCTCTACTGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTGAAA	AESPGPGTSESATP
	GCGCTACTCCGGAGTCCGGTCCAGGTACCTCTACCGAACCGT	ESGPGTSTEPSEGS
	CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCTGAGG	APGTSTEPSEGSAP
	GTAGCGCTCCA	
LCW462_r64	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACT	GTSTEPSEGSAPGT
	TCTACTGAACCTTCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG	STEPSEGSAPGTSTE
	AACCTTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTACCGAACCGT	PSEGSAPGTSTEPSE
	CTGAAGGTAGCGCACCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTG	GSAPGTSESATPES
	AGTCCGGTCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCTG	GPGTSESATPESGP
	GCCCAGGTACTCCTGGCAGCGGTACCGCATCTTCCTCTCCAG	GTPGSGTASSSPGS
	GTAGCTCTACTCCGTCTGGTGCAACTGGTTCCCCAGGTGCTTC	STPSGATGSPGASP
	TCCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTTCCACCAGCTCT	GTSSTGSPGSTSSTA
	ACTGCTGAATCTCCTGGTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGTGAAT	ESPGPGTSPSGESST
	CTTCTACTGCTCCAGGTACTTCTACTCCTGAAAGCGGCTCTGC	APGTSTPESGSASP
	TTCTCCA	
LCW462_r67	GGTAGCCCGGCAGGCTCTCCGACCTCTACTGAGGAAGGTACT	GSPAGSPTSTEEGT
	TCTGAAAGCGCAACCCCGGAGTCCGGCCCAGGTACCTCTACC	SESATPESGPGTSTE
	GAACCGTCTGAGGGCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCA	PSEGSAPGTSESATP
	ACCCCTGAATCCGGTCCAGGTAGCGAACCGGCTACTTCTGGC	ESGPGSEPATSGSE
	TCTGAGACTCCAGGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGTAGC	TPGTSTEPSEGSAP
	GCACCAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTTCCACCGAGGAA	GSPAGSPTSTEEGT
	GGTACCTCTACTGAACCTTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACC	STEPSEGSAPGTSTE
	TCTACTGAACCTTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACC	PSEGSAPGTSTEPSE
	GAACCGTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCT	GSAPGTSTEPSEGS
	TCTGAAGGCAGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCTTCCGAA	APGTSTEPSEGSAP
	GGTAGCGCACCA	
LCW462_r69	GGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTA	GTSPSGESSTAPGST
	CTAGCTCTACCGCTGAATCTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAG	SSTAESPGPGTSPSG
	CGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACT	ESSTAPGTSESATPE
	CCGGAGTCTGGCCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCTGAGGGT	SGPGTSTEPSEGSAP
	AGCGCTCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCA	GTSTEPSEGSAPGSS

[0624]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
	CCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCTACTGGTACTGGCCCAGGTA GCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCGGCTCTCCAGGTGCTTCTCC GGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTACTTCTACTCCGGAA AGCGGTTCCGCATCTCCAGGTACTTCTCCTAGCGGTGAATCTT CTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACTGC TCCA	PSASTGTGPGSSTPS GATGSPGASPGTSS TGSPGTSTPESGSAS PGTSPSGESSTAPGT SPSGESSTAP
LCW462_r70	GGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCGGAGTCTGGCCCAGGTACC TCTACTGAACCGTCTGAGGGTAGCGCTCCAGGTACTTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTAGCCCTGCTGGCTCTC CGACTTCTACTGAGGAAGGTAGCCCGGCTGGTTCTCCGACTT CTACTGAGGAAGGTACTTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCG CTCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCTTCCACCGGTACTGGCCCAGG TAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACCGGCTCCCCAGGTAGCTCT ACTCCTTCTGGTGCAACTGGCTCTCCAGGTAGCGAACCGGCA ACTTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTACTTCTGAAAGCGCTACT CCTGAGTCTGGCCCAGGTAGCGAACCTGCTACCTCTGGCTCT GAAACCCCA	GTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAP GSSPSASTGTGPGS STPSGATGSPGSSTP SGATGSPGSEPATS GSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETP
LCW462_r72	GGTACTTCTACCGAACCGTCCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACC TCTACTGAACCTTCCGAGGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACC GAACCTTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTAGCTCTACCCCGTCT GGTGCTACCGGTTCCCCAGGTGCTTCTCCTGGTACTAGCTCTA CCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGCTC TCCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCGGTCCAGG TAGCGAACCGGCTACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGGTACTTCT ACCGAACCGTCCGAAGGTAGCGCACCAGGTTCTACTAGCGAA TCTCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGT CTGGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCG CTTCTCCA	GTSTEPSEGSAPGT STEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSSTPSG ATGSPGASPGTSST GSPGSSTPSGATGS PGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP
LCW462_r73	GGTACCTCTACTCCTGAAAGCGGTTCTGCATCTCCAGGTTCCA CTAGCTCTACCGCAGAATCTCCGGGCCCAGGTTCTACTAGCTC TACTGCTGAATCTCCTGGCCCAGGTTCTAGCCCTTCTGCATCT ACTGGTACTGGCCCAGGTAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACCG GCTCTCCAGGTGCTTCTCCGGGTACTAGCTCTACCGGTTCTCC AGGTAGCGAACCGGCAACCTCCGGCTCTGAAACCCCAGGTAC CTCTGAAAGCGCTACTCCTGAATCCGGCCCAGGTAGCCCGGC AGGTTCTCCGACTTCCACTGAGGAAGGTTCTACTAGCGAATC TCCTTCTGGCACTGCACCAGGTTCTACCAGCGAATCTCCGTCT GGCACTGCACCAGGTACCTCTACCCCTGAAAGCGGTTCCGCT TCTCCC	GTSTPESGSASPGST SSTAESPGPGSTSST AESPGPGSSPSAST GTGPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSP GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSTSESP SGTAPGSTSESPSGT APGTSTPESGSASP
LCW462_r78	GGTAGCCCGGCTGGCTCTCCTACCTCTACTGAGGAAGGTACT TCTGAAAGCGCTACTCCTGAGTCTGGTCCAGGTACCTCTACTG AACCGTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTTCTACCAGCGAATCTC CTTCTGGCACCGCTCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGG TACCGCACCAGGTACTTCTCCTAGCGGCGAATCTTCTACCGCA CCAGGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGT AGCCCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCT ACCGAACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTAGCGAACCTGCA ACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACT CCTGAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGC AGCGCACCA	GSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSTSESPS GTAPGSTSESPSGT APGTSPSGESSTAP GTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGSEPATSG SETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAP
LCW462_r79	GGTACCTCTACCGAACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTAGC CCGGCAGGTTCTCCTACTTCCACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCTGAGGGTAGCGCACCAGGTACCTCCCCTAGCGGCG AATCTTCTACTGCTCCAGGTACCTCTCCTAGCGGCGAATCTTC TACCGCTCCAGGTACCTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACCGCA CCAGGTTCTACCAGCGAATCCCCTTCTGGTACTGCTCCAGGTT CTACCAGCGAATCCCCTTCTGGCACCGCACCAGGTACTTCTAC CCCTGAAAGCGGCTCCGCTTCTCCAGGTAGCGAACCTGCAAC CTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCTACTCCT GAATCTGGCCCAGGTACTTCTACTGAACCGTCCGAGGGCAGC GCACCA	GTSTEPSEGSAPGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSPSGESS TAPGTSPSGESSTAP GTSPSGESSTAPGST SESPSGTAPGSTSES PSGTAPGTSTPESGS ASPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGT STEPSEGSAP

[0625]

克隆	修整的序列	蛋白质序列
LCW462_r87	GGTAGCGAACCGGCAACCTCTGGCTCTGAAACCCCAGGTACC TCTGAAAGCGCTACTCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTGAA AGCGCTACTCCGGAATCCGGTCCAGGTACTTCTCCGAGCGGT GAATCTTCTACCGCACCAGGTTCTACTAGCTCTACCGCTGAAT CTCCGGGCCCAGGTACTTCTCCGAGCGGTGAATCTTCTACTGC TCCAGGTTCTACTAGCGAATCCCCGTCTGGTACTGCTCCAGGT ACTTCCCCTAGCGGTGAATCTTCTACTGCTCCAGGTTCTACCA GCTCTACCGCAGAATCTCCGGGTCCAGGTAGCTCTACTCCGTC TGGTGCAACCGGTTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCA ACCGGCTCCCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCAAACTGG CTCTCC	GSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSES ATPESGPGTSPSGES STAPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSPS GESSTAPGSTSSTA ESPGPGSSTPSGAT GSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGANWLS
LCW462_r88	GGTAGCCCTGCTGGCTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTAGC CCGGCTGGTTCTCCGACTTCTACTGAGGAAGGTACTTCTACCG AACCTTCCGAAGGTAGCGCTCCAGGTACCTCTACTGAACCTT CCGAAGGCAGCGCTCCAGGTACCTCTACCGAACCGTCCGAGG GCAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACCCCTGAATCCG GTCCAGGTGCATCTCCTGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGG TAGCTCTACTCCTTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTGCTTCC CCGGGTACCAGCTCTACCGGTTCTCCAGGTAGCTCTACCCCGT CTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTCCGGGCAGCGGTACTG CTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCCTTCTGGTGCTACTGG CTCTCCA	GSPAGSPTSTEEGSP AGSPTSTEEGTSTEP SEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGP GASPGTSSTGSPGS STPSGATGSPGASP GTSSTGSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSP
LCW462_r89	GGTAGCTCTACCCCGTCTGGTGCTACTGGTTCTCCAGGTACTC CGGGCAGCGGTACTGCTTCTTCCTCTCCAGGTAGCTCTACCCC TTCTGGTGCTACTGGCTCTCCAGGTAGCCCGGCTGGCTCTCCT ACCTCTACTGAGGAAGGTACTTCTGAAAGCGCTACTCCTGAG TCTGGTCCAGGTACCTCTACTGAACCGTCCGAAGGTAGCGCT CCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACTCCTGAGTCTGGCCCAGGT AGCGAACCTGCTACCTCCGGCTCTGAGACTCCAGGTACCTCT GAAAGCGCAACCCCCGGAATCTGGTCCAGGTACTTCTACTGAA CCGTCTGAAGGTAGCGCACCAGGTACTTCTGAAAGCGCAACC CCGGAATCCGGCCCAGGTACCTCTGAAAGCGCAACCCCGGAG TCCGGCCCA	GSSTPSGATGSPGT PGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSPAGSP TSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSESATPES GPGTSESATPESGP

[0626] 实施例7:XTEN_AM288的构建

[0627] 如实施例6中所述使整个文库LCW0462二聚化,从而产生XTEN_AM288克隆的文库,指定为LCW0463。使用实施例6中所述的方案筛选来自文库LCW0463的1512个分离物。对176个高度表达性克隆进行测序且选择40个优选XTEN_AM288区段用于构建含有多个具有288个氨基酸残基的XTEN区段的多官能蛋白质。

[0628] 实施例8:XTEN_AM432的构建

[0629] 我们通过重组来自XTEN_AM144区段的文库LCW0462的区段和来自XTEN_AM288区段的文库LCW0463的区段来产生XTEN_AM432区段的文库。XTEN_AM432区段的这个新文库被指定为LCW0464。自分别具有LCW0462和LCW0463的大肠杆菌的培养物分离质粒。使用实施例6中所述的方案筛选来自文库LCW0464的1512个分离物。对176个高度表达性克隆进行测序且选择39个优选XTEN_AM432区段用于构建较长XTEN以及用于构建含有多个具有432个氨基酸残基的XTEN区段的多官能蛋白质。

[0630] 同时,我们使用XTEN_AM144和XTEN_AM288的优选区段构建XTEN_AM432区段的文库LMS0100。筛选这个文库产生4个选择用于进一步构建的分离物。

[0631] 实施例9:XTEN_AM875的构建

[0632] 填充载体pCW0359用BsaI和KpnI消化以移除填充区段且所得载体片段通过琼脂糖凝胶纯化加以分离。

[0633] 我们使磷酸化寡核苷酸BsaI-AscI-KpnIforP:AGGTGCAAGCGCAAGCGGCGCGCCAAGCACGGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQ ID NO:1652)和非磷酸化寡核苷酸BsaI-AscI-

KpnIrev:CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCCGTGCTTGGCGCGCCGCTTGCGCTTGC(SEQ ID NO:1653)退火以引入测序岛A(SI-A),其编码氨基酸GASASGAPSTG(SEQ ID NO:1654)且在内部具有限制酶AscI识别核苷酸序列GGCGCGCC。使退火的寡核苷酸对与以上制备的BsaI和KpnI消化的填充载体pCW0359连接以产生含有SI-A的pCW0466。我们接着通过使用实施例5中所述的相同二聚化方法,重组来自实施例8的43个优选XTEN_AM432区段和来自pCW0466的在C末端处的SI-A区段来产生XTEN_AM443区段的文库。XTEN_AM443区段的这个新文库被指定为LCW0479。

[0634] 我们通过使用实施例5中所述的相同二聚化方法,重组来自XTEN_AM443区段的文库LCW0479的区段和来自实施例8的43个优选XTEN_AM432区段来产生XTEN_AM875区段的文库。XTEN_AM875区段的这个新文库被指定为LCW0481。

[0635] 实施例10:XTEN_AM1318的构建

[0636] 我们使磷酸化寡核苷酸BsaI-FseI-KpnIforP:AGGTCCAGAACCAACGGGGCCGGCCCCAAGCGGAGGTTCGTCTTCACTCGAGGGTAC(SEQ ID NO:1655)和非磷酸化寡核苷酸BsaI-FseI-KpnIrev:CCTCGAGTGAAGACGAACCTCCGCTTGGGGCCGGCCCCGTTGGTTCTGG(SEQ ID NO:1656)退火以引入测序岛B(SI-B),其编码氨基酸GPEPTGPAPSG(SEQ ID NO:1657)且在内部具有限制酶FseI识别核苷酸序列GGCCGGCC。使退火的寡核苷酸对与如实施例9中使用的BsBI和KpnI消化的填充载体pCW0359连接以产生含有SI-B的pCW0467。我们接着通过使用实施例5中所述的相同二聚化方法,重组来自实施例8的43个优选XTEN_AM432区段和来自pCW0467的在C末端处的SI-B区段来产生XTEN_AM443区段的文库。XTEN_AM443区段的这个新文库被指定为LCW0480。

[0637] 我们通过使用与实施例5中相同的二聚化方法,重组来自XTEN_AM443区段的文库LCW0480的区段和来自XTEN_AM875区段的文库LCW0481的区段来产生XTEN_AM1318区段的文库。XTEN_AM1318区段的这个新文库被指定为LCW0487。

[0638] 实施例11:XTEN_AD864的构建

[0639] 使用连续数轮二聚化,我们自实施例1中所列的XTEN_AD36的区段起始装配一批XTEN_AD864序列。如实施例5中所述装配这些序列。评估来自XTEN_AD864的若干分离物且发现其在生理条件下显示良好表达和极好的溶解度。对XTEN_AD576的一个中间构建体进行测序。在食蟹猕猴中进行的PK实验中评估这个克隆且测量到半衰期约20小时。

[0640] 实施例12:XTEN_AF864的构建

[0641] 使用连续数轮二聚化,我们自实施例3中所列的XTEN_AF36的区段起始装配一批XTEN_AF864序列。如实施例5中所述装配这些序列。评估来自XTEN_AF864的若干分离物且发现其在生理条件下显示良好表达和极好的溶解度。对XTEN_AF540的一个中间构建体进行测序。在食蟹猕猴中进行的PK实验中评估这个克隆且测量到半衰期约20小时。XTEN_AF864的一全长克隆具有极好的溶解度且显示在食蟹猕猴中的半衰期超过60小时。装配包括如实施例9中所述的测序岛的第二组XTEN_AF序列。

[0642] 实施例13:XTEN_AG864的构建

[0643] 使用连续数轮二聚化,我们自实施例1中所列的XTEN_AD36的区段起始装配一批XTEN_AG864序列。如实施例5中所述装配这些序列。评估来自XTEN_AG864的若干分离物且发现其在生理条件下显示良好表达和极好的溶解度。XTEN_AG864的一全长克隆具有极好的溶解度且显示在食蟹猕猴中的半衰期超过60小时。

[0644] 实施例14:产生和评估具有内部和末端XTEN的CFXTEN的方法

[0645] 设计、构建和评估包含FVIII和一个或多个XTEN的CFXTEN是使用系统化方法来达成。适于XTEN插入位点的区域包括但不限于在或邻近于FVIII的已知结构域边界、外显子边界、已知表面环处的区域;具有低有序度的区域;和亲水性区域。通过前述分析,跨越FVIII B结构域缺失的(BDD)序列的不同区域已被鉴定为XTEN的插入位点,其非限制性实例列于表5-8中,且示意性显示于图8和9中。最初,产生(使用下述方法)个别构建体,其中将编码长度在6至2004个氨基酸残基的范围内的单一XTEN或XTEN片段的DNA插入对应于或接近(例如,在6个氨基酸内)表5、表6、表7、表8和表9中鉴定的各单一插入位点的FVIII序列中,且表达所得构建体并接着例如使用表49的一种体外测定评估回收的蛋白质对促凝血活性的保持的影响。举例来说,使用下述方法,制备构建体,其中XTEN序列插入在FVIII的A1、A2、B、A3、C1和C2结构域序列内以及连接于C末端,且在表49的显色测定中相较于未连接于XTEN的FVIII评估所得表达的融合蛋白。CFXTEN融合蛋白可基于它们展现的活性进一步分类成高作用、中等作用和低作用种类。在相较于FVIII,CFXTEN展现类似或适度降低的活性的那些情况下,插入位点被视为是有利的。在活性是中等的那些情况下,插入位点可朝向插入位点的N末端或C末端调整1-6个氨基酸和/或可改变XTEN的长度或净电荷且再评估所得构建体以确定活性是否得以改进。或者,将XTEN与侧接裂解位点一起插入构建体中;优选的是位点易经受见于凝结测定中的蛋白酶裂解,以使XTEN在FVIII组分的活化期间被释放,由此提供关于融合蛋白中的XTEN插入位点的适合性的额外信息。

[0646] 一旦评估所有个别插入位点且鉴定有利插入位点,即产生两个、三个、四个、五个或更多个XTEN插入呈各种排列的有利位点中的构建体的文库。改变XTEN(例如,AE家族的XTEN相对于AG家族的XTEN)的长度和净电荷以确定这些变量对融合蛋白的FVIII活性和物理化学性质的影响。接着使用如以下实施例中所述的小鼠和/或狗甲型血友病模型或本领域中已知的其它模型在体内评估保留所需程度的体外促凝血FVIII活性的CFXTEN构建体。此外,在FVIII抑制剂和其它抗FVIII抗体存在下测定构建体以确定保留活性的构建体。此外,制备在或接近FVIII和XTEN的接合点(例如,来自表8的序列)处并有被设计来释放XTEN的裂解序列的CFXTEN构建体,且评估FVIII活性增强和对终末半衰期的影响。通过在组合不同插入位点,改变XTEN(例如,不同XTEN家族)的长度和组成特性,以及进行评估下制备构建体的迭代方法,熟练技术人员通过前述方法获得具有所需性质的CFXTEN,所述性质如但不限于促凝血FVIII活性、与FVIII抑制剂的结合降低、药代动力学性质增强、能够通过不同途径向受试者施用、和/或医药性质增强。

[0647] 实施例15:产生和评估含有FVIII和AE_XTEN的CFXTEN的方法

[0648] 一种用于产生和评估CFXTEN组合物的一般性流程呈现于图15中,且形成用于一般性描述这个实施例的基础。使用公开的方法和为本领域普通技术人员所知的方法以及在说明性实例中提供的指导,熟练技术人员可产生和评估包含XTEN和FVIII或FVIII的本领域中已知的变体的CFXTEN融合蛋白。因此,所述实施例将被解释为仅说明而非以无论什么任何方式限制方法;众多变化形式将为普通熟练技术人员显而易知。在这个实施例中,产生因子VIII BDD连接于AE基序家族的XTEN的CFXTEN。

[0649] 用于产生编码XTEN的多核苷酸的一般性流程呈现于图11和12中。图14是在装配本发明的一个实施方案中的XTEN多核苷酸构建体时的代表性步骤的示意流程图。个别寡核苷

酸501退火成序列基序502(如含12个氨基酸的基序(“12-mer”)),502被连接于来自文库的其它序列基序,其可多聚化以产生涵盖所需长度的XTEN 504的集合,且502连接于较小浓度的含有BbsI和KpnI限制位点的寡聚物503。基序文库包括特定序列XTEN家族;例如,表3的AD、AE、AF、AG、AM或AQ序列。如图14中所说明,在这个情况下,XTEN长度是36个氨基酸残基,但也通过这个一般性方法获得较长长度。举例来说,通过连接、重叠延伸、PCR装配或本领域中已知的类似克隆技术进行多聚化,在这个情况下,所述多聚化产生具有288个氨基酸残基的构建体。将连接产物的所得集合进行凝胶纯化且切割具有所需长度的XTEN的条带,从而产生具有封堵序列505的分离的XTEN基因。XTEN基因可克隆至填充载体中。在这个情况下,载体编码任选CBD序列506和GFP基因508。接着用BbsI/HindIII进行消化以移除507和508且放置终止密码子。接着将所得产物克隆至BsaI/HindIII消化的含有编码FVIII的基因的载体中,从而产生编码具有连接于因子VIII的C末端的含288个氨基酸的XTEN的CFXTEN融合蛋白的基因500。如将为本领域普通技术人员显而易知,方法被应用于产生呈替代性构型且具有不同XTEN长度或XTEN在多个位置中的构建体。

[0650] 编码FVIII的DNA序列是通过本领域中已知的标准程序自由适当细胞来源制备cDNA文库、自基因组文库方便地获得,或可使用自公开可用的数据库、专利或参考文献获得的DNA序列合成(例如,自动核酸合成)产生。在本实施例中,FVIII B结构域缺失的(BDD)变体是如实施例17中所述制备。接着将编码蛋白质的FVIII部分的基因或多核苷酸或它的互补序列克隆至构建体(如本文所述的那些)中,所述构建体可为在适当转录和翻译序列控制下以在生物系统中达成高水平蛋白质表达的质粒或其它载体。通过将编码XTEN部分的第二基因或多核苷酸或它的互补序列通过连接或多聚化步骤,邻近编码CF的基因且与编码CF的基因同框克隆至构建体中来使它基因融合于编码FVIII基因的末端的核苷酸。以此方式,在构建体内产生编码(或互补于)CFXTEN融合蛋白的嵌合DNA分子。任选地,插入编码第二XTEN的基因且在内部同框连接于编码FVIII编码区域的核苷酸。设计呈不同构型的构建体以编码XTEN在FVIII序列中的各种插入位点,包括表5、表6、表7、表8和表9的那些或图8-9中说明的那些。任选地,将这个嵌合DNA分子转移或克隆至作为更适当表达载体的另一构建体中;例如,适于哺乳动物宿主细胞(如CHO、BHK等)的载体。此时,视如上文所述的细胞宿主的类型而定,如下更完全所述或通过熟知方法,用嵌合DNA分子转化能够表达嵌合DNA分子的宿主细胞。

[0651] 在如适于使启动子活化而加以改进的常规营养培养基中培养含有XTEN-FVIII表达载体的宿主细胞。如温度、pH等的培养条件是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些条件,且将为普通熟练技术人员显而易知。在表达融合蛋白之后,收集培养肉汤且与细胞团块分离并保留所得粗提取物以纯化融合蛋白。

[0652] 例如通过常规DNA印迹、用以定量mRNA的转录的RNA印迹[Thomas,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:5201-5205(1980)]、点印迹(DNA分析)、或使用基于本文提供的序列的适当标记的探针进行原位杂交来直接测量样本中的基因表达。或者,通过免疫荧光方法测量基因表达,所述方法如细胞的免疫组织化学染色以直接定量基因产物的表达。适用于免疫组织化学染色和/或测定样本流体的抗体可为单克隆或多克隆的,且可在任何哺乳动物中制备。合宜的是,抗体可针对FVIII序列多肽,使用基于本文提供的序列的合成肽,或针对融合于FVIII且编码特定抗体表位的外源性序列加以制备。可选择标记物的实例

为本领域技术人员所熟知且包括报道体,如增强的绿色荧光蛋白(EGFP)、β-半乳糖苷酶(β-gal)或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。

[0653] 通过本领域中已知的方法纯化CFXTEN多肽产物。如凝胶过滤、亲和纯化、盐分级分离、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、羟磷灰石吸附色谱、疏水性相互作用色谱或凝胶电泳的程序是可用于纯化中的全部技术。特定纯化方法描述于Robert K.Scopes,Protein Purification:Principles and Practice.Charles R.Castor编.Springer-Verlag 1 994以及Sambrook等(上文)中。多步纯化分离也描述于Baron等,Crit.Rev.Biotechnol.10:179-90(1990)以及Below等,J.Chromatogr.A.679:67-83(1 994)中。

[0654] 如图15中所说明,表征分离的CFXTEN融合蛋白的化学和活性性质。使用本领域中已知的标准方法表征分离的融合蛋白的例如序列、纯度、表观分子量、溶解度和稳定性。评估满足预期标准的融合蛋白的活性,其可通过使用一种或多种本文公开的测定,或使用实施例或表49的测定测量本文所述的一个因子VIII相关参数来在体外或在体内测量。

[0655] 此外,向一个或多个动物物种施用CFXTEN FVIII融合蛋白以测定标准药代动力学参数和药力学性质,如实施例25和26中所述。

[0656] 通过产生、表达和回收CFXTEN构建体的迭代方法,随后使用本文公开的方法或本领域中已知的其它方法对它们进行表征,产生并评估包含CF和XTEN的CFXTEN组合物以确认预期性质,如溶解度增强、稳定性增强、药代动力学改进和免疫原性降低,从而导致相较于相应未融合的FVIII,治疗活性总体增强。对于不具有所需性质的那些融合蛋白,通过这些方法构建、表达、分离和评估不同序列或构型以获得具有所述性质的组合物。

[0657] 实施例16:BDD FVIII的表达质粒的构建

[0658] I.B结构域缺失的FVIII(BDD FVIII)表达载体的构建

[0659] 通过将BDD FVIII开放阅读框克隆至含有多聚腺苷酸以允许达成FVIII基因的最优哺乳动物表达的pcDNA4载体(Invitrogen,CA)中,从而产生指定为pBC0100的构建体来产生编码BDD FVIII的表达载体。在这个构建体内鉴定供克隆使用的若干天然位点,包括BsiWI48、AflII 381、PshAI 1098、KpnI 1873、BamHI 1931、PflMI 3094、ApaI 3574、XbaI 4325、NotI 4437、XhoI 4444、BstEII 4449、AgeI 4500、PmeI 4527。为有助于测定开发,将编码Myc和His标签的核苷酸引入FVIII开放阅读框中。使用以下引物PCR扩增pBC0100以在适当位置中引入BsiWI和XhoI:1)F8-BsiWI-F:tattccCGTACGgccgccaccATGCAAATAGAGCTCTCCACCT(SEQ ID NO:1658);2)F8-nostop-XhoI-R1:GGTGACCTCGAGcgtagaggtcctgtgcctcg(SEQ ID NO:1 659)。PCR产物用BsiWI和XhoI消化。PcDNA4-Myc-His/C用Acc65I和XhoI消化,此产生5003bp和68bp的两种产物。使5003bp产物与消化的PCR FVIII片段连接且用于DH5α转化。酶Acc65I和BsiWI产生可相容末端,但这个连接会破坏用于未来消化的位点。所得构建体指定为pBC0102(pcDNA4-FVIII_3-Myc-His)。为有助于设计和执行未来克隆策略,尤其是涉及产生含有多个XTEN插入物的BDD FVIII表达构建体的策略,我们选择用以并入的其它独特限制酶位点,包括BsiWI 908、NheI 1829和ClaI 3281。通过QuikChange方法(Agilent,CA)个别地进行这些位点的引入。所得构建体指定为pBC0112(pcDNA4-FVIII_4-Myc-His)。为避免可由于连接在Myc/His和FVIII/Myc之间的接头肽而产生的问题,且为移除优选用于未来XTEN插入的限制酶位点,我们通过QuikChange方法使编码肽序列发生以下序列突变:自ARGHPF(SEQ ID NO:1660)至GAGSPGAETA(SEQ ID NO:178)(在FVIII与Myc之

间)、自NMHTG(SEQ ID NO:1661)至SPATG(SEQ ID NO:1662)(在Myc与His之间)。构建体指定为pBC0 114(pcDNA4-FVIII_4-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662))(表21中的序列),其用作用于设计和产生并有XTEN序列的其它表达载体的基础载体。呈现这个构建体的表达和FVIII活性数据

[0660] II.B结构域缺失的FVIII(BDD FVIII)表达载体的构建

[0661] 编码BDD FVIII的基因是由GeneArts(Regensburg,Germany)合成在克隆载体pMK(pMK-BDD FVIII)中。BDD FVIII蛋白含有1457个氨基酸,总分子量是167539.66。在野生型FVIII蛋白内存在6个结构域,即A1、A2、B、A3、C1和C2结构域。在BDD FVIII蛋白中,大多数B结构域已被缺失,因为显示它是非结构化结构域且移除结构域不改变这个蛋白质的关键功能。由GeneArts使用的pMK载体不含有启动子,且不能用作表达载体。引入在5'末端的限制酶位点NheI以及在3'末端的限制酶位点SfiI、SalI和XhoI以有助于将编码BDD FVIII的DNA序列亚克隆至表达载体,如CET1019-HS(Millipore)中。也将若干独特限制酶位点引入FVIII序列中以允许进一步操作(例如,插入、突变诱发)DNA序列。与它们的切割位点一起列出的独特位点包括但不限于:SacI 391、AfiII 700、SpeI 966、PshAI1417、Acc65I 2192、KpnI 2192、BamHI 2250、HindIII 2658、PfoI 2960、PflMI 3413、ApaI3893、Bsp12013893、SwaI 4265、OliI 4626、XbaI 4644和BstBI 4673。。HindIII位点存在于A2结构域的极末端处且可潜在用于修饰B结构域。由GeneArts合成的pMK-BDD FVIII不含有终止密码子。终止密码子是通过使用以下引物扩增FVIII的127bp片段来引入:5'-GTGAACTCTCTAGACCCACCG-3'(SEQ ID NO:1663);5'-CTCCTCGAGGTCGACTCAGTAGAGGTCCTGTGCCTCG-3'(SEQ ID NO:1664)。片段用XbaI和SalI消化,且连接于XbaI/SalI消化的pMK-BDD FVIII。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。名为pBC0027(pMK-BDD FVIII-终止)的构建体含有编码BDD FVIII蛋白的编码序列。pBC0027构建体接着用NheI/SalI消化,且与NheI/SalI消化的CE T1019-HS载体(Millipore)连接。CET1019-HS载体含有人CMV启动子和UCOE序列以有助于基因表达。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。最终构建体指定为pBC0025(CE T1019-HS-BDD FVIII-终止),其在人CMV启动子的控制下编码BDD FVIII蛋白。预期将pBC0025构建体引入哺乳动物细胞中会允许具有促凝血活性的BDD FVIII蛋白的表达。

[0662] 实施例17:含有XTEN的BDD FVIII的表达质粒的构建

[0663] 1.B结构域AE42插入

[0664] 并行操作两个PCR反应以将XTEN_AE42插入BDD FVIII构建体的剩余B结构域区域中。PCR反应涉及以下引物:cgaaagcgctacgcctgagaGTGGCCCTGGCTCTGAGCCAGCCACCTCCGGCTCTGAAACCCCTGCCTCGAGCccaccagtcttgaaacgcc(SEQ ID NO:1665);TGATATGGTATCATCATAATCGATTTCCTCTTGATCTGACTG(SEQ ID NO:1666);agcttgaggatccagagttc(SEQ ID NO:1667);tctcaggcgtagcgctttcgCTTGTCCCCTCTTCTGTTGAGGTGGGGGAGCCAGCAGGAGAACCTGGCGCGCCgttttgagagaagcttcttggt(SEQ ID NO:1668)。PCR产物接着充当模板,且进行第二次PCR以将XTEN_AE42引入由BamHI和ClaI侧接的FVIII编码核苷酸序列中。这个PCR产物用BamHI和ClaI消化,同时用相同的两种酶消化PBC0114。使PCR产物连接于消化的载体。将这个构建体指定为pBC0135(pcDNA4-FVIII_4XTEN__AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His)('GAGSPGAETA'

和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),且编码AE42XTEN并入在残余B结构域内的BDD FVIII。

[0665] 2.AE42插入和R1648A突变

[0666] QuikChange方法(Agilent,CA)用于将R1648A突变引入PBC0135中。这个构建体指定为

[0667] pBC0149(pcDNA4-FVIII_4XTEN_AE42-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His_R1648A)('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),从而消除那个FVIII加工位点。

[0668] 3.B结构域AE288插入

[0669] 使用以下引物对XTEN_AE288进行PCR扩增:tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc(SEQ ID NO:1669)和tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc(SEQ ID NO:1670)。PBC0075用作这个PCR反应的模板。PCR产物用AscI和XhoI消化,且PBC0135用相同酶消化。使PCR产物连接于PBC0135片段。将这个构建体指定为pBC0136(pcDNA4-FVIII_4XTEN__AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His)('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),且编码AE288XTEN并入在残余B结构域内的BDD FVIII。

[0670] 4.AE288插入和R1648A突变

[0671] 使用以下引物对XTEN_AE288进行PCR扩增:tctcaaaacGGCGCGCCAggtacctcagagtctgctacc(SEQ ID NO:1671)和tggtggGCTCGAGGCtggcgcactgccttc(SEQ ID NO:1672)。构建体pBC0075用作这个PCR反应的模板。PCR产物用AscI和XhoI消化,且pBC0149用相同酶消化。使PCR产物连接于pBC0149片段。将这个构建体指定为pBC0137(pcDNA4-FVIII_4XTEN__AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-HisR1648A)('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),且含有在B结构域内部的AE288XTEN序列,其中R1648A突变消除那个FVIII加工位点。

[0672] 3.伴有和不伴有R1648A突变的B结构域AE144、AG144、AG288插入

[0673] 对所选XTEN片段进行PCR扩增以将AscI和XhoI位点分别引至5'末端和3'末端。PCR产物用AscI和XhoI消化,且pBC0135(针对R1648)或pBC0149(针对A1648)用相同酶消化。使PCR产物连接于pBC0135或pBC0149载体。将这些构建体指定为pSD0005、6、7、8、17和18。

[0674] XTEN插入在C末端处的BDD FVIII的表达质粒的构建

[0675] 1.C末端AE288插入

[0676] 使用以下引物对XTEN_AE288进行PCR扩增:ggggccgaaacggccggtacctcagagtctgctacc(SEQ ID NO:1673)和tgttcggccgtttcggcccctggcgcactgccttc(SEQ ID NO:1674)。构建体pBC0075用作这个PCR反应的模板。PCR产物用SfiI消化,且pBC0114用相同酶消化。使PCR产物连接于消化的pBC0114片段。将这个构建体指定为pBC0145(pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AE288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His)('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),且编码在BDD FVIII的C末端处的AE288序列。

[0677] 2.C末端AG288插入

[0678] 通过DNA2.0(Menlo Park,CA)设计和合成XTEN_AG288。使用以下引物对合成的基因进行PCR扩增:ggggccgaaacggccccgggagcgtcacc(SEQ ID NO:1675)和tgttcggccgtttcggcccctgacccggttgcccc(SEQ ID NO:1676)。PCR产物用SfiI消化,且PBC0114基载体用相同

酶消化。使PCR产物连接于消化的pBC0114片段。将这个构建体指定为pBC0146(pcDNA4-FVIII_4-XTEN_AG288-GAGSPGAETA-Myc-SPATG-His)('GAGSPGAETA'和'SPATG',分别公开为SEQ ID NO 178和1662),且编码在BDD FVIII的C末端处的AG288序列。

[0679] 3.C末端AE/AG144、288、864插入

[0680] 使用以下引物通过QuikChange方法将AscI和XhoI位点引入PBC0114基载体中:5037-PBC0114-AscI-XhoI-F:CAGGACCTCTACGGCGCgccagcctcgaGCGAACAAAAACTCATCTCAGAAGAGG(SEQ ID NO:1677);5038-PBC0114-AscI-XhoI-R:CCTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGCtcgaggctggcGCGCCGTAGAGGTCCTG(SEQ ID NO:1678)。将AscI和XhoI分别引入5'末端和3'末端中的各种XTEN片段进行PCR扩增。使PCR产物连接于消化的PBC0114载体。将这些构建体指定为pSD0013、pSD0014、pSD0015、SD0016、pSD0019和pSD0020。

[0681] 具有结构域间和结构域内XTEN插入物的BDD FVIII的表达质粒的构建

[0682] 1.AE7、AE42和AE144插入

[0683] 四种不同策略用于将AE42插入BDD FVIII编码序列内的各自有助于产生若干构建体的指定位点(例如,天然或引入的限制位点BsiWI 48、AflII 381、PshAI 1098、KpnI 1873、BamHI 1931、PflMI 3094、ApaI 3574、XbaI 4325、NotI 4437、XhoI 4444、BstEII 4449、AgeI 4500、PmeI 4527、BsiWI 908、NheI 1829和ClaI 3281)中。通过设计,AE42的这些插入物产生侧接在插入物的任一侧上的AscI和XhoI位点,从而允许引入/取代较长XTEN以及具有不同序列或需要时并入的裂解序列的XTEN。具体来说,含有XTEN_144插入物的构建体列于表21中。这些插入是通过用由AscI和XhoI位点侧接的PCR XTEN_144片段置换AE7或AE42来产生。

[0684] 2.双重PCR介导的方法

[0685] 并行操作两个PCR反应以将XTEN_AE42插入指定位点中。两个PCR反应通过使用含有部分XTEN的长引物来在3'末端或5'末端上引入XTEN。PCR产物接着充当模板,且进行第二次PCR以将XTEN_AE42引入由所选限制酶位点侧接的FVIII编码核苷酸序列中。这个PCR产物用适当酶消化,同时使用相同的两种酶消化PBC0114。使PCR产物连接于消化的载体。使用这个方法,产生指定为pBC0126、pBC0127、pBC0128和pBC0129的构建体,从而导致AE42分别插入在R3、R3、P130、L216位置处。序列列于表21中。所选XTEN_144序列可接着进行PCR以在片段的任一末端上引入AscI和XhoI位点,且连接于消化的FVIII-XTEN_AE42构建体。举例来说,pSD0053是通过用XTEN_AE144置换pBC0129的AE42来产生。通过相同策略产生其它XTEN_144构建体且列于表21中。

[0686] 3.QuikChange介导的两步克隆方法

[0687] QuikChange方法用于将由AscI和XhoI侧接的XTEN_AE7编码序列引入指定位点中。所得中间构建体接着用AscI和XhoI消化。对XTEN_AE42或XTEN_AE144进行PCR扩增以引入两个位点且相应地加以消化。接着连接载体和插入物以产生最终构建体。序列列于表21中。

[0688] 4.三PCR II型限制酶介导的连接方法

[0689] 进行三个PCR反应以产生两段由一种与FVIII_4基因内的独特位点相关联的I型限制酶和一种II型酶(例如BsaI、BbsI、BfuAI)侧接的FVIII编码片段,第三PCR反应产生由两个II型限制酶位点侧接的XTEN_AE42。三个PCR片段用适当酶消化且连接至一个在FVIII编码序列的片段内含有XTEN_AE42插入物的线性段中。这个产物接着用适当独特酶在FVIII编

码序列内消化且连接于用相同酶消化的PBC0114构建体,且产生指定为pBC0130(XTEN插入在残基P333处)、pBC0132(XTEN插入在残基D403处)、pBC0133(XTEN插入在残基R490处)的构建体。序列列于表21中。所选XTEN_144序列可接着进行PCR以在片段的任一末端上引入AscI和XhoI位点,且连接于消化的FVIII-XTEN_AE42构建体。举例来说,通过分别用XTEN_AE144和XTEN_AG144置换pBC0132的AE42来产生pSD0001和pSD0003。通过相同策略产生表21中所列的其它XTEN_144构建体。

[0690] 5.定制基因合成

[0691] 定制基因合成是由GeneArt(Regensburg,Germany)所进行。设计基因以使它们包括编码插入指定位点中的XTEN_AE42的核苷酸且基因由在FVIII_4基因内选择的两个独特限制酶位点侧接。合成的基因和PBC0114用适当酶消化且连接以产生最终产物,其中BDD FVIII在限制位点之间并有XTEN_AE42。所选XTEN_144序列可接着进行PCR以在片段的任一末端上引入AscI和XhoI位点,且连接于消化的FVIII-XTEN_AE42构建体。

[0692] 双重XTEN插入在B结构域中和C末端处的表达质粒的构建

[0693] 编码在残余B结构域内并有AE288XTEN的BDD FVIII的构建体pBC0136用BamHI和ClaI消化,且自这个消化获得的1372bp片段是插入物。构建体pBC0146用BamHI和ClaI消化,且来自这个消化的9791bp段是载体。将载体和插入物连接在一起以产生pBC0209,其含有在B结构域内的AE288插入物和在C末端上的AG288。使用PBC0145作为载体,相同策略用于产生含有两个分别在B结构域中和C末端处的AE288插入物的构建体。

[0694] 具有多个XTEN插入物的表达质粒的构建

[0695] 编码在FVIII的R3位置处的AE42XTEN的构建体pBC0127用BsiWI和AflII消化,且由这个消化获得的所得468bp片段是插入物。构建体pBC0209用BsiWI和AflII消化,来自这个消化的10830bp段是载体。将载体和插入物连接在一起以产生指定为pBC0210的构建体,其含有在A1结构域中的AE42插入物、用以恢复信号裂解序列的额外三个ATR氨基酸、在B结构域内的AE288XTEN插入物和在C末端上的AG288。相同方法用于产生编码在天然和引入的限制位点处的多个XTEN的构建体;所述限制位点例如BsiWI 48、AflII 381、PshAI 1098、KpnI 1873、BamHI 1931、PflMI 3094、ApaI 3574、XbaI 4325、NotI4437、XhoI 4444、BstEII 4449、AgeI 4500、PmeI 4527、BsiWI908、NheI 1829和ClaI 3281。

[0696] BDD FVIII-内部XTEN_AE288表达载体的构建

[0697] 遵循制造商方案(Agilent Technologies,CA),使用QuikChange方法将两个BsaI限制酶位点引入PBC0027pMK-BDD FVIII构建体中的碱基对2673与2674之间。插入的DNA序列是gggtctcccgcgccagggtctccc,且所得构建体指定为pBC0205(序列在表21中)。接着用在5'与3'两者上引入BsaI位点的引物使编码AE288(或其它变化形式和长度的XTEN;例如AE42、AG42、AG288、AM288)的DNA序列进行PCR。pBC0205载体和插入物(XTEN_288)接着用BsaI消化且连接以产生pBC0206,其编码XTEN_AE288插入在B结构域内的FVIII基因(序列在表21中)。pBC0206构建体接着用NheI/SalI消化,且与NheI/SalI消化的CET1019-HS载体(Millipore)连接。CET1019-HS载体含有人CMV启动子和UCOE序列以有助于基因表达。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。最终构建体指定为pBC0207(CET1019-HS-BDD FVIII-终止),其在人CMV启动子的控制下编码BDD FVIII蛋白(序列在表21中)。预期将pBC0207构建体引入哺乳动物细胞中会

允许具有内部XTEN_AE288的BDD FVIII蛋白的表达。相同方案用于引入、转化和表达含有其它变化形式和长度的XTEN的构建体;所述XTEN例如AE42、AG42、AG288、AM288、AE864、AG864或表4的其它XTEN。

[0698] BDD_FVIII-/-XTEN_AE864表达载体的构建

[0699] 通过消化pBC0025构建体来产生NheI和SfiI侧接5'和3'末端的BDD FVIII片段。接着使这个消化的片段连接于编码继之以XTEN_AE864序列的FVIII的NheI/SfiI消化的pSecTag载体(pBC0048pSecTag-FVIII-/-XTEN_AE864)。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。最终构建体是pBC0060,其在人CMV启动子的控制下编码BDD FVIII-/-XTEN_AE864蛋白。预期将pBC0060构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有促凝血活性的具有C末端XTEN融合物的FVIII蛋白(BDD FVIII-/-XTEN_AE864)。

[0700] BDD FVIII-/FXI/-XTEN AE864表达载体的构建

[0701] 通过消化pBC0025构建体来产生NheI和SfiI侧接5'和3'末端的BDD FVIII片段。接着使这个消化的片段连接于编码继之以FXI裂解序列(/FXI/)和XTEN_AE864的NheI/SfiI消化的pSecTag载体(pBC0047pSecTag-FVIII-/FXI/-XTEN_AE864)。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。最终构建体是pBC0051,其在人CMV启动子的控制下编码BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864蛋白。预期将pBC0051构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有C末端XTEN融合物的FVIII蛋白(BDD FVIII-/FXI/-XTEN_AE864),其可随后由FXI裂解,因此释放具有促凝血活性的BDD FVIII蛋白。

[0702] 包含AE288或AG288的BDD FVIII-/FXI/-XTEN表达载体的构建

[0703] 通过用BsaI和HindIII消化XTEN序列AE288和AG288来置换pBC0060中的融合AE864XTEN序列。使用相应AE288或AG288XTEN片段和BsaI/HindIII消化的pBC0051进行的随后连接步骤允许AE288或AG288序列交换至BDD FVIII表达载体中。所得最终构建体是pBC0061(针对BDD FVIII-AE288)和pBC0062(针对BDD FVIII-AG288)。预期将pBC0061构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有促凝血活性的具有C末端AE288XTEN融合物的FVIII蛋白(BDD FVIII-/-XTEN_AE288)。预期将pBC0062构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有促凝血活性的具有C末端AG288XTEN融合物的FVIII蛋白(BDD FVIII-/-XTEN_AG288)。

[0704] 具有替代性XTEN的BDD FVIII-/FXI/-XTEN表达载体的构建

[0705] 通过用BsaI和HindIII消化编码其它XTEN序列(例如其它变化形式和长度的XTEN;例如AE42、AG42、AG288、AM288)的DNA来置换pBC0051中的融合XTEN序列。使用XTEN片段和BsaI/HindIII消化的pBC0051进行的连接允许各种XTEN编码序列交换至BDD FVIII表达载体中,从而提供替代性构建体。预期将替代性构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有C-末端XTEN的FVIII蛋白(BDD FVlII-/FXI/-XTEN),其可随后由FXI裂解,从而释放FVIII,从而产生具有促凝血活性的促凝血FVIII融合物。

[0706] 实施例18:FVIII信号肽.XTEN./FXI/.BDD FVIII的表达质粒的构建

[0707] FVIII信号肽-XTEN AE864的表达载体的构建

[0708] FVIII信号肽的编码序列是通过使以下两个寡聚物退火来产生:5'-CTAGCATGCAAATAGAGCTCTCCACCTGCTTCTTTCTGTGCCTTTTGCGATTCTGCTTTAGTGGGTCTCC-3'(SEQ ID NO:

1679);5'-ACCTGGAGACCCACTAAAGCAGAATCGCAAAAGGCACAGAAAGAAGCAGGTGGAGAGCTCTATTTGCATG-3'(SEQ ID NO:1680)。退火的寡聚物由NheI和BsaI限制酶位点侧接在任一末端上,且连接于编码FVII-XTEN_AE864的NheI/BsaI消化的pCW0645载体。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0029,其在人CMV启动子的控制下编码信号肽-XTEN_AE864蛋白。这个构建体用作用于产生XTEN融合在FVIII蛋白的N末端上的表达构建体的中间构建体,且也可用作用于产生允许XTEN融合在分泌的蛋白质的N末端上的表达构建体的主质粒。

[0709] 信号肽-XTEN AE864-/FXI/-BDD FVIII表达载体的构建

[0710] 使用在5'上引入NheI-BbsI-/FXI/-AgeI位点且在3'末端上引入内源性KpnI限制酶的引物扩增在FVIII编码区域内的1800bp片段。使NheI/KpnI消化的FVIII片段与NheI/KpnI消化的pBC0027载体连接。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将所得构建体指定为pBC0052,其含有编码无FVIII信号肽的/FXI/-FVIII蛋白的序列。这个构建体用作用于产生XTEN融合在FVIII蛋白的N末端上的表达构建体的中间构建体。

[0711] pBC0052载体用BbsI/XhoI酶消化,且用于与Bbsi/XhoI消化的pBC0029连接。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0053,其在人CMV启动子的控制下编码信号肽-XTEN_AE864-/FXI/-BDD FVIII蛋白。预期将pBC0053构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有N末端XTEN融合物的FVIII蛋白(信号肽-XTEN_AE864-/FXI/-BDD FVIII),其可随后由FXI裂解,因此释放BDD FVIII蛋白。

[0712] 信号肽-XTEN-/FXI/-BDD FVIII表达载体的构建

[0713] 可通过用BsaI和BbsI消化其它XTEN片段(例如AM、AF、AG)来置换pBC0053中的融合XTEN序列。使用XTEN片段和BsaI/BbsI消化的pBC0053进行的连接允许各种XTEN段(例如AM、AF、AG)交换至BDD FVIII表达载体中。各种XTEN融合物可不同地增加这些蛋白质的半衰期,从而允许改进这些蛋白质的性质(例如功效、效能)。预期将任何这些融合构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有N末端XTEN融合物的FVIII蛋白(信号肽-XTEN-/FXI/-BDD FVIII),其中融合的XTEN肽可随后由FXI裂解,从而产生BDD FVIII蛋白。

[0714] 实施例19:具有结构域间XTEN插入物的BDD FVIII的构建

[0715] XTEN插入在A2-B结构域边界处的BDD FVIII表达载体的构建

[0716] pBC0027构建体(pMK-BDD FVIII-终止)是被设计来含有BDD FVIII蛋白编码序列,但不含有被定位来启始BDD FVIII的表达的启动子的克隆载体。这个构建体用于操作BDD FVIII的编码序列,因为载体骨架含有极少数限制酶位点,因此允许进行容易的克隆策略。BDD FVIII蛋白含有1457个氨基酸,总分子量是167539.66。在野生型FVIII蛋白内存在6个结构域,即A1、A2、B、A3、C1和C2结构域。在BDD FVIII蛋白中,大多数B结构域已被缺失,因为据信它是非结构化结构域且移除结构域不改变这个蛋白质的关键功能。然而,B结构域边界似乎是用于产生XTEN融合物以允许延长蛋白质半衰期的极好位置。

[0717] 在pBC0027构建体内,在A2-B接合点的边界处存在独特HindIII限制酶位点。使用在XTEN编码序列的任一末端上引入HindIII和FXI裂解位点的引物扩增XTEN(例如,表4或13-17的序列)。可通过扩增各种XTEN片段来改变融合的vTEN序列。各种XTEN融合物可不同

地增加这些蛋白质的半衰期,从而允许改进这些蛋白质的性质(例如功效、效能)。HindIII-/FXI/-XTEN-/FXI/-HindIII片段用HindIII消化且与HindIII消化的pBC0027连接。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0054,其编码具有结构域间XTEN融合物的BDD FVIII蛋白(FVIII(A 1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C 1-C2)),但不具有用以启始基因表达的启动子。

[0718] pBC0054构建体用NheI/SalI消化,且与NheI/SalI消化的CET1019-HS载体(Millipore)连接。CET1019-HS载体含有人CMV启动子和UCOE序列以有助于基因表达。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0055(CET1019-HS-FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)),其在人CMV启动子的控制下编码具有结构域间(A2/B结构域间)XTEN融合物的BDD FVIII蛋白(FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2))。预期将pBC0055构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有结构域间XTEN融合物的BDD FVIII蛋白(FVIII(A1-A2)-/FXI/-XTEN-/FXI/-FVIII(C1-C2)),其可随后由FXI裂解,因此释放BDD FVIII蛋白。

[0719] XTEN插入在A1-A2结构域边界处的BDD FVIII表达载体的构建

[0720] 将pBC0027构建体设计成用于使用以下四种引物进行两个PCR反应的模板:

[0721] (反应I)5′-ATGATGGCATGGAAGCCTAT-3’(SEQ ID NO:1681);5’-

[0722] ATCCCTCACCTTCGCCAGAACCTTCAGAACCCTCACCTTCAGAACCTTCACCAGAACCTTCA

[0723] CCATCTTCCGCTTCTTCATTATTTTTCAT-3’(SEQ ID NO:1682)。

[0724] (反应II)5’-

[0725] TTCTGGCGAAGGTGAGGGATCTGAAGGCGGTTCTGAAGGTGAAGGTGGCTCTGAGGGTTCC

[0726] GAATATGATGATGATCTTACTGATTCTGAAAT-3’(SEQ ID NO:1683);5′-

[0727] TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3’(SEQ ID NO:1684)。

[0728] 产生的PCR产物分别是150bp和800bp。800bp产物用作用150bp产物作为一种引物且5’-TATTCTCTGTGAGGTACCAGC-3’(SEQ ID NO:1685)作为另一引物的下一轮PCR反应的模板。第二轮PCR的产物是930bp且用PshAI和ACC65I限制酶消化。使这个PshAI/Acc65I侧接的DNA片段与PshAI/Acc65I消化的pBC0027连接。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0058(pMK-BDD FVIII-D345-XTEN_Y36),其编码在D345残基之后具有结构域间(A1/A2结构域间)XTEN融合物的BDD FVIII蛋白。

[0729] pBC0058构建体用NheI/SalI消化,且与NheI/SalI消化的CET1019-HS载体(Millipore)连接。CET1019-HS载体含有人CMV启动子和UCOE序列以有助于基因表达。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0059(CE T1019-HS-BDD FVIIID345-XTEN_Y36),其在人CMV启动子的控制下编码在D345残基之后具有结构域间(A1/A2结构域间)XTEN融合物的BDD FVIII蛋白。预期将pBC0059构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有结构域间XTEN融合物的BDD FVIII蛋白(BDD FVIIID345-XTEN__Y36)。

[0730] 实施例20:具有结构域内XTEN插入物的FVIII的构建

[0731] XTEN插入在P598(在A2结构域内)之后的BDD FVIII表达载体的构建

[0732] 使用PCR技术,用以下引物扩增XTEN Y36的编码序列:

[0733] 5'-GAAGCTGGTACCTCACAGAGAATATACAACGCTTTCTCCCCAATCCAGGTGAAGGTTCTGGTGAAGG-3'(SEQ ID NO:1686)

[0734] 5'-AACTCTGGATCCTCAAGCTGCACTCCAGCTTCGGAACCCTCAGAGCC-3'(SEQ ID NO:1687)

[0735] 184bp PCR产物由KpnI和BamHI限制酶位点侧接在任一末端上,且连接于编码BDD FVIII基因的KpnII/BamHI消化的pBC0027载体。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0056,其含有编码在P598残基之后具有XTEN_Y36融合物的FVIII蛋白的DNA序列。这个克隆策略用于通过改变PCR反应的模板以及相应地改变引物来将各种形式的XTEN引入BDD FVIII蛋白中。

[0736] pBC0056构建体用NheI/SalI消化,且与NheI/SalI消化的CET1019-HS载体(Millipore)连接。CET1019-HS载体含有人CMV启动子和UCOE序列以有助于基因表达。连接的DNA混合物用于转化DH5a细菌细胞。通过DNA小型制备筛选转化体且通过DNA测序确认所需构建体。将最终构建体指定为pBC0057(CE T1019-HS-FVIIIP598-XTEN_Y32),其在人CMV启动子的控制下编码具有结构域内(A2结构域内)XTEN融合物的BDD FVIII蛋白。预期将pBC0057构建体引入哺乳动物细胞中会表达具有结构域内XTEN融合物的BDD FVIII蛋白(FVIIIP598-XTEN_Y32)。

[0737] 具有其它结构域内XTEN插入物的BDD FVIII表达载体的构建

[0738] 为将各种XTEN区段引入BDD FVIII内的其它结构域内位点中(例如,表4或13-17的XTEN),设计扩增具有可与BDD FVIII退火的突出的XTEN的引物。设计具有用以允许进行这些特定插入的各种独特限制酶位点的FVIII编码序列(pMK-BDD FVIII)。独特限制酶是与它们的切割位点一起在以下列出:NheI 376、SacI 391、AfiII 700、SpeI 966、PshAI 1417、Acc65I 2192、KpnI 2192、BamHI 2250、HindIII 2658、PfoI 2960、PflMI 3413、ApaI 3893、Bsp1201 3893、SwaI 4265、OliI 4626、XbaI 4644、BstBI 4673、SalI4756和XhoI 4762。在编码序列的任一末端上的NheI和SalI位点用于将DNA片段插入人CMV启动子驱动的载体CET1019-HS(Millipore)中以在哺乳动物细胞中进行表达。这些构建体表达具有表21中所列的序列的具有XTEN融合物的BDD FVIII蛋白。

[0739] 实施例21:具有XTEN插入物的FVIII的构建

[0740] 具有两个XTEN的CFXTEN:

[0741] 为获得在各种区域(自N末端至C末端:A1-R1、A1-R2、A2-R1、A2-R2、B结构域、a3、A3-R1、A3-R2、C末端)中具有两个XTEN插入物的CFXTEN,利用表达保留FVIII活性的具有单一XTEN插入物的融合物的构建体。设计具有各种独特限制酶位点以允许达成这些特定组合的FVIII编码序列(pBC0114pcDNA4-FVIII_4-X10-Myc-SPATG-His额外RE)('SPATG',公开为SEQ ID NO:1662)。独特限制酶是与它们的在不同区域之间的相对位点一起列于下表18中:BsiWI(在N末端与A1-R1之间)、AflII(在A1-R1与A1-R2之间)、NheI(在A1-R2与A2-R1之间)、KpnI(在A2-R1与A2-R2之间)、BamHI(在A2-R2与B结构域之间)、ClaI(在a3与A3-R1之间)、PflMI(在A3-R1与A3-R2之间)、XbaI(在A3-R2与C末端之间)、AgeI(在FVIIIC末端与终止密码子之间)。选择用于克隆文库的构筑嵌段和限制酶,如下表中所列。在摩尔比1:1下混合各

区域中的所选组分,且两组DNA混合物用独特限制酶消化。用1％琼脂糖凝胶分离DNA片段且通过Qiagen凝胶提取试剂盒纯化。在第一所需区域中具有XTEN插入物的DNA被视为插入物(琼脂糖凝胶中的较小DNA片段),而在第二所需区域中具有XTEN插入物的DNA被视为载体(琼脂糖凝胶中的较大DNA片段)。连接插入物和载体以重构质粒。连接的DNA混合物用于转化DH5α大肠杆菌感受态宿主细胞。通过滚环扩增(RCA)和Sanger测序以涵盖潜在文库大小的约3-4倍来筛选转化体。鉴定且小型制备独特克隆。两个不同限制消化反应接着用于进一步确认各区域中的XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。

[0742] 一个或两个XTEN插入在B/a3结构域内和C末端的CFXTEN:

[0743] FVIII的B/a3结构域和C末端是良好耐受XTEN插入物的非结构化区域。B/a3结构域进一步介导与其它辅因子,包括血管性血友病因子的相互作用。为研究在B/a3结构域处的最优XTEN插入物,通过PCR基突变诱发方法对区域进行所选缺失和突变。选择PCR反应且载体用如表18中所列的独特限制酶消化。用1％琼脂糖凝胶分离DNA片段且通过Qiagen凝胶提取试剂盒纯化。在第一所需区域中具有XTEN插入物的DNA被视为插入物(琼脂糖凝胶中的较小DNA片段),而在第二所需区域中具有XTEN插入物的DNA被视为载体(琼脂糖凝胶中的较大DNA片段)。连接插入物和载体以重构质粒。连接的DNA混合物用于转化DH5α大肠杆菌感受态宿主细胞。通过菌落PCR和Sanger测序以涵盖潜在文库大小的约8X来筛选转化体。鉴定且小型制备独特克隆。一个三酶限制消化反应接着用于进一步确认各区域中的XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。

[0744] 表18.用于具有两个XTEN插入物的FVIII文库的克隆设计

[0745]

文库 ID	插入组分(XTEN区域)	载体组分 (XTEN 区域)	限制酶
LSD0001	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-结构域)	pSD0013 (C-末端)	NheI + ClaI
LSD0002	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-结构域)	pSD0014 (C-末端)	NheI + ClaI
LSD0003	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-结构域)	pSD0019 (C-末端)	NheI + ClaI
LSD0004	pSD0005, pSD0006, pSD0007, pSD0008, pSD0017, pSD0018, pBC0136, pBC0137 (B-结构域)	pSD0020 (C-末端)	NheI + ClaI
LSD0005	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0001 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0006	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0002 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0007	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0008	pSD0045, pSD0046, pSD0048, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0004 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0037	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	pSD0032 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0038	pSD0039 (a3)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+ClaI
LSD0039	pSD0039 (a3)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+ClaI
LSD0040	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0041	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0042	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	ClaI+XbaI
LSD0043	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	ClaI+XbaI
LSD0044	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	PflMI+XbaI
LSD0045	pSD0039 (a3)	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	BamHI+ClaI
LSD0046	pSD0039 (a3)	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	BamHI+ClaI
LSD0047	pSD0046 (A1-R1)	pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
LSD0048	pSD0045, pSD0051 (A1-R1)	pSD0003 (A2-R1)	BsiWI+AflII
pNL0006	PCR 产物	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BamHI+PflMI
pNL0007	PCR 产物	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+PflMI
pNL0008	PCR 产物	LSD0003.009 (B结构域和C末端)	ClaI+PflMI
pNL0009	PCR	pSD0039 (a3结构域)	BamHI+AscI
pNL0010	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	pNL0009 (a3结构域)	XbaI+AgeI

[0746] 实施例22:3-5个XTEN插入在位点18/26、403、745/1656、1720、1900或2332处的BDD FVIII表达载体的构建

[0747] 选择XTEN插入在位点18/26、403、745/1656、1720、1900或2332处的FVIII融合构建体以重组且产生具有3、4、5或6个XTEN插入物的构建体。

[0748] 3-5个XTEN插入在位点26、403、1656、1720或1900处的BDD FVIII表达载体的构建

[0749] 在所需位点处具有单一XTEN的所选构建体是:pSD0050、pSD0001、pSD0039、pSD0010和pSD0062。在所需位点处具有双重XTEN的构建体包括LSD0005.002、LSD0038.001、LSD0040.002、LSD0042.01 3、LSD0039.01 0、LSD0041.008、LSD0043.008、LSD0045.002、

LSD0046.002和LSD0044.002。选择用于克隆构建体的构筑嵌段和限制酶,如下表19中所列。所选组分用独特限制酶消化。插入物和载体的DNA用1％琼脂糖凝胶分离且通过Qiagen凝胶提取试剂盒纯化。连接插入物和载体,且接着转化至DH5α大肠杆菌感受态宿主细胞中。通过RCA和DNA测序分析各构建体的四个菌落。小型制备具有所需XTEN插入物的克隆。限制消化反应接着用于进一步确认各区域中的XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。对所得构建体编号为pSD0077至pSD0092。

[0750] 4-6个XTEN插入在位点18、403、1656、1720、1900或2332处的BDD FVIII表达载体的构建

[0751] 构建体pSD0077至pSD0092充当构筑嵌段以产生在18、403、1656、1720、1900和2332处具有插入物的含4至6个XTEN的构建体。选择用于克隆构建体的构筑嵌段构建体和限制酶,如下表19中所列。所选组分用独特限制酶消化。插入物和载体的DNA用1％琼脂糖凝胶分离且通过Qiagen凝胶提取试剂盒纯化。连接插入物和载体,且接着转化至DH5α大肠杆菌感受态宿主细胞中。通过菌落PCR和DNA测序分析各构建体的八个菌落。小型制备具有所需XTEN插入物的克隆。限制消化反应接着用于进一步确认各区域中的XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。对所得构建体编号为pBC0247至pBC0257、pNL0022、23、24、25和30。

[0752] 4-6个XTEN插入在位点18、403、745、1720、1900或2332处的BDD FVIII表达载体的构建

[0753] 构建体pBC0247至pBC0252、pBC0255、pNL0022至pNL0025充当构筑嵌段以产生在18、403、745、1720、1900和2332处具有插入物的含4至6个XTEN的构建体。选择用于克隆构建体的构筑嵌段构建体和限制酶,如下表19中所列。所选组分用独特限制酶消化。插入物和载体的DNA用1％琼脂糖凝胶分离且通过Qiagen凝胶提取试剂盒纯化。连接插入物和载体,且接着转化至DH5α大肠杆菌感受态宿主细胞中。通过菌落PCR和DNA测序分析各构建体的八个菌落。小型制备具有所需XTEN插入物的克隆。限制消化反应接着用于进一步确认各区域中的XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。对所得构建体编号为pBC0258至pBC0268。

[0754] 表19:用于3.5个XTEN插入在位点26、403、1656、1720或1900处的FVIII文库的克隆设计

构建体名称	插入组分 (XTEN区域)	载体组分 (XTEN区域)	限制酶
pSD0077	pSD0050 (A1-R1)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	BsiWI+AflII
pSD0078	pSD0010 (A3-R1)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0079	pSD0062 (A3-R2)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0080	pSD0050 (A1-R1)	LSD0045.002 (a3, A3-R1)	BsiWI+AflII
pSD0081	pSD0050 (A1-R1)	LSD0046.002 (a3, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0082	pSD0050 (A1-R1)	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	BsiWI+AflII
pSD0083	pSD0010 (A3-R1)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0084	pSD0062 (A3-R2)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0085	pSD0062 (A3-R2)	LSD0041.008 (A2-R1, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0086	pSD0062 (A3-R2)	LSD0045.002 (a3, A3-R1)	PflMI+XbaI
pSD0087	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	LSD0040.002 (A1-R1, A3-R1)	NheI+ClaI
pSD0088	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	LSD0042.013 (A1-R1, A3-R2)	NheI+ClaI
pSD0089	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0005.002 (A1-R1, A2-R1)	ClaI+XbaI
pSD0090	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0038.001 (A1-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0091	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	LSD0039.010 (A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pSD0092	LSD0044.002 (A3-R1, A3-R2)	pSD0077 (A1-R1, A2-R1, a3)	ClaI+XbaI
pBC0247	pSD0077	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0248	pSD0078	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0249	pSD0079	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0250	pSD0080	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0251	pSD0082	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0252	pSD0080	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0253	pSD0087	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0254	pSD0088	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0255	pSD0089	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0256	pSD0090	LSD0050.003	NheI+BstBI
pBC0257	pSD0092	LSD0050.003	NheI+BstBI
pNL0022	LSD0003.009	pSD0083	XbaI+AgeI
pNL0023	LSD0003.009	pSD0084	XbaI+AgeI
pNL0024	LSD0003.009	pSD0085	XbaI+AgeI
pNL0025	LSD0003.009	pSD0086	XbaI+AgeI
pNL0030	LSD0003.009	pSD0091	XbaI+AgeI
pBC0258	LSD0003.006	pBC0247	BamHI+ClaI
pBC0259	LSD0003.006	pBC0248	BamHI+ClaI

[0755]

[0756]

构建体名称	插入组分(XTEN区域)	载体组分(XTEN区域)	限制酶
pBC0260	LSD0003.006	pBC0249	BamHI+ClaI
pBC0261	LSD0003.006	pBC0250	BamHI+ClaI
pBC0262	LSD0003.006	pBC0251	BamHI+ClaI
pBC0263	LSD0003.006	pBC0252	BamHI+ClaI
pBC0264	LSD0003.006	pBC0255	BamHI+ClaI
pBC0265	LSD0003.006	pNL0022	BamHI+ClaI
pBC0266	LSD0003.006	pNL0023	BamHI+ClaI
pBC0267	LSD0003.006	pNL0024	BamHI+ClaI
pBC0268	LSD0003.006	pNL0025	BamHI+ClaI

[0757] 实施例23:具有三个或四个XTEN的CFXTEN表达载体的构建:第一XTEN在B结构域中,第二XTEN在C末端处,且第三或第四XTEN插入在A1或A2或A3结构域内

[0758] 通过组合XTEN插入在A1、A2或A3结构域中的凝血活性克隆和XTEN插入在B结构域内和C末端处的克隆来构建具有三个XTEN插入物的CFXTEN融合蛋白的文库。构建第四XTEN添加在A1、A2或A3结构域中的其它文库以选择3个XTEN文库的成员。克隆流程的设计概述于下表中。通过限制酶消化和琼脂糖凝胶纯化来制备插入物和载体的DNA。在连接插入物与相应载体之后,连接的DNA混合物用于转化DH5α感受态大肠杆菌宿主细胞。通过RCA和测序以涵盖潜在文库大小的约3-4倍来筛选转化体。鉴定且小型制备独特克隆。三个不同限制消化反应接着用于进一步确认各XTEN的完整性。所得CFXTEN融合蛋白的氨基酸和编码DNA序列列于表21中。

[0759] 表20:用于3个XTEN插入在位点B结构域、C末端和A1/A2/A3结构域处的FVIII文库的克隆设计

[0760]

文库ID	插入组分(XTEN区域)	载体组分(XTEN区域)	限制酶
LSD0049	LSD0003.006(B结构域和C末端)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0050	LSD0003.009(B结构域和C末端)	pSD0045, pSD0046, pSD0049, pSD0050, pSD0051, pSD0052 (A1-R1)	BamHI+AgeI
LSD0051	LSD0003.006(B结构域和C末端)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0052	LSD0003.009(B结构域和C末端)	pSD0032, pSD0001, pSD0003 (A2-R1)	BamHI+AgeI
LSD0053	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0054	pSD0040, pSD0010, pSD0041 (A3-R1)	LSD0003.009 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0055	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI

[0761]

LSD0056	pSD0062, pSD0063, pSD0043, pSD0044 (A3-R2)	LSD0003.009 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0057	pSD0001 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	NheI+BamHI
LSD0058	pSD0003 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	NheI+BamHI
LSD0059	pNL0005 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	NheI+BamHI
LSD0060	pBC0246 (A2-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	NheI+BamHI
LSD0061	pSD0009 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0062	pSD0010 (A3-R1)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0063	pNL0004 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0064	pSD0063 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0065	pNL0002 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0066	pSD0043 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0067	pNL0003 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0068	pSD0044 (A3-R2)	LSD0049.021, LSD0049.002, LSD0049.011, LSD0049.012 (A1-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0069	pSD0009 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0070	pSD0010 (A3-R1)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0071	pNL0004 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0072	pSD0063 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0073	pNL0002 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0074	pSD0043 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0075	pNL0003 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
LSD0076	pSD0044 (A3-R2)	LSD0051.002, pBC0244, pBC0245 (A2-R1, B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pSD0093	pNL0004 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pSD0094	pSD0063 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pSD0095	pNL0002 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pSD0096	pSD0043 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pSD0097	pNL0003 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pSD0098	pSD0044 (A3-R2)	LSD0053.022 (A3-R1, B结构域和C末端)	PflMI+XbaI
pCS0001	pBC0168 (A1)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pCS0002	pBC0134 (A2_R2)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pCS0003	pBC0179 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	ApaI+XbaI
pCS0004	pBC0143 (C1)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	ApaI+XbaI
pCS0005	pBC0182 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	ApaI+XbaI
pCS0006	pBC0144 (C2)	LSD0055.021 (A3-R1, B结构域和C末端)	ApaI+XbaI
pBC0269	pBC0165 (A1_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pBC0270	pBC0132 (A2_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pBC0271	pBC0138 (A3_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pBC0272	pBC0176 (A3_R2)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pBC0273	pSD0001 (A2_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI

[0762]

pBC0274	pSD0009 (A3_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pBC0275	pNL0004 (A3_R2)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pBC0276	pBC0280 (A1_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pBC0277	pBC0281 (A2_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	BsiWI+BamHI
pBC0278	pBC0282 (A3_R1)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
pBC0279	pBC0283 (A3_R2)	LSD0003.006 (B结构域和C末端)	ClaI+XbaI
L09_01	pBC0284 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (B结构域和A3_R2)	XbaI+AgeI
L09_01	pSD0014 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (B结构域和A3_R2)	XbaI+AgeI
L09_01	pSD0020 (CT)	pBC0285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293 (B结构域和A3_R2)	XbaI+AgeI

[0763] 表21:FVIII-XTEN构建体的DNA和氨基酸序列

[0764]

构建体名称	氨基酸序列公开为 SEQ ID NO:	DNA 序列公开为 SEQ ID NO:
pBC0114	595	596
pBC0126	597	598
pBC0127	599	600
pBC0165	601	602
pBC0183	603	604
pBC0184	605	606
pBC0166	607	608
pBC0185	609	610
pBC0167	611	612
pBC0128	613	614
pBC0168	615	616
pBC0129	617	618
pBC0169	619	620
pBC0130	621	622
pBC0131	623	624
pBC0132	625	626
pBC0170	627	628
pBC0133	629	630
pBC0171	631	632
pBC0134	633	634
pBC0172	635	636
pBC0135	637	638
pBC0149	639	640
pBC0136	641	642
pBC0137	643	644
pBC0138	645	646
pBC0139	647	648
pBC0140	649	650
pBC0173	651	652
pBC0174	653	654
pBC0175	655	656
pBC0176	657	658
pBC0177	659	660
pBC0178	661	662
pBC0141	663	664
pBC0179	665	666
pBC0180	667	668
pBC0142	669	670

[0765]

pBC0143	671	672
pBC0181	673	674
pBC0182	675	676
pBC0144	677	678
pBC0145	679	680
pBC0146	681	682
pSD0001	683	684
pSD0002	685	686
pSD0003	687	688
pSD0004	689	690
pSD0005	691	692
pSD0006	693	694
pSD0007	695	696
pSD0008	697	698
pSD0009	699	700
pSD0010	701	702
pSD0011	703	704
pSD0012	705	706
pSD0013	707	708
pSD0014	709	710
pSD0017	711	712
pSD0018	713	714
pSD0019	715	716
pSD0020	717	718
pSD0015	719	720
pSD0016	721	722
pSD0021	723	724
pSD0022	725	726
pSD0023	727	728
pSD0024	729	730
pSD0025	731	732
pSD0026	733	734
pSD0027	735	736
pSD0028	737	738
pSD0029	739	740
pSD0030	741	742
pSD0031	743	744
pSD0032	745	746
pSD0033	747	748
pSD0034	749	750
pSD0035	751	752
pSD0036	753	754
pSD0037	755	756
pSD0038	757	758
pSD0039	759	760
pSD0040	761	762
pSD0041	763	764
pSD0042	765	766
pSD0043	767	768
pSD0044	769	770
pSD0062	771	772
pSD0063	773	774
pSD0045	775	776
pSD0046	777	778

[0766]

pSD0047	779	780
pSD0048	781	782
pSD0049	783	784
pSD0050	785	786
pSD0051	787	788
pSD0052	789	790
pSD0053	791	792
pSD0054	793	794
pSD0055	795	796
pSD0056	797	798
pSD0057	799	800
pSD0058	801	802
pSD0059	803	804
pSD0060	805	806
pSD0061	807	808
LSD0001.002	809	810
LSD0001.005	811	812
LSD0001.006	813	814
LSD0001.011	815	816
LSD0001.012	817	818
LSD0001.013	819	820
LSD0001.016	821	822
LSD0001.021	823	824
LSD0002.001	825	826
LSD0002.002	827	828
LSD0002.014	829	830
LSD0003.004	831	832
LSD0003.006	833	834
LSD0003.009	835	836
LSD0003.014	837	838
LSD0004.010	839	840
LSD0004.011	841	842
LSD0004.014	843	844
LSD0004.016	845	846
LSD0004.022	847	848
LSD0003.016	849	850
LSD0005.002	851	852
LSD0005.004	853	854
LSD0005.005	855	856
LSD0005.011	857	858
LSD0005.018	859	860
LSD0006.002	861	862
LSD0006.005	863	864
LSD0006.007	865	866
LSD0006.011	867	868
LSD0007.002	869	870
LSD0007.004	871	872
LSD0007.013	873	874
LSD0008.001	875	876
LSD0008.002	877	878
LSD0008.006	879	880
LSD0008.009	881	882
LSD0008.017	883	884
LSD0002.025	885	886

[0767]

LSD0002.013	887	888
LSD0003.025	889	890
LSD0004.025	891	892
LSD0003.005	893	894
LSD0007.008	895	896
LSD0044.002	897	898
LSD0044.005	899	900
LSD0044.039	901	902
LSD0044.022	903	904
LSD0044.003	905	906
LSD0044.001	907	908
LSD0038.001	909	910
LSD0038.003	911	912
LSD0038.008	913	914
LSD0038.012	915	916
LSD0038.013	917	918
LSD0038.015	919	920
LSD0039.001	921	922
LSD0039.003	923	924
LSD0039.010	925	926
LSD0045.001	927	928
LSD0045.002	929	930
LSD0042.014	931	932
LSD0042.023	933	934
LSD0042.006	935	936
LSD0042.013	937	938
LSD0042.001	939	940
LSD0042.039	941	942
LSD0042.047	943	944
LSD0042.003	945	946
LSD0042.004	947	948
LSD0042.008	949	950
LSD0042.038	951	952
LSD0042.082	953	954
LSD0042.040	955	956
LSD0037.002	957	958
LSD0037.009	959	960
LSD0037.011	961	962
LSD0047.002	963	964
LSD0047.005	965	966
LSD0048.007	967	968
LSD0046.001	969	970
LSD0046.002	971	972
LSD0046.003	973	974
LSD0040.011	975	976
LSD0040.042	977	978
LSD0040.002	979	980
LSD0040.008	981	982
LSD0040.021	983	984
LSD0040.037	985	986
LSD0040.046	987	988
LSD0040.003	989	990
LSD0040.006	991	992
LSD0040.007	993	994

[0768]

LSD0040.010	995	996
LSD0040.039	997	998
LSD0040.052	999	1000
LSD0041.001	1001	1002
LSD0041.004	1003	1004
LSD0041.006	1005	1006
LSD0041.008	1007	1008
LSD0041.010	1009	1010
LSD0041.014	1011	1012
LSD0041.016	1013	1014
LSD0041.035	1015	1016
LSD0043.001	1017	1018
LSD0043.002	1019	1020
LSD0043.005	1021	1022
LSD0043.006	1023	1024
LSD0043.007	1025	1026
LSD0043.008	1027	1028
LSD0043.015	1029	1030
LSD0043.029	1031	1032
LSD0043.043	1033	1034
pSD0077	1035	1036
pSD0078	1037	1038
pSD0079	1039	1040
pSD0080	1041	1042
pSD0081	1043	1044
pSD0082	1045	1046
pSD0083	1047	1048
pSD0084	1049	1050
pSD0085	1051	1052
pSD0086	1053	1054
pSD0087	1055	1056
pSD0088	1057	1058
pSD0089	1059	1060
pSD0090	1061	1062
pSD0091	1063	1064
pSD0092	1065	1066
LSD0049.002	1067	1068
LSD0049.008	1069	1070
LSD0049.011	1071	1072
LSD0049.012	1073	1074
LSD0049.020	1075	1076
LSD0049.021	1077	1078
LSD0050.002	1079	1080
LSD0050.003	1081	1082
LSD0050.007	1083	1084
LSD0050.010	1085	1086
LSD0050.012	1087	1088
LSD0050.014	1089	1090
LSD0051.002	1091	1092
LSD0051.003	1093	1094
LSD0052.001	1095	1096
LSD0052.003	1097	1098
LSD0053.021	1099	1100
LSD0053.022	1101	1102

[0769]

LSD0053.024	1103	1104
LSD0054.021	1105	1106
LSD0054.025	1107	1108
LSD0054.026	1109	1110
LSD0055.021	1111	1112
LSD0055.022	1113	1114
LSD0055.026	1115	1116
LSD0056.021	1117	1118
LSD0056.024	1119	1120
LSD0056.025	1121	1122
pNL0001	1123	1124
pNL0002	1125	1126
pNL0003	1127	1128
pNL0004	1129	1130
pNL0005	1131	1132
pNL0006	1133	1134
pNL0007	1135	1136
pNL0008	1137	1138
pNL0009	1139	1140
pNL0010	1141	1142
pBC0244	1143	1144
pBC0245	1145	1146
pBC0246	1147	1148
pBC0247	1149	1150
pBC0248	1151	1152
pBC0249	1153	1154
pBC0250	1155	1156
pBC0251	1157	1158
pBC0252	1159	1160
pBC0253	1161	1162
pBC0254	1163	1164
pBC0255	1165	1166
pBC0256	1167	1168
pBC0257	1169	1170
pBC0259	1171	1172
pBC0260	1173	1174
pBC0262	1175	1176
pBC0263	1177	1178
pBC0264	1179	1180
pBC0266	1181	1182
pBC0267	1183	1184
pBC0268	1185	1186
pNL0016	1187	1188
pNL0017	1189	1190
pNL0018	1191	1192
pNL0022	1193	1194
pNL0023	1195	1196
pNL0024	1197	1198
pNL0025	1199	1200
pNL0030	1201	1202
LSD0057.001	1203	1204
LSD0057.004	1205	1206
LSD0057.005	1207	1208
LSD0057.010	1209	1210

[0770]

LSD0058.003	1211	1212
LSD0058.005	1213	1214
LSD0058.006	1215	1216
LSD0059.002	1217	1218
LSD0059.003	1219	1220
LSD0059.005	1221	1222
LSD0059.006	1223	1224
LSD0060.001	1225	1226
LSD0060.003	1227	1228
LSD0060.004	1229	1230
LSD0061.002	1231	1232
LSD0061.007	1233	1234
LSD0061.008	1235	1236
LSD0061.012	1237	1238
LSD0062.001	1239	1240
LSD0062.002	1241	1242
LSD0062.006	1243	1244
LSD0062.007	1245	1246
LSD0063.001	1247	1248
LSD0063.003	1249	1250
LSD0063.011	1251	1252
LSD0064.017	1253	1254
LSD0064.018	1255	1256
LSD0064.020	1257	1258
LSD0064.021	1259	1260
LSD0065.001	1261	1262
LSD0065.007	1263	1264
LSD0065.014	1265	1266
LSD0066.001	1267	1268
LSD0066.002	1269	1270
LSD0066.009	1271	1272
LSD0066.011	1273	1274
LSD0067.004	1275	1276
LSD0067.005	1277	1278
LSD0067.006	1279	1280
LSD0067.008	1281	1282
LSD0068.001	1283	1284
LSD0068.002	1285	1286
LSD0068.005	1287	1288
LSD0068.010	1289	1290
LSD0069.004	1291	1292
LSD0069.008	1293	1294
LSD0070.003	1295	1296
LSD0070.004	1297	1298
LSD0070.005	1299	1300
LSD0071.001	1301	1302
LSD0071.002	1303	1304
LSD0071.008	1305	1306
LSD0072.001	1307	1308
LSD0072.002	1309	1310
LSD0072.003	1311	1312
LSD0073.002	1313	1314
LSD0073.004	1315	1316
LSD0073.006	1317	1318

LSD0074.007	1319	1320
LSD0074.010	1321	1322
LSD0074.011	1323	1324
LSD0075.003	1325	1326
LSD0075.004	1327	1328
LSD0075.007	1329	1330
LSD0076.002	1331	1332
LSD0076.003	1333	1334
pSD0093	1335	1336
pSD0094	1337	1338
pSD0095	1339	1340
pSD0096	1341	1342
pSD0097	1343	1344
pSD0098	1345	1346
pSD0099	1347	1348
pSD0100	1349	1350
pSD0101	1351	1352
pSD0102	1353	1354
pSD0103	1355	1356
pSD0104	1357	1358
pCS0001	1359	1360
pCS0002	1361	1362
pCS0003	1363	1364
pCS0004	1365	1366
pCS0005	1367	1368
pCS0006	1369	1370
pBC0269	1371	1372
pBC0270	1373	1374
pBC0271	1375	1376
pBC0272	1377	1378
pBC0273	1379	1380
pBC0274	1381	1382
pBC0275	1383	1384
pBC0276	1385	1386
pBC0277	1387	1388
pBC0278	1389	1390
pBC0279	1391	1392
pBC0280	1393	1394
pBC0281	1395	1396
pBC0282	1397	1398
pBC0283	1399	1400
pBC0284	1401	1402
pBC0285	1403	1404
pBC0286	1405	1406
pBC0287	1407	1408
pBC0288	1409	1410
pBC0289	1411	1412
pBC0290	1413	1414
pBC0291	1415	1416
pBC0292	1417	1418
pBC0293	1419	1420
pBC0294	1421	1422
pBC0295	1423	1424
pBC0296	1425	1426

[0771]

[0772]

pBC0297	1427	1428
pBC0298	1429	1430
pBC0299	1431	1432
pBC0300	1433	1434
pBC0301	1435	1436
pBC0302	1437	1438
pBC0303	1439	1440
pBC0304	1441	1442
pBC0305	1443	1444
pBC0306	1445	1446
pBC0307	1447	1448
pBC0308	1449	1450
pBC0309	1451	1452
pBC0310	1453	1454
pBC0311	1455	1456
pBC0312	1457	1458
pBC0313	1459	1460
pBC0314	1461	1462
pBC0315	1463	1464
pBC0316	1465	1466
pBC0317	1467	1468
pBC0318	1469	1470
pBC0319	1471	1472
pBC0320	1473	1474
pBC0321	1475	1476
PBC0322	1477	1478
PBC0323	1479	1480
pNL0040	1481	1482
pNL0041	1483	1484
pNL0042	1485	1486
pNL0043	1487	1488

[0773] 实施例24:哺乳动物细胞的转染、FVIII-XTEN的表达和FVIII活性的评估

[0774] 包括但不限于CHO、BHK、COS和HEK293的哺乳动物细胞适于用以上实施例的载体转化以表达和回收FVIII-XTEN融合蛋白。以下是用于通过短暂转染来表达BDD FVIII和FVIII-XTEN融合蛋白构建体pBC0114、pBC0135、pBC0136、pBC0137、pBC0145、pBC0146和pBC0149的方法的细节,所述短暂转染包括电穿孔和化学(PEI)转染方法。

[0775] 使自ATCC购买的粘着HEK293细胞在供应商推荐的培养基中复苏且传代数代,随后冷冻含具有5%DMSO的培养基的多个小瓶。在转染之前使一个小瓶复苏且再次传代。在转染之前1-2天,每次转染使用35ml培养基在每毫升约$7x10^5$的密度下将HEK293细胞接种在一个T175中。在转染当天,用胰蛋白酶处理细胞,分离且计数,接着于培养基中冲洗直至获得均匀细胞混悬液。对细胞计数且将适当体积的细胞(基于以上细胞计数)转移至50mL离心管中,以使每次转染存在约$4x10^6$个细胞。在500RCF下对细胞进行离心5分钟,丢弃上清液,且将细胞再混悬于10ml D-PBS中。

[0776] 电穿孔:对于电穿孔,使用微量吸液管(供应于Neon™转染系统100μL试剂盒中)添加适当体积的再混悬缓冲液,以使110μl缓冲液可用于每次转染。添加110μl单独体积的细胞混悬液至各Eppendorf管中,所述各Eppendorf管含有11μl各个别FVIII-XTEN构建体的质粒DNA,总计6μg(DNA的体积可较小,用无菌H2O足量至11μl)。Neon™转染装置用于转染。程序设置成在1100v下电穿孔持续脉冲宽度20ms,总计两个脉冲。将Neon™管(供应于NeonTM转染

系统100μL试剂盒中)置放入NeonTM吸移站中。添加3mL体积的电解缓冲液E2(供应于NeonTM转染系统100μL试剂盒中)至Neon™管中。Neon™吸移管和100 μl Neon™尖端用于使用NeonTM吸移站将100μl细胞-质粒DNA混合物电穿孔。执行电穿孔且当完成时,自站移除Neon™吸移管且具有转染的细胞的吸移管用于以圆周运动将细胞转移至含有10ml Opti-MEM I减血清培养基(1X,Invitrogen)的100mm x 20mm陪替氏平皿(petri plate)中,以使转染的细胞均匀分布在平皿上。在37℃下孵育用于各转染的细胞以进行表达。在转染后第3天,添加10%体积的10mM Hepes、5mM $CaCl_2$和4M NaCl的盐溶液至各细胞培养物中且温和混合30分钟。将各细胞培养物转移至50ml锥形离心管中且在4℃下在3000rpm下离心10分钟。将各培养物的上清液置放入50ml新锥形管中且接着分成5x 1ml等分试样于Eppendorf管中以及2x 15ml等分试样于锥形管中以进行测定或快速冷冻,随后在ELISA中测试FVIII-XTEN的表达以及在如本文所述的FVIII活性测定中测试性能。

[0777] 化学转染:化学转染可使用本领域中已知的标准方法来达成。在本实施例中,如所述利用PEI。

[0778] 在转染前1天将混悬293细胞于足以提供至少30ml工作体积的Freestyle 293(Invitrogen)培养基中以$7x10^5$个细胞/毫升接种,且在37℃下孵育。在转染当天,在室温下保持1.5ml转染培养基等分试样,向其中添加90μL 1mg/ml PEI且短暂涡旋。添加30μl体积的编码FVIII-XTEN_AE288构建体的DNA(浓度1mg/ml)至PEI溶液中,将所述溶液涡旋30秒。在室温下保持混合物5-15分钟。添加DNA/PEI混合物至HEK293细胞中且使用预先确定的振荡烧瓶条件在37℃下孵育混悬液。在添加DNA/PEI混合物之后约4小时,添加1x体积的扩增培养基且在37℃下孵育细胞5天。在收集当天,添加10%体积的10mM Hepes、5mM $CaCl_2$和4M NaCl的盐溶液至细胞培养物中且温和混合30分钟。将细胞培养物转移至50ml锥形离心管中且在4℃下在4000rpm下离心10分钟。将上清液置放入50ml新锥形管中且接着分成5x 1ml等分试样于Eppendorf管中以及2x 15ml等分试样于锥形管中以进行测定或快速冷冻,随后在ELISA中测试FVIII-XTEN的表达和/或在如本文所述的FVIII活性测定中测试性能。

[0779] 产生FVIII-XTEN的稳定集合和细胞系的产生

[0780] 通过在含有如嘌呤霉素的选择抗生素的培养基中培养转染的细胞3-5周来产生稳定集合,其中每2-3天更换培养基。稳定细胞可用于产生稳定克隆。对于在初级筛选期间的稳定细胞系选择,将来自稳定集合的正在进行传代或自冷冻小瓶复苏的细胞以0.5个细胞/孔的靶标密度接种于96孔板中。在接种之后约1周,通过活性测定或抗原测量来测试来自各孔的具有如在显微镜下观察的单细胞群集的消耗培养基中的FVIII的表达。

[0781] 对于其它轮筛选,将标准化数目的细胞接种于多孔板中。收集消耗培养基且通过ELISA和FVIII活性测定来测试FVIII浓度。也将自各板收集细胞且使用Vi-Cell进行计数。通过以下对克隆分级:(1)根据ELISA和活性的FVIII效价;(2)ELISA效价/细胞计数和活性效价/细胞计数的比率;和(3)如通过蛋白质印迹测量的由克隆产生的产物的完整性和均质性。自初级筛选选择各构建体的许多克隆以进行其它轮筛选。

[0782] 对于第二轮筛选,首先在T25烧瓶中扩增选自初级筛选的顶级克隆的于96孔板中的细胞且接着接种于双重24孔板中。自各板收集消耗培养基以进行FVIII活性和抗原定量且收集细胞并通过Vi-Cell进行计数。根据通过ELISA和活性测定获得的效价、ELISA效价/细胞和活性效价/细胞计数比率对克隆分级且接着加以选择。制备至少5-10个克隆的冷冻

小瓶且再次筛选这些克隆并根据按照ELISA和活性的效价、以及ELISA效价/细胞计数的比率和活性效价/细胞计数的比率、以及根据蛋白质印迹的产物完整性和均质性进行筛选和分级,并选择2-3个克隆以在振荡烧瓶中进行生产力评估。基于比生产力和产物质量选择最终克隆。

[0783] 由混悬293稳定克隆产生分泌在细胞培养基中的FVIII-XTEN

[0784] 将通过前述方法选择的HEK293稳定细胞克隆于表达培养基中以1-2X10^{5}个细胞/毫升接种于振荡烧瓶中。每日监测细胞计数、细胞活力、FVIII活性和抗原表达效价。在FVIII活性和抗原效价以及产物质量是最优的当天,通过离心/无菌过滤或深度过滤/无菌过滤收集培养物。滤液立刻用于切向流过滤(TFF)处理和纯化或储存在-80℃冷冻箱中以随后进行TFF处理和纯化。

[0785] 实施例25:CFXTEN构建体的纯化和表征

[0786] 以下是用于纯化和表征具有一个或多个XTEN的CFXTEN构建体的示例性方法。

[0787] 通过FVIII亲和色谱纯化FVII-XTEN AE864

[0788] 使用Cuno ZetaPlus Biocap过滤器和Cuno BioAssure胶囊式滤心过滤含有CFXTEN的上清液且随后使用具有30,000Da MWCO的Millipore Pellicon 2小型滤筒通过切向流过滤加以浓缩。使用相同切向流过滤滤筒,将样本渗滤至10mM组氨酸、20mM氯化钙、300mM氯化钠和0.02%吐温80(pH 7.0)中。FVIIISelect树脂(GE 17-5450-01)使用偶联于色谱树脂的13kDa重组蛋白配体选择性结合FVIII或B结构域缺失的FVIII。树脂用10mM组氨酸、20mM氯化钙、300mM氯化钠和0.02%吐温80(pH 7.0)平衡且装载上清液。柱用20mM组氨酸、20mM氯化钙、300mM氯化钠和0.02%吐温80(pH 7.0)洗涤,接着用20mM组氨酸、20mM氯化钙、1.0M氯化钠和0.02%吐温80(pH 7.0)洗涤,且用溶解于50%乙二醇中的20mM组氨酸、20mM氯化钙、1.5M氯化钠和0.02%吐温80(pH 7.0)洗脱。

[0789] 通过切向流过滤和渗滤进行浓缩和缓冲液交换

[0790] 使用Cuno ZetaPlus Biocap过滤器和Cuno BioAssure胶囊式滤心过滤来自表达CFXTEN的稳定CHO细胞系的以体积计总计至少10L的上清液批料。随后使用具有30,000Da MWCO的Millipore Pellicon 2小型滤筒,通过切向流过滤将它们浓缩约20倍。使用相同切向流过滤滤筒,样本用10mM组氨酸、20mM氯化钙、300mM氯化钠和0.02%吐温80(pH7.0)、10mM tris(pH 7.5)、1mM EDTA以足以进行缓冲液交换的5体积加以渗滤。将样本分成50ml等分试样且冷冻在-80℃下。

[0791] 通过阴离子交换色谱纯化CFXTEN

[0792] 使用Akta FPLC系统,利用SuperQ-650M柱纯化样本。柱于缓冲液A(0.02mol/L咪唑、0.02mol/L甘氨酸乙酯盐酸盐、0.15mol/LNaCl、2.5%甘油,pH 6.9)中平衡且装载样本。使用缓冲液B(5mmol/L组氨酸HCl(His/HCI)、1.15mol/LNaCl,pH 7.0)洗脱样本。215nm色谱图用于监测洗脱分布图。通过ELISA、SDS-PAGE或活性测定来测定洗脱份的FVIII。汇合峰值洗脱份且储存或立刻经受凝血酶活化(O'Brien等,Blood(1990)75:1664-1672)。使用aPTT基因子测定来测定洗脱份的FVIII活性。进行Bradford测定以测定装载物和洗脱份中的蛋白质总量。

[0793] 通过疏水性相互作用色谱纯化CFXTEN

[0794] 将含CFXTEN样本的缓冲液A(50mmol/l组氨酸、1mmol/l CaCl2、1M NaCl和0.2g/l

Tween80®,pH 7.0)装载于在缓冲液A中平衡的toyopearl醚650M树脂上。柱用10柱体积的缓冲液A洗涤以移除DNA、不正确折叠形式和FVIII、以及其它污染蛋白质。CFXTEN用缓冲液B(25mmol/l组氨酸、0.5mmol/l CaCl2和0.4mol/l NaCl,pH 7.0)以单步洗脱形式(美国专利6005082)洗脱。使用aPTT基因子测定来测定洗脱份的FVIII活性。进行Bradford测定以测定装载物和洗脱份中的蛋白质总量。

[0795] 用阴离子交换色谱自单体CFXTEN移除聚集蛋白质

[0796] 使用Akta FPLC系统,利用macrocap Q柱纯化样本。柱于缓冲液A(20mM MES、1mM CaCl2,pH 7.0)中平衡且装载样本。使用30％至80％线性梯度的缓冲液B(20mM MES、1mM CaCl2,pH 7.0+500mM NaCl)历经20个柱体积洗脱样本。215nm色谱图用于监测洗脱分布图。对应于早期洗脱部分的洗脱份主要含有单体蛋白质,而晚期洗脱部分主要含有聚集物质。通过尺寸排阻色谱用60cmBioSep G4000柱分析来自macrocapQ柱的洗脱份以确定汇合哪些洗脱份以产生无聚集体样本。

[0797] 由凝血酶活化FVIII

[0798] 在人凝血酶单位与FVIII单位的比率1:4下用凝血酶处理于5mmol/L组氨酸HCl(His/HCI)、1.15mol/LNaCl(pH 7.0)中的纯化FVIII,且在37℃下孵育样本多达2小时。为监测活化过程,接着取出这个样本的等分试样,且通过添加4.5体积冰冷丙酮进行丙酮沉淀。在冰上孵育样本10分钟,且通过在微量离心机中在13,000g下离心3分钟来收集沉淀。移除丙酮,且将沉淀再混悬于30μL SDS-PAGE还原性样本缓冲液中并煮沸2分钟。接着通过SDS-PAGE或蛋白质印迹测定样本。通过寻找转化成40和50kDa片段的重链以及转化成70kDa片段的轻链来检查FVIII向FVIIIa的转化(O'Brien等,Blood (1990)75:1664-1672)。

[0799] CFXTEN的SEC分析

[0800] 通过用60cm BioSep G4000柱进行尺寸排阻色谱来分析通过亲和色谱和阴离子交换色谱纯化的FVII-XTEN。流体动力学半径约10nm/表观MW约1.7MDa(XTEN-288融合物)或流体动力学半径约12nm/表观MW 5.3MDa(XTEN-864融合物)的单分散群体指示无聚集样本。预期CFXTEN具有表观分子量因子多达或约8(针对XTEN-288与FVIII融合)或多达或约15(针对XTEN-864与FVIII融合)。

[0801] CFXTEN的ELISA基浓度测定

[0802] 使用证实的抗体配对(VisuLize™ FVIII抗原试剂盒,Affinity Biologicals,Ontario Canada),利用双抗体酶联免疫吸附测定(ELISA)对因子VIII/CFXTEN抗原浓度进行定量测定。片孔用针对人FVIII的绵羊多克隆抗体预涂布。稀释血浆样本且施加至各孔。存在的FVIII抗原结合涂布的抗体。在洗除未结合物质之后,施加过氧化物酶标记的绵羊检测抗体且使其结合捕获的FVIII。再次洗涤各孔且施加TMB(过氧化物酶底物四甲基联苯胺)的溶液并使其反应固定时期。显现蓝色,其在用酸淬灭反应后变为黄色。在微板读取器中在450nm下以分光光度方式测量形成的颜色。在450nm下的吸光度与捕获于孔上的FVIII抗原的量成正比。使用试剂盒中提供的校正血浆或通过替代适当基质中的CFXTEN标准物来校正测定。

[0803] 通过FXa偶联的显色底物测定评估CFXTEN活性

[0804] 使用Chromogenix Coamatic因子VIII(Chromogenix,目录号82258563),如下评估FVIII或包含FVIII的CFXTEN的活性。在钙离子和磷脂存在下,因子X由因子IXa活化成因子

Xa。这个活化由在这个反应中充当辅因子的因子VIII极大刺激。通过使用最优量的Ca^{2+}、磷脂和因子IXa、以及过量因子X,因子X的活化速率与因子VIII的量线性相关。因子Xa水解显色底物S-2765,因此释放发色基团pNA。接着在405nm下以分光光度方式读取颜色。产生的因子Xa以及因此颜色强度与样本中的因子VIII活性成比例。通过连同底物一起添加合成凝血酶抑制剂I-2581来防止由形成的凝血酶水解S-2765。未知样本的活性是通过比较那个样本的最终A405与来自由已知FVIII量构建的标准曲线的那些A405来确定。通过也测定样本中存在的FVIII抗原的量(通过A280或ELISA),确定样本的比活性以了解特定FVIII制剂的相对效能。这使得能够关于活性评估用于CFXTEN融合物的不同分离策略或构建体设计的相对效率且进行分级。

[0805] 用于CFXTEN活性测定的aPTT基测定

[0806] CFXTEN起替换内源性或接触活化的凝血路径中的FVIII的作用。使用活化的部分凝血激素时间测定(aPTT)评估这个凝血路径的活性。具体来说,如下测量FVIII活性:通过用FVIII缺乏的血浆(目录号100800)2倍稀释正常对照血浆(Pacific Hemostasis目录号100595),且接着再次用因子VIII缺乏的血浆进行6、4倍连续稀释来制备标准曲线。这产生具有在500、130、31、7.8、2.0、0.5和0.1IU/ml活性下的各点的标准曲线,其中1个活性单位定义为1ml正常人血浆中的FVIIIC活性的量。也包括FVIII缺乏的血浆来测定空白血浆中的背景活性水平。通过在按体积1:10比率下添加CFXTEN至FVIII缺乏的血浆中来制备样本。使用aPTT测定如下测试样本。在分子装置板读取器分光光度计(molecular devices plate reader spectrophotometer)中在37C下孵育样本2分钟,此时添加相等体积的aPTT试剂(Pacific Hemostasis目录号100402)且再进行3分钟37C孵育。在孵育之后,通过添加1体积的氯化钙(Pacific Hemostasis目录号100304)来活化测定。在450nm下监测混浊度5分钟以产生反应分布图。aPTT时间或达到凝结活性起始的时间定义为OD405nm超过基线增加0.06所处的第一时间。对数线性标准曲线是用与aPTT时间线性相关的活性对数产生。由此,确定板孔中的样本的活性且接着通过乘以11以虑及于FVIII缺乏的血浆中的稀释度来确定样本中的活性。通过也测定样本中存在的FVIII抗原的量(通过A280或ELISA),可确定样本的比活性以了解特定FVIII制剂的相对效能。这使得能够对用于CFXTEN融合物的不同分离策略或构建体设计的相对效率进行分级。

[0807] FVIII/FVIII-XTEN表达的蛋白质的蛋白质印迹分析

[0808] 在8%均质SDS凝胶上操作样本且随后转移至PVDF膜中。泳道1-15中的样本分别是:MW标准物、FVIII(42.5ng)、pBC0100B、pBC0114A、pBC0100、pBC0114、pBC0126、pBC0127(8/5/11;#9)、pBC0128、pBC0135、pBC0136、pBC0137、pBC0145、pBC0149和pBC0146。膜最初用5%奶阻断,接着用对重链的A2结构域具有特异性的抗FVIII单克隆抗体GMA-012探测(Ansong C,Miles SM,Fay PJ.J Thromb Haemost.2006年4月;4(4):842-7)。对于pBC0136(泳道8,图22)和pBC0137(泳道9,图22),观察到XTEN288插入B结构域中,而对于pBC0146(泳道12,图22),观察到XTEN288插入在C末端处。所有测定的FVIII-XTEN蛋白都揭示存在分子量高于pBC0114基础构建体或FVIII标准物的分子量至少21kDa的单链蛋白质。此外,对于pBC0135(泳道7,图22)和pBC0149(泳道11,图22),观察到AE42插入物,其中单链的运动比pBC0114基础蛋白质的运动高约5kDa,且重链的运动比基础蛋白质的90kDa条带高约5kDa。

[0809] 通过ELISA测定表达的FVIII

[0810] 为验证和定量由细胞培养物对构建体的FVIII-XTEN融合蛋白的表达,建立ELISA测定。将用于FVIII-LC ELISA)的捕获抗体SAF8C-AP(Afinity Biologicals)或GMA-8002(GreenMountain Antibodies)或GMA011抗体(Green Mountain Antibodies)、或GMA016抗体固定于ELISA板的孔上。接着使各孔与阻断缓冲液(1x PBS/3%BSA)一起孵育以防止其它蛋白质非特异性结合抗FVIII抗体。接着在各孔中孵育FVIII标准物稀释液(约50ng-0.024ng范围)、质量对照和细胞培养基样本1.5小时以使表达的FVIII蛋白结合涂布的抗体。接着充分洗涤各孔,且使结合的蛋白质与SAF8C-生物素化抗FVIII检测抗体(Afinity Biologicals)一起孵育。接着添加结合缀合于FVIII检测抗体的生物素的抗生蛋白链菌素-HRP至孔中且孵育1小时。最后,添加OPD底物至各孔中且用板读取器在490nm波长下监测由HRP酶对它的水解。接着通过将在各培养物稀释度下的比色反应与标准曲线比较来计算含有FVIII的样本的浓度。下表22中的结果显示各种构建体的FVIII-XTEN在细胞培养基中以0.4-1μg/ml表达。通过ELISA获得的结果和活性数据指示使用所述转染方法,FVIII-XTEN融合蛋白得以极其良好表达。此外,在实验条件下,结果证明FVIII-XTEN蛋白的比活性值类似或大于pBC0114基础构建体(表达BDD FVIII)的比活性值且支持将XTEN插入FVIII的C末端或B结构域中导致FVIII蛋白功能得以维持。

[0811] 用于CFXTEN融合蛋白的显色活性测定

[0812] 如上所述在短暂转染的Freestyle293细胞中表达呈包括XTEN AE288和AG288插入在FVIII BDD序列的C末端处的各种构型的BDD FVIII和CFXTEN融合蛋白构建体pBC0114、pBC0135、pBC0136、pBC0137、pBC0145、pBC0146和pBC0149以及AE42和AE288插入在B结构域的残基745(或残基743)之后和残基1640(或残基1638)之前的FVIII-XTEN融合蛋白(包括P1648加工位点突变成丙氨酸的构建体),且测试促凝血活性。使用Chromogenix Coamatic®因子VIII测定评估细胞培养基中存在的各FVIII-XTEN蛋白的促凝血活性,所述测定是其中因子X的活化与样本中的因子VIII的量线性相关的测定。根据制造商说明书使用在OD405nm下以分光光度方式测量的终点法进行测定。使用纯化FVIII蛋白,在浓度250、200、150、100、75、50、37.5、25、12.5、6.25、3.125和1.56mU/ml下产生标准曲线。用测定缓冲液和PEI培养基制备因子VIII标准物的稀释液、质量对照和样本以虑及培养基在测定性能方面的影响。阳性对照由在20、40和80mU/ml浓度下的纯化因子VIII蛋白和缺乏XTEN插入物的pBC0114FVIII基础构建体的细胞培养基组成。阴性对照由单独测定缓冲液或PEI培养基组成。如上所述获得FVIII-XTEN构建体的细胞培养基,且在1:50、1:150和1:450稀释度下以重复测试且各自的活性是以U/ml加以计算。各FVIII-XTEN构建体展现至少类似的促凝血活性,且在一些情况下大于基础构建体阳性对照的促凝血活性,并支持在实验条件下在FVIII的C末端处连接XTEN(包括AE288或AG288)或在B结构域内插入XTEN(包括AE42或AE288)导致FVIII促凝血活性得以保持或甚至增强。

[0813] 表22:ELISA和显色FVIII活性测定的结果

[0814]

FVIII-XTEN构建体	活性(IU/ml)	浓度(μg/ml)	比活性(IU/mg)	对构建体的描述
pBC0114	3.0	0.6	5000	用于XTEN插入的BDD FVIII基础构建体
pBC0146	7.4	0.6	12759	XTEN AG288插入在FVIII的C末端处的FVIII构建体
pBC0145	3.1	0.6	4844	XTEN AE288插入在FVIII的C末端处的FVIII构建体
pBC0135	4.0	1.0	4124	XTEN AE42插入在残基745与1640之间的FVIII构建体
pBC0149	4.9	0.9	5581	XTEN AE42插入在残基745与1640之间且Arg1648突变成Ala的FVIII构建体
pBC0136	2.7	0.4	7670	XTEN AE288插入在残基745与1640之间的FVIII构建体
pBC0137	1.9	0.3	6013	XTEN AE288插入在残基745

[0815]

				与1640之间且Arg1648突变成Ala的FVIII构建体

[0816] 用于含有CFXTEN融合蛋白的细胞培养物样本活性测定的Coatest测定

[0817] 使用Coatest测定,如下评估FVIII或包含FVIII的CFXTEN的活性。

[0818] 测定基质:相同板中的所有孔都调整成相同百分比的培养基以控制基质影响。稀释测试样本以使OD405读数将落于标准物的线性范围内。FVIII标准物的浓度范围是100mU/mL至0.78mU/mL,通过于1X Coatest缓冲液(DiaPharma)加预定百分比的培养基中4倍连续稀释FVIII标准物制备。

[0819] Coatest SP FVIII(DiaPharma)试剂包装包括10x Coatest缓冲液储备溶液、因子IXa+因子X、磷脂、$CaCl_2$和底物。通过添加9X体积的冷ddH_2O至1X体积的储备物中制备1x Coatest溶液。接着以预定比率添加细胞培养基至制备的1X溶液中以使所有测试孔中的基质的百分比标准化。根据制造商推荐复原因子IXa+因子X、磷脂和底物。

[0820] Coatest测定程序:

[0821] 制备测定试剂且保持在冰上直至需要。一式两份添加25μl稀释的测试样本和标准物至96孔板中。添加50μl磷脂/因子IXa/因子X至各孔中且通过温和轻叩板的侧面来加以混合。在37℃板加热器上在37℃下孵育各板5分钟。添加25μl $CaCl_2$至各孔中且加以混合。在板加热器上在37℃下孵育各板5分钟。接着添加50μl底物至各孔中,混合,且在37℃下再孵育各板另外5-10分钟直至顶部标准物显现OD405读数约1.5。在混合下添加25μl 20%乙酸至各孔中以终止反应且使用SpectraMAX®plus(Molecular Devices)分光光度计在OD405下读取各孔。使用SoftMax程序(5.2版)进行数据分析。LLOQ根据测定加以变化,但通常是0.0039IU/ml。

[0822] 结果:数据呈现于表23-26中。表23呈现XTEN插入基于本文所述的准则(包括实施例34)选择的单一位点中的CFXTEN融合蛋白的结果。pBC00114FVIII阳性对照显示良好表达

和FVIII活性。在106个测定的单XTEN融合蛋白中,68％保留可测量FVIII活性,其中30％在凝血测定中展现3+至4+活性。31％的测定的融合蛋白具有低于定量限度的结果(此可归因于反映在相应表达ELISA结果中的不良表达)。所有四个B结构域插入构建体都展现良好活性,C末端连接的构建体也是这样,从而指示这些是可能有利的插入位点。

[0823] 单一插入位点数据的结果指导具有2个XTEN插入物的XTEN构建体的产生,其结果呈现于表24中。总之,阳性率是67％,其中31％的融合蛋白在凝血测定中展现3+至4+活性。

[0824] 前述数据的结果指导具有3个XTEN插入物的XTEN构建体的产生,其结果呈现于表25中。总之,92％的样本具有可测量FVIII活性,其中足足79％在凝血测定中展现3+至4+活性。

[0825] 产生并测定有限数目的4个XTEN插入A1、A2和A3结构域中的构建体,其中5个构建体中的4个展现FVIII活性(表26),从而表明插入多个XTEN不损害所得融合蛋白保留FVIII活性的能力。

[0826] 结论:在实验条件下,结果支持用于选择XTEN插入位点的准则是有效的,将一个或多个XTEN插入FVIII的所选位点中比不插入一个或多个XTEN更可能导致所得CFXTEN分子的促凝血活性得以保持,且相较于单一或双重XTEN插入构建体,插入三个XTEN似乎产生更大比例的保留高水平的FVIII促凝血活性的融合蛋白。

[0827] 表23:用于包含一个XTEN的CFXTEN的凝血活性测定的结果

[0828]

插入位点	结构域	构建体	活性	表达 ELISA
pBC0114			+++	+++
3	A1	pBC0126	LLOQ*	LLOQ
3	A1	pBC0127	+	+
18	A1	pBC0165	++	++
22	A1	pBC0183	+++	++
26	A1	pBC0184	++	++
40	A1	pBC0166	++	++
60	A1	pBC0185	LLOQ	LLOQ
116	A1	pBC0167	LLOQ	LLOQ
130	A1	pBC0128	LLOQ	LLOQ
188	A1	pBC0168	++	++
216	A1	pBC0129	++	++
230	A1	pBC0169	LLOQ	LLOQ
333	A1	pBC0130	++	++
375	A2	pBC0131	LLOQ	+++
403	A2	pBC0132	++	++
442	A2	pBC0170	++	++
490	A2	pBC0133	+	++
518	A2	pBC0171	LLOQ	+
599	A2	pBC0134	++	++
713	A2	pBC0172	+	+++
745	B	pBC0135	+++	+++
745	B	pBC0149	+++	+++
745	B	pBC0136	++	++
745	B	pBC0137	+++	+++
1720	A3	pBC0138	+++	+++
1796	A3	pBC0139	+	++
1802	A3	pBC0140	+	++
1827	A3	pBC0173	LLOQ	LLOQ
1861	A3	pBC0174	LLOQ	LLOQ
1896	A3	pBC0175	LLOQ	LLOQ
1900	A3	pBC0176	+++	+++
1904	A3	pBC0177	+	+

[0829]

插入位点	结构域	构建体	活性	表达 ELISA
1937	A3	pBC0178	LLOQ	LLOQ
2019	A3	pBC0141	LLOQ	+
2068	C1	pBC0179	++	++
2111	C1	pBC0180	LLOQ	LLOQ
2120	C1	pBC0142	LLOQ	+
2171	C2	pBC0143	++	+++
2188	C2	pBC0181	LLOQ	LLOQ
2227	C2	pBC0182	++	+++
2277	C2	pBC0144	++	++
2332	CT	pBC0145	+++	+++
2332	CT	pBC0146	+++	+++
403	A2	pSD0001	+++	+++
599	A2	pSD0002	+	+
403	A2	pSD0003	+++	+++
599	A2	pSD0004	+	+
745	B	pSD0005	+++	++
745	B	pSD0006	+++	+++
745	B	pSD0007	+++	++
745	B	pSD0008	+++	+++
1720	A3	pSD0009	+	+
1720	A3	pSD0010	++	++
2171	C2	pSD0011	+	++
2171	C2	pSD0012	+	++
2332	CT	pSD0013	+++	++
2332	CT	pSD0014	+++	+++
745	B	pSD0017	+++	+++
745	B	pSD0018	+++	+++
2332	CT	pSD0019	+++	+++
2332	CT	pSD0020	+++	+++
2332	CT	pSD0015	++	++
2332	CT	pSD0016	+++	+++
0	N端	pSD0021	+	+
32	A1	pSD0022	+++	+++
65	A1	pSD0023	LLOQ	LLOQ
81	A1	pSD0024	LLOQ	LLOQ
119	A1	pSD0025	LLOQ	LLOQ
211	A1	pSD0026	+	+
220	A1	pSD0027	+	+
224	A1	pSD0028	+	+
336	A1	pSD0029	++	+++
339	A1	pSD0030	++	+++
378	A2	pSD0031	LLOQ	++
399	A2	pSD0032	++	++
409	A2	pSD0033	++	++
416	A2	pSD0034	+	+
487	A2	pSD0035	LLOQ	+
494	A2	pSD0036	LLOQ	+
500	A2	pSD0037	LLOQ	+
603	A2	pSD0038	+	+
1656	A3	pSD0039	+++	+++
1656	A3	pNL009**	++++	未检测到

[0830]

插入位点	结构域	构建体	活性	表达 ELISA
1711	A3	pSD0040	++	+
1725	A3	pSD0041	LLOQ	++
1749	A3	pSD0042	LLOQ	LLOQ
1905	A3	pSD0043	++	++
1910	A3	pSD0044	+	+
1900	A3	pSD0062	++	++
1900	A3	pSD0063	+++	++
18	A1	pSD0045	+++	+++
18	A1	pSD0046	+++	+++
22	A1	pSD0047	LLOQ	LLOQ
22	A1	pSD0048	LLOQ	LLOQ
26	A1	pSD0049	+++	+++
26	A1	pSD0050	+++	+++
40	A1	pSD0051	+++	+++
40	A1	pSD0052	+++	+++
216	A1	pSD0053	LLOQ	LLOQ
216	A1	pSD0054	LLOQ	LLOQ
375	A2	pSD0055	LLOQ	+
442	A2	pSD0056	LLOQ	LLOQ
442	A2	pSD0057	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0058	LLOQ	LLOQ
1796	A3	pSD0059	+	+
1802	A3	pSD0060	+	+
1802	A3	pSD0061	LLOQ	LLOQ

[0831] *LLOQ:低于定量限度

[0832] **pNL009包括745-1656的缺失

[0833] 表24:用于包含两个XTEN的CFXTEN的凝血活性测定的结果

[0834]

插入1		插入2			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	活性
745	B	2332	CT	LSD0001.002	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.005	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.006	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.011	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.012	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.013	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.016	+++
745	B	2332	CT	LSD0001.021	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.001	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.002	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.014	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.004	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.006	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.009	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.014	+
745	B	2332	CT	LSD0004.010	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.011	LLOQ
745	B	2332	CT	LSD0004.014	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.016	+++

[0835]

插入1		插入2			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	活性
745	B	2332	CT	LSD0004.022	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.016	+++
0745	B	2332	CT	pNL006	+++
0745	B	2332	CT	pNL007	+++
0745	B	2332	CT	pNL008	++
1656	a3	2332	CT	pNL010	+++
26	A1	403	A2	LSD0005.002	++
26	A1	403	A2	LSD0005.004	++
40	A1	403	A2	LSD0005.005	++
40	A1	403	A2	LSD0005.011	++
18	A1	403	A2	LSD0005.018	++
26	A1	599	A2	LSD0006.002	+
40	A1	599	A2	LSD0006.005	++
40	A1	599	A2	LSD0006.007	++
40	A1	599	A2	LSD0006.011	+++
40	A1	403	A2	LSD0007.002	+
40	A1	403	A2	LSD0007.004	+
26	A1	403	A2	LSD0007.013	++
26	A1	599	A2	LSD0008.001	++
40	A1	599	A2	LSD0008.002	++
26	A1	599	A2	LSD0008.006	+
18	A1	599	A2	LSD0008.009	++
40	A1	599	A2	LSD0008.017	+
745	B	2332	CT	LSD0002.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0002.013	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0004.025	+++
745	B	2332	CT	LSD0003.005	++
26	A1	403	A2	LSD0007.008	++
1720	A3	1900	A3	LSD0044.002	LLOQ
1725	A3	1900	A3	LSD0044.005	LLOQ
1720	A3	1900	A3	LSD0044.039	LLOQ
1711	A3	1905	A3	LSD0044.022	LLOQ
1720	A3	1905	A3	LSD0044.003	LLOQ
1725	A3	1905	A3	LSD0044.001	LLOQ
1656	A3	26	A1	LSD0038.001	++
1656	A3	18	A1	LSD0038.003	++
1656	A3	18	A1	LSD0038.008	+++
1656	A3	40	A1	LSD0038.012	++
1656	A3	40	A1	LSD0038.013	++
1656	A3	26	A1	LSD0038.015	++
1656	A3	399	A2	LSD0039.001	+
1656	A3	403	A2	LSD0039.003	++
1656	A3	403	A2	LSD0039.010	++
1656	A3	1725	A3	LSD0045.001	+
1656	A3	1720	A3	LSD0045.002	++
1900	A3	18	A1	LSD0042.014	+
1900	A3	18	A1	LSD0042.023	+
1900	A3	26	A1	LSD0042.006	+
1900	A3	26	A1	LSD0042.013	++
1900	A3	40	A1	LSD0042.001	+
1900	A3	40	A1	LSD0042.039	+

[0836]

插入1		插入2			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	活性
1900	A3	26	A1	LSD0042.047	+
1905	A3	18	A1	LSD0042.003	+
1905	A3	40	A1	LSD0042.004	LLOQ
1905	A3	26	A1	LSD0042.008	LLOQ
1905	A3	26	A1	LSD0042.038	LLOQ
1905	A3	40	A1	LSD0042.082	LLOQ
1910	A3	26	A1	LSD0042.040	LLOQ
18	A1	399	A2	LSD0037.002	++
26	A1	399	A2	LSD0037.009	+
40	A1	399	A2	LSD0037.011	++
18	A1	403	A2	LSD0047.002	++
18	A1	403	A2	LSD0047.005	+
18	A1	403	A2	LSD0048.007	+
1656	A3	1900	A3	LSD0046.001	++
1656	A3	1900	A3	LSD0046.002	+
1656	A3	1905	A3	LSD0046.003	+
1711	A3	40	A1	LSD0040.011	LLOQ
1711	A3	26	A1	LSD0040.042	LLOQ
1720	A3	26	A1	LSD0040.002	+
1720	A3	40	A1	LSD0040.008	+
1720	A3	18	A1	LSD0040.021	+
1720	A3	26	A1	LSD0040.037	LLOQ
1720	A3	18	A1	LSD0040.046	+
1725	A3	26	A1	LSD0040.003	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040.006	LLOQ
1725	A3	26	A1	LSD0040.007	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040.010	LLOQ
1725	A3	40	A1	LSD0040.039	LLOQ
1725	A3	18	A1	LSD0040.052	+
1720	A3	403	A2	LSD0041.001	+
1720	A3	399	A2	LSD0041.004	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041.006	LLOQ
1720	A3	403	A2	LSD0041.008	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041.010	LLOQ
1725	A3	403	A2	LSD0041.014	LLOQ
1725	A3	399	A2	LSD0041.016	LLOQ
1711	A3	403	A2	LSD0041.035	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043.001	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.002	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043.005	LLOQ
1900	A3	399	A2	LSD0043.006	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.007	LLOQ
1900	A3	403	A2	LSD0043.008	LLOQ
1905	A3	399	A2	LSD0043.015	LLOQ
1905	A3	403	A2	LSD0043.029	LLOQ
1910	A3	403	A2	LSD0043.043	LLOQ

[0837] 表25:用于包含三个XTEN的CFXTEN的凝血活性测定的结果

[0838]

插入1		插入2		插入3			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	活性
26	A1	403	A2	1656	A3	pSD0077	+++
26	A1	403	A2	1720	A3	pSD0078	++
26	A1	403	A2	1900	A3	pSD0079	++
26	A1	1656	A3	1720	A3	pSD0080	+++
26	A1	1656	A3	1900	A3	pSD0081	LLOQ
26	A1	1720	A3	1900	A3	pSD0082	+
403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0083	+++
403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0084	+++
403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0085	+
1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0086	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.002	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.008	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.011	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.020	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0049.021	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.002	+++
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.003	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.007	LLOQ
18	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.010	+++
26	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.012	+++
40	A1	745	B	2332	CT	LSD0050.014	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0051.002	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0051.003	+++
403	A2	745	B	2332	CT	LSD0052.001	+++
399	A2	745	B	2332	CT	LSD0052.003	+++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.021	LLOQ
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.022	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0053.024	+++
1720	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.021	+++
1711	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.025	++
1725	A3	745	B	2332	CT	LSD0054.026	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.021	+++
1905	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.022	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0055.026	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.021	+++
1900	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.024	+++
1910	A3	745	B	2332	CT	LSD0056.025	+++
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0294*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0295*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0296*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0297*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0298*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0299*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0300*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0301*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0302*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0303*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0304*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0305*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0306*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0307*	

[0839]

插入1		插入2		插入3			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	活性
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0308*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0309*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0310*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0311*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0312*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0313*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0314*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0315*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0316*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0317*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0318*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0319*	
0745	B	1900	A3	2332	CT	pBC0320*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0269*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0270*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0271*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0272*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0273*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0274*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0275*	
0018	A1	0745	B	2332	CT	pBC0276*	
0403	A2	0745	B	2332	CT	pBC0277*	
1720	A3	0745	B	2332	CT	pBC0278*	
1900	A3	0745	B	2332	CT	pBC0279*	

[0840] *具有R1648A突变的构建体

[0841] 表26:用于包含四个XTEN的CFXTEN的凝血活性测定的结果

[0842]

XTEN 插入1	XTEN 插入2	XTEN 插入3	XTEN 插入4	XTEN 插入5	XTEN 插入6	构建体ID	活性
26	403	1656	1720	-	-	pSD0087	+++
26	403	1656	1900	-	-	pSD0088	+++
26	403	1720	1900	-	-	pSD0089	LLOQ
26	1656	1720	1900	-	-	pSD0090	++
403	1656	1720	1900	-	-	pSD0091	++
0040	0403	745	2332	-	-	LSD0058.006*	++
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0059.002*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0059.006*	+
0040	0409	745	2332	-	-	LSD0060.001*	+
0018	0409	745	2332	-	-	LSD0060.003*	+
0040	1720	745	2332	-	-	LSD0061.002*	+
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0061.007*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061.008*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0061.012*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062.001*	++
0026	1720	745	2332	-	-	LSD0062.002*	++
0018	1720	745	2332	-	-	LSD0062.006*	++
0018	1900	745	2332	-	-	LSD0063.001*	++

[0843]

0018	1900	745	2332	-	-	LSD0064.017*	++
0026	1900	745	2332	-	-	LSD0064.020*	++
0040	1900	745	2332	-	-	LSD0064.021*	++
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0065.001*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0065.014*	+
0040	1905	745	2332	-	-	LSD0066.001*	+
0026	1905	745	2332	-	-	LSD0066.002*	+
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066.009*	++
0018	1905	745	2332	-	-	LSD0066.011*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067.004*	++
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0067.005*	+
0040	1910	745	2332	-	-	LSD0067.006*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0067.008*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068.001*	+
0026	1910	745	2332	-	-	LSD0068.002*	+
0040	1910	745	2332	-	-	LSD0068.005*	+
0018	1910	745	2332	-	-	LSD0068.010*	++
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0069.004*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0069.008*	+
0409	1720	745	2332	-	-	LSD0070.003*	+
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070.004*	++
0403	1720	745	2332	-	-	LSD0070.005*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071.001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0071.002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0071.008*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072.001*	++
0403	1900	745	2332	-	-	LSD0072.002*	+
0409	1900	745	2332	-	-	LSD0072.003*	+
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0073.002*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073.004*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0073.006*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074.007*	++
0409	1905	745	2332	-	-	LSD0074.010*	+
0403	1905	745	2332	-	-	LSD0074.011*	+
0409	1910	745	2332	-	-	LSD0075.004*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0075.007*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076.002*	+
0403	1910	745	2332	-	-	LSD0076.003*	+
0403	1910	745	2332	-	-	pSD0093*	+
1720	1900	745	2332	-	-	pSD0094*	++
1720	1905	745	2332	-	-	pSD0095*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0097*	+
1720	1910	745	2332	-	-	pSD0098*	+
0403	1656	1720	2332	-	-	pNL0022	+

[0844]

0403	1656	1900	2332	-	-	pNL0023	+
0403	1720	1900	2332	-	-	pNL0024	LLOQ
1656	1720	1900	2332	-	-	pNL0025	+
0018	0403	1656	2332	-	-	pBC0247	++
0018	0403	1720	2332	-	-	pBC0248	+
0018	0403	1900	2332	-	-	pBC0249	+
0018	1656	1720	2332	-	-	pBC0250	+
0018	1656	1900	2332	-	-	pBC0251	++
0018	1720	1900	2332	-	-	pBC0252	LLOQ
0018	0403	0745	2332	-	-	LSD57.005	++
0018	0745	1720	2332	-	-	LSD62.001	++
0018	0745	1900	2332	-	-	pBC0262	++
0403	0745	1720	2332	-	-	LSD70.004	+
0403	0745	1900	2332	-	-	pBC0266	+
0745	1720	1900	2332	-	-	pBC0268	+
0188	1900	0745	2332	-	-	pCS0001*	未检测到
0599	1900	0745	2332	-	-	pCS0002*	未检测到
2068	1900	0745	2332	-	-	pCS0003*	未检测到
2171	1900	0745	2332	-	-	pCS0004*	未检测到
2227	1900	0745	2332	-	-	pCS0005*	未检测到
2277	1900	0745	2332	-	-	pCS0006*	未检测到
0403	1656	1720	1900	2332	-	pNL0030	LLOQ
0018	0403	1656	1720	2332	-	pBC0253	+
0018	0403	1656	1900	2332	-	pBC0254	+
0018	0403	1720	1900	2332	-	pBC0255	LLOQ
0018	1656	1720	1900	2332	-	pBC0256	+
0018	0403	0745	1720	2332	-	pBC0259*	+
0018	0403	0745	1900	2332	-	pBC0260*	+
0018	0745	1720	1900	2332	-	pBC0263	+
0403	0745	1720	1900	2332	-	pBC0267	LLOQ
0018	0403	1656	1720	1900	2332	pBC0257	LLOQ
0018	0403	0745	1720	1900	2332	pBC0264	LLOQ

[0845] *具有R1648A突变的构建体

[0846] 实施例26:XTEN半径和相关参数的测定

[0847] 为定量CFXTEN融合蛋白的XTEN组分的流体动力学半径以及多个XTEN相对于单一XTEN的变化值如何,基于由对包含一个或多个XTEN的各种融合蛋白的尺寸排阻色谱测定凭经验获得的数据产生一系列结构式。据信相较于具有较少XTEN,但具有近似相同总XTEN氨基酸数的CFXTEN,将多个XTEN并入CFXTEN中会提供XTEN组分的较高总流体动力学半径。根据由等式II给出的公式计算单一XTEN多肽的最大半径(在下文中称为"XTEN半径"):

[0848] XTEN半径=(√XTEN长度0.2037)+3.4627II

[0849] 根据由等式III给出的公式计算CFXTEN中所有XTEN区段的最大XTEN半径的总和:

[0850] $$\text{XTEN半径总和} = \sum_{i=1}^{n} XTEN\text{半径}_i \qquad \text{III}$$

[0851] 其中:n=XTEN区段的数目

[0852] 且i是迭代子

[0853] 根据由等式IV给出的公式计算包含多个XTEN的CFXTEN的XTEN半径总和与相等长度(总氨基酸残基数与CFXTEN的总氨基酸残基数相等)的单一XTEN的XTEN半径的比率:

[0854] $$\text{XTEN半径比率} = \frac{\sum_{i=1}^{n} XTEN\text{半径}_i}{\left(\sqrt{\sum_{i=1}^{n} XTEN\text{长度}_i} * 0.2037\right) + 3.4627} \qquad \text{IV}$$

[0855] 其中:n=XTEN区段的数目

[0856] 且i是迭代子

[0857] 结果:等式II应用于长度144、288、576和864的XTEN。结果呈现于表27中。等式IV应用于本文所述的具有两个、三个或四个XTEN的各种CFXTEN融合蛋白。对于所有含有单一XTEN的CFXTEN,XTEN半径比率具有值1。XTEN半径比率呈现于表28中。含有5个XTEN插入物的pSD0092的XTEN半径比率具有值3.31。总之,结果指示包括多个XTEN使XTEN半径比率增加至大于2的值,其中四个插入物导致值高于三个插入物。

[0858] 表27:包含XTEN的CFXTEN的半径计算结果

[0859]

XEN长度	XTEN半径
42	4.8
144	5.9
288	6.9
576	8.4
864	9.5

[0860] 表28:包含XTEN的CFXTEN的半径计算结果

[0861]

插入1		插入2		插入3		插入4			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	XTEN半径比率
40	A1							pBC0166	1.00
745	B	2332	CT					LSD0001.002	1.67
745	B	2332	CT					LSD0001.005	1.71

[0862]

插入1		插入2		插入3		插入4			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	XTEN半径比率
745	B	2332	CT					LSD0001.006	1.71
745	B	2332	CT					LSD0001.011	1.71
745	B	2332	CT					LSD0001.012	1.71
745	B	2332	CT					LSD0001.013	1.67
745	B	2332	CT					LSD0001.016	1.67
745	B	2332	CT					LSD0001.021	1.67
745	B	2332	CT					LSD0002.001	1.67
745	B	2332	CT					LSD0002.002	1.67
745	B	2332	CT					LSD0002.004	1.71
745	B	2332	CT					LSD0002.008	1.67
745	B	2332	CT					LSD0002.014	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.001	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.004	1.66
745	B	2332	CT					LSD0003.006	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.009	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.014	1.66
745	B	2332	CT					LSD0003.018	1.67
745	B	2332	CT					LSD0004.010	1.66
745	B	2332	CT					LSD0004.011	1.67
745	B	2332	CT					LSD0004.014	1.66
745	B	2332	CT					LSD0004.016	1.66
745	B	2332	CT					LSD0004.022	1.66
745	B	2332	CT					LSD0003.016	1.67
26	A1	403	A2					LSD0005.002	1.71
26	A1	403	A2					LSD0005.004	1.71
40	A1	403	A2					LSD0005.005	1.71
40	A1	403	A2					LSD0005.011	1.71
18	A1	403	A2					LSD0005.018	1.71
26	A1	599	A2					LSD0006.002	1.71
40	A1	599	A2					LSD0006.005	1.71
40	A1	599	A2					LSD0006.007	1.71
40	A1	599	A2					LSD0006.011	1.71
40	A1	403	A2					LSD0007.002	1.71
40	A1	403	A2					LSD0007.004	1.71
26	A1	403	A2					LSD0007.013	1.71
26	A1	599	A2					LSD0008.001	1.71
40	A1	599	A2					LSD0008.002	1.71
26	A1	599	A2					LSD0008.006	1.71
18	A1	599	A2					LSD0008.009	1.71
40	A1	599	A2					LSD0008.017	1.71
745	B	2332	CT					LSD0002.025	1.71
745	B	2332	CT					LSD0002.013	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.025	1.67
745	B	2332	CT					LSD0004.025	1.67
745	B	2332	CT					LSD0003.005	1.66
26	A1	403	A2					LSD0007.008	1.71
1720	A3	1900	A3					LSD0044.002	1.71
1725	A3	1900	A3					LSD0044.005	1.71
1720	A3	1900	A3					LSD0044.039	1.71
1711	A3	1905	A3					LSD0044.022	1.71
1720	A3	1905	A3					LSD0044.003	1.71

[0863]

插入1		插入2		插入3		插入4			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	XTEN半径比率
1725	A3	1905	A3					LSD0044.001	1.71
1656	A3	26	A1					LSD0038.001	1.71
1656	A3	18	A1					LSD0038.003	1.71
1656	A3	18	A1					LSD0038.008	1.71
1656	A3	40	A1					LSD0038.012	1.71
1656	A3	40	A1					LSD0038.013	1.71
1656	A3	26	A1					LSD0038.015	1.71
1656	A3	399	A2					LSD0039.001	1.71
1656	A3	403	A2					LSD0039.003	1.71
1656	A3	403	A2					LSD0039.010	1.71
1656	A3	1725	A3					LSD0045.001	1.71
1656	A3	1720	A3					LSD0045.002	1.71
1900	A3	18	A1					LSD0042.014	1.71
1900	A3	18	A1					LSD0042.023	1.71
1900	A3	26	A1					LSD0042.006	1.71
1900	A3	26	A1					LSD0042.013	1.71
1900	A3	40	A1					LSD0042.001	1.71
1900	A3	40	A1					LSD0042.039	1.71
1900	A3	26	A1					LSD0042.047	1.71
1905	A3	18	A1					LSD0042.003	1.71
1905	A3	40	A1					LSD0042.004	1.71
1905	A3	26	A1					LSD0042.008	1.71
1905	A3	26	A1					LSD0042.038	1.71
1905	A3	40	A1					LSD0042.082	1.71
1910	A3	26	A1					LSD0042.040	1.71
18	A1	399	A2					LSD0037.002	1.71
26	A1	399	A2					LSD0037.009	1.71
40	A1	399	A2					LSD0037.011	1.71
18	A1	403	A2					LSD0047.002	1.71
18	A1	403	A2					LSD0047.005	1.71
18	A1	403	A2					LSD0048.007	1.71
1656	A3	1900	A3					LSD0046.001	1.71
1656	A3	1900	A3					LSD0046.002	1.71
1656	A3	1905	A3					LSD0046.003	1.71
1711	A3	40	A1					LSD0040.011	1.71
1711	A3	26	A1					LSD0040.042	1.71
1720	A3	26	A1					LSD0040.002	1.71
1720	A3	40	A1					LSD0040.008	1.71
1720	A3	18	A1					LSD0040.021	1.71
1720	A3	26	A1					LSD0040.037	1.71
1720	A3	18	A1					LSD0040.046	1.71
1725	A3	26	A1					LSD0040.003	1.71
1725	A3	40	A1					LSD0040.006	1.71
1725	A3	26	A1					LSD0040.007	1.71
1725	A3	18	A1					LSD0040.010	1.71
1725	A3	40	A1					LSD0040.039	1.71
1725	A3	18	A1					LSD0040.052	1.71
1720	A3	403	A2					LSD0041.001	1.71
1720	A3	399	A2					LSD0041.004	1.71
1711	A3	403	A2					LSD0041.006	1.71
1720	A3	403	A2					LSD0041.008	1.71

[0864]

插入1		插入2		插入3		插入4			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	XTEN半径比率
1725	A3	403	A2					LSD0041.010	1.71
1725	A3	403	A2					LSD0041.014	1.71
1725	A3	399	A2					LSD0041.016	1.71
1711	A3	403	A2					LSD0041.035	1.71
1900	A3	399	A2					LSD0043.001	1.71
1900	A3	403	A2					LSD0043.002	1.71
1905	A3	403	A2					LSD0043.005	1.71
1900	A3	399	A2					LSD0043.006	1.71
1900	A3	403	A2					LSD0043.007	1.71
1900	A3	403	A2					LSD0043.008	1.71
1905	A3	399	A2					LSD0043.015	1.71
1905	A3	403	A2					LSD0043.029	1.71
1910	A3	403	A2					LSD0043.043	1.71
26	A1	403	A2	1656	A3			pSD0077	2.30
26	A1	403	A2	1720	A3			pSD0078	2.30
26	A1	403	A2	1900	A3			pSD0079	2.30
26	A1	1656	A3	1720	A3			pSD0080	2.30
26	A1	1656	A3	1900	A3			pSD0081	2.30
26	A1	1720	A3	1900	A3			pSD0082	2.30
403	A2	1656	A3	1720	A3			pSD0083	2.30
403	A2	1656	A3	1900	A3			pSD0084	2.30
403	A2	1720	A3	1900	A3			pSD0085	2.30
1656	A3	1720	A3	1900	A3			pSD0086	2.30
26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0087	2.83
26	A1	403	A2	1656	A3	1900	A3	pSD0088	2.83
26	A1	403	A2	1720	A3	1900	A3	pSD0089	2.83
26	A1	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0090	2.83
403	A2	1656	A3	1720	A3	1900	A3	pSD0091	2.83
26	A1	403	A2	1656	A3	1720	A3	pSD0092	2.83
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.002	2.24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.008	2.24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.011	2.24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.012	2.24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.020	2.24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0049.021	2.24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.002	2.24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.003	2.24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.007	2.24
18	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.010	2.24
26	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.012	2.24
40	A1	745	B	2332	CT			LSD0050.014	2.24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0051.002	2.24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0051.003	2.24
403	A2	745	B	2332	CT			LSD0052.001	2.24
399	A2	745	B	2332	CT			LSD0052.003	2.24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.021	2.24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.022	2.24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0053.024	2.24
1720	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.021	2.24
1711	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.025	2.24
1725	A3	745	B	2332	CT			LSD0054.026	2.24

[0865]

插入1		插入2		插入3		插入4			
插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	插入位点	结构域	构建体	XTEN半径比率
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.021	2.24
1905	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.022	2.24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0055.026	2.24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.021	2.24
1900	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.024	2.24
1910	A3	745	B	2332	CT			LSD0056.025	2.24

[0866] 实施例27:FVIII-XTEN与抗FVIII抗体的结合干扰

[0867] 通过夹心式ELISA测定来测定插入CFXTEN融合蛋白的不同位置中的XTEN影响抗FVIII抗体的结合的能力。分别结合A2和C2结构域的两种抗FVIII抗体;即GMA-8021(Green Mountain Antibodies,Burlington,VT)和ESH8(American Diagnostica Inc.,Stamford,CT)用作捕获抗体。不含有XTEN的FVIII-His-Myc蛋白用作所有ELISA的校正标准物和阳性对照。产生单一XTEN插入A1、A2或A3结构域中的另外含有His和Myc亲和标签的10个CFXTEN融合蛋白。基于抗His捕获-抗Myc检测ELISA使各测试样本的蛋白质浓度标准化为100%,所述ELISA是与抗FVIII抗体捕获-抗Myc检测ELISA同时在同一板上操作。

[0868] 简而言之,96孔板上的适当孔用GMA-8021、ESH8或抗His抗体在4℃下涂布过夜,接着洗涤并用BSA阻断。将相等体积的相应对照或融合蛋白引入双重孔中且使其与涂布的GMA-8021、ESH8或抗His抗体在室温下相互作用2小时。在孵育之后,洗除未结合的物质且添加兔抗Myc检测抗体并在室温下再孵育1小时。接着将板洗涤且引入过氧化物酶缀合的驴抗兔二抗并在室温下孵育1小时。再次将板洗涤,随后添加TMB底物且使反应进行5-20分钟。引入H2SO4以终止反应且通过分光光度计在450nm下读取吸光度。

[0869] 结果:结果呈现于表29中。总之,结果证明当抗FVIII捕获抗体是GMA-8021(与A2结构域具有结合亲和力)时,相较于XTEN插入A1或A3结构域中的CFXTEN,针对XTEN插入A2结构域中的CFXTEN融合蛋白的两种抗体展现与FVIII的结合降低。相反,当抗FVIII捕获抗体是与C2结构域具有结合亲和力的ESH8时,由任何CFXTEN进行的结合不存在可辨别抑制或增强样式。

[0870] 表29:FVIII-XTEN与抗FVIII抗体的结合干扰

[0871]

测试的样本	XTEN插入(结构域、位点、XTEN)	aFVIII/Myc的浓度÷aHis/Myc的浓度		
		His/Myc	GMA-8021/Myc (A2结构域)	ESH8/Myc (C2结构域)
FVIII-His-Myc	无	100%	92%	104%
FVIII-XTEN-His-Myc	A2、403	100%	103%±1%	141%±24%

[0872]

	、AE144			
	A2、403、AG144	100%	104%±6%	129%±12%
	A2、399、AE144	100%	100%±8%	140%±18%
	A3、1656、AG144	100%	153%	158%
	A1、18、AE144	100%	129%	130%
	A1、18、AG144	100%	150%	131%
	A1、26、AE144	100%	155%	87%
	A1、26、AG144	100%	157%	147%
	A1、40、AE144	100%	137%	147%
	A1、40、AG144	100%	164%±0%	153%±18%

[0873] aFVIII/Myc＝GMA-8021/Myc或ESH8/Myc抗体条件;aHis/Myc＝抗His/Myc抗体条件

[0874] 实施例28:CFXTEN融合蛋白在FVIII抑制剂存在下的活性测定

[0875] 抑制剂测试滴定程序:

[0876] 抑制FVIII促凝血活性的所选抗体是自商业来源购买。抗体靶向FVIII的所选结构域(例如A2、A3、C1、C2)且抑制FVIII依赖性促凝血活性。为确定待在测定中利用的FVIII抑制剂的最优浓度,使用不同量的在37℃下与表达具有His/Myc双重标签的野生型FVIII的基础载体一起孵育2小时的各抑制性抗体,以及使用具有抗体和至少一种CFXTEN融合蛋白的第二样本来进行初始滴定实验。样本接着在凝血测定中用于测定FVIII活性。通过本文所述的Coatest测定程序测量活性。个别地确定各抗体导致对FVIII活性的最优抑制的浓度。

[0877] 抑制剂测试程序:

[0878] 接着在FVIII抑制剂抗体的最优浓度下使用它们来测定测试样本。个别地使CFXTEN和阳性对照样本与各抗体一起在37℃下孵育2小时且接着收集样本并连同CFXTEN的未处理等分试样和阳性对照一起用于Coatest活性测定中。在一些情况下,测试具有R1648A突变的CFXTEN构建体以确定这种突变对如通过FVIII活性的保持所量度的抑制剂抗性的影响(如果有的话)。

[0879] 结果:

[0880] 滴定实验的结果显示于图26中。数据指示相较于FVIII阳性对照,为在50%程度上抑制CFXTEN LSD0049.002的促凝血活性所需的抗体量右移约0.7数量级,从而指示相较于FVIII,具有三个XTEN插入物(在对应于BDD-FVIII的氨基酸残基18、745和2332的插入点处)的CFXTEN与抗体的结合性较低,反映在凝血活性的保持方面。

[0881] FVIII抑制剂抗体GMA8008和GMA8021的Coatest测定的结果分别呈现于表30和31中。测试的所有未处理CFXTEN融合蛋白构建体都展现促凝血活性,pBC00114FVIII阳性对照也是这样。相对于未处理样本,阳性对照样本与FVIII抑制剂抗体一起预孵育导致测量的凝血活性急剧降低至0.05-0.15(5-15%),用针对C2结构域的GMA8008抗体处理的大多数CFXTEN构建体也是这样。然而,相较于FVIII对照,三个CFXTEN融合蛋白保留相对剩余活性的至少两倍;LSD0049.020、LSD0053.024和LSD0056.025,各自具有三个XTEN插入物。

[0882] CFXTEN样本显示相较于未处理样本,用针对A2结构域的GMA8021抗体的抑制程度较低,所述抑制程度由额外数目的XTEN插入物进一步降低(表列数据显示于表30中)。图29显示保留活性的与对照的比率中值的图,其显示在插入的XTEN的数目与相对于对FVIII对照的抑制,GMA8021抗体的抑制降低之间存在线性关系。类似地,与对照值的比率的平均值±S.E.是2.26±0.12(对于1个XTEN)、3.48+0.26(对于2个XTEN)和5.70±0.29(对于3个XTEN插入物)。相较于FVIII对照,用GMA8021抗体处理的具有至少三个XTEN插入物的CFTXEN的FVIII活性保持大至少4.5至9.2倍。此外,在具有三个XTEN插入物的那些CFXTEN中,相较于更紧密群集的插入物(例如在B结构域的C末端侧上),任何两个插入物之间的分隔程度(以氨基酸残基的数目计)较高的构建体似乎产生较高程度的促凝血活性,且因此,由FVIII抑制剂抗体的结合较小。具有R1648A突变的构建体的测定结果似乎与无所述突变的那些构建体类似。

[0883] 结论:结果支持在实验条件下,将XTEN插入FVIII中产生针对由FVIII抑制剂的结合的保护作用,其中促凝血活性得以保持,且包括多个XTEN插入物使对特别是A2结构域抑制剂抗体的抗性增加。最后,通过在XTEN插入物之间具有空间分隔,似乎存在影响。

[0884] 表30:用针对C2结构域的抗体GMA8008处理的CFXTEN的凝血测定的结果

构建体名称	相对剩余活性	与对照的比率	XTEN插入1	XTEN插入2	XTEN插入3	突变
pBC0114 CT	0.05-0.15	1				
pBC0149	0.1	0.8	0745_AE42_1			
pSD0045	0.3	1.1	0018_AE144_5A			
pSD0046	0.3	1.0	0018_AG144_F			
pSD0050	0.2	0.9	0026_AG144_F			
pSD0051	0.3	1.3	0040_AE144_5A			
pSD0052	0.2	1.0	0040_AG144_F			
pSD0001	0.2	0.9	0403_AE144_2A			
pBC0136	0.2	1.2	0745_AE288_1			
pBC0137	0.2	1.1	0745_AE288_1			R1648A

[0885]

构建体名称	相对剩余活性	与对照的比率	XTEN插入1	XTEN插入2	XTEN插入3	突变
pSD0013	0.1	0.9	2332_AE144_6B			
pSD0014	0.1	0.8	2332_AG144_1			
pBC0145	0.1	0.6	2332_AE288_1			
pSD0019	0.1	0.5	2332_AE288_1			
pBC0146	0.1	0.7	2332_AG288_1			
pSD0015	0.1	0.8	2332_AE864			
LSD0038.008	0.1	0.9	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038.013	0.1	0.6	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003.09	0.1	0.9	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003.06	0.0	0.8	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046.001	0.0	0.6	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0.1	1.0	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0.1	1.0	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0.1	0.8	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0.1	0.9	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1900_AE144_4A	
LSD0050.010	0.1	0.7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049.021	0.0	0.6	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.002	0.1	0.9	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.008	0.1	0.9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.011	0.1	0.9	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.020	0.2	2.6	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050.002	0.0	0.2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053.024	0.2	2.5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054.021	0.2	1.5	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055.021	0.2	1.6	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056.021	0.2	1.6	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056.025	0.3	2.0	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

[0886] 相对于相应未处理样本的剩余活性的比例

[0887] 相较于FVIIIpBC0114阳性对照的相对剩余活性(相对于它自身对照)的比率

[0888] 表31:用针对A2结构域的抗体GMA8021处理的CFXTEN的凝血测定的结果

[0889]

构建体名称	相对剩余活性	与对照的比率	XTEN插入1	XTEN插入2	XTEN插入3	突变
pBC0114	0.05-0.15	1				
pBC0149	0.2	1.3	0745_AE42_1			
pSD0045	0.3	2.7	0018_AE144_5A			
pSD0046	0.2	2.1	0018_AG144_F			
pSD0050	0.2	2.4	0026_AG144_F			
pSD0051	0.3	3.1	0040_AE144_5A			
pSD0052	0.3	2.7	0040_AG144_F			
pSD0001	0.2	1.6	0403_AE144_2A			
pBC0136	0.3	2.4	0745_AE288_1			
pBC0137	0.3	2.4	0745_AE288_1			R1648A
pSD0013	0.2	1.8	2332_AE144_6B			
pSD0014	0.2	2.1	2332_AG144_1			
pBC0145	0.3	2.1	2332_AE288_1			
pSD0019	0.3	2.3	2332_AE288_1			
pBC0146	0.3	2.1	2332_AG288_1			
pSD0015	0.3	2.8	2332_AE864			
LSD0038.008	0.4	3.0	0018_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD0038.013	0.4	3.0	0040_AG144_F	1656_AG144_C		
LSD003.09	0.3	3.6	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		
LSD003.06	0.3	3.4	0745_AE144_3B	2332_AE288_1		R1648A
LSD0046.001	0.2	4.4	1656_AG144_C	1900_AG144_C		
PSD077	0.4	5.8	0026_AG144_F	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	
PSD080	0.4	5.7	0026_AG144_F	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD083	0.3	5.0	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1720_AG144_C	
PSD084	0.3	4.5	0403_AE144_2A	1656_AG144_C	1900_AE144_4A	
LSD0050.010	0.4	6.7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0049.021	0.4	6.7	0018_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.002	0.5	9.2	0018_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.008	0.4	5.9	0026_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.011	0.4	5.6	0026_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0049.020	0.3	5.0	0040_AE144_5A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0050.002	0.3	6.2	0040_AG144_F	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0053.024	0.3	4.5	1711_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0054.021	0.5	5.2	1720_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0055.021	0.5	5.4	1900_AE144_4A	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	R1648A
LSD0056.021	0.5	5.1	1900_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	
LSD0056.025	0.5	4.8	1910_AG144_C	0745_AE144_3B	2332_AE288_1	

[0890] 相对于相应未处理样本的剩余活性的比例

[0891] 相较于FVIIIpBC0114阳性对照的相对剩余活性(相对于它自身对照)的比率

[0892] 实施例29:CFXTEN融合蛋白pBC0145和pBC0146的蛋白质纯化

[0893] 两个具有C末端XTEN的CFXTEN构建体用于建立纯化方法。对于具有AE家族的含288个氨基酸的C末端XTEN的pBC0145(参见表21中的序列)与具有AG家族的含288个氨基酸的C末端XTEN的pBC0146(参见表21中的序列)两者,切向流过滤(TFF)步骤用于缓冲液交换来自细胞培养物的澄清条件培养基。接着使用强阴离子交换色谱树脂捕获产物,并接着使用VIIISelect亲和色谱(GE Healthcare)进一步纯化。另一尺寸排阻色谱(GEHealthcare)作

为第三精制步骤应用于FVIII-pBC0146以移除高分子量物质。根据HPLC-SEC,两种融合蛋白的纯度被视为可接受,且通过对两个CFXTEN构建体的显示CFXTEN产物处于预期大小下的SDS-PAGE分析加以进一步确认。两个分子的比活性与B结构域缺失的FVIII类似,如通过aPTT凝血测定和FVIII浓度的ELISA测定所测量。

[0894] 实施例30:CFXTEN融合蛋白pBC0145和pBC0146在HemA和FVIII/VWF DKO小鼠中的药代动力学

[0895] 8-12周龄的雄性FVIII敲除(HemA)小鼠或FVIII/VWF双重敲除(DKO)小鼠用单次静脉内施用重组BDD-FVIII、CFXTEN pBC0145或pBC0146融合纯化蛋白(来自实施例23)在200IU/kg剂量下治疗(n=4/时间点)。在所选时间点,通过腔静脉取样收集血液样本。在HemA小鼠中,在给药后5分钟、1、4、8、16、20、24、32和48小时(针对rBDD-FVIII),以及在给药后5分钟、8、16、24、32、48、55和72小时(针对pBC0145和pBC0146融合蛋白)收集血液样本。在FVIII/VWF DKO小鼠中,在给药后5分钟、30分钟和1小时(针对rBDD-FVIII),以及在给药后5分钟、4、8、16和24小时(针对pBC0145和pBC0146融合蛋白)收集血液样本。通过FVIII显色测定测量血浆FVIII活性且通过WinNonlin程序分析PK分布。

[0896] 结果:如表32和图24中所示,相较于rBDD FVIII,具有AE C末端XTEN插入物的CFXTEN(pBC0145)在HemA小鼠和FVIII/VWF DKO小鼠中分别展现FVIII半衰期(T1/2)延长1.6倍和14.1倍。相较于rBDD-FVIII,具有AG C末端XTEN插入物的CFXTEN(pBC0146)在HemA小鼠和FVIII/VWF DKO小鼠中的半衰期分别延长1.4倍和14.4倍。相较于HemA小鼠,由XTEN插入物赋予的FVIII半衰期延长幅度在FVIII/VWF DKO小鼠中显著得多,由相较于rBDD-FVIII,FVIII-AE-XTEN与FVIII-AG-XTEN两者的FVIII半衰期均长14倍所证明。此外,相较于rBDD-FVIII,在DKO小鼠中,具有C末端AE或AG-XTEN插入物的FVIII也具有在5分钟间隔下显著改进的FVIII回收率、降低的清除率和分布体积、以及增加的AUC。在实验条件下,具有C末端XTEN插入物的CFXTEN显示关于FVIII半衰期延长的巨大潜力,且当与其它FVIII结构域内插入物组合时可潜在进一步延长FVIII半衰期。

[0897] 表32:CFXTEN在HemA和FVIII/VWF DKO小鼠中的药代动力学参数

[0898]

小鼠品系	治疗剂	5分钟回收率(%)	$T_{1/2}$(小时)	MRT(小时)	Cl(mL/h/kg)	Vss(mL/kg)	AUC_D(hkgmIU/mL/mIU)	$T_{1/2}$倍数增加	小鼠品系
HemA	pBC0145	73	11.88	16.47	3.81	62.74	0.26	1.6	HemA
	pBC0146	64	10.54	13.31	5.66	75.34	0.18	1.4	
	rBDD-FVIII	89	7.58	11.02	4.33	47.68	0.23		
FVIII/VWF DKO	pBC0145	74	3.38	3.76	13.06	63.68	0.0765	13.9	FVIII/VWF DKO
	pBC0146	61	3.45	3.61	17.40	86.63	0.0575	14.2	
	rBDD-FVIII	23	0.24	0.24	460.62	161.51	0.0022		

[0899] 相较于rBDD-FVIII

[0900] 实施例31:CFXTEN融合蛋白pSD0050和pSD0062的细胞培养物和细胞培养基的浓缩

[0901] 使用聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences Inc.Warrington,PA)将CFXTEN构建体变体:144个氨基酸的结构域内AG XTEN插入在BDD FVIII的氨基酸残基26之后的pSD0050、144个氨基酸的结构域内AE XTEN插入在BDD FVIII的残基1900(注意:氨基酸编号是基于全长FVIII)之后的pSD0062、以及编码rBDD-FVIII的构建体转染至HEK293F细胞(Invitrogen,Carlsbad,CA)中。使短暂转染的细胞在293Free Style培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)中生长4天且接着通过Centricon旋转柱(100kDa MW截断值)将50-100ml细胞培养基浓缩10至20倍以达到10-30IU/ml FVIII活性。接着快速冷冻浓缩物质且储存在-80℃下以用于未来体外分析和体内药代动力学研究。

[0902] 实施例32:CFXTEN融合蛋白pSD0050和pSD0062在HemA和FVIII/VWF DKO小鼠中的药代动力学

[0903] 8-12周龄的雄性HemA或FVIII/VWF双重敲除(DKO)小鼠用单次静脉内施用来自实施例31的含有重组BDD-FVIII、CFXTEN pBD0050或pBD062的细胞培养浓缩物以100-300IU/kg治疗(n=3/组)。在所选时间点,通过眶后放血自同一组小鼠收集血液样本。在HemA小鼠中,在给药后5分钟、24小时和48小时收集血液样本,而在FVIII/VWF DKO小鼠中,在5分钟、8小时和16小时收集血液样本。通过FVIII显色测定分析血浆样本和细胞培养浓缩物的FVIII活性,且使用WinNonlin程序分析rBDD FVIII和FVIII-XTEN变体的PK分布。

[0904] 结果:两个CFXTEN结构域内插入变体pSD0050和pSD0062以及rBDD-FVIII在HemA小鼠和FVIII/VWF DKO小鼠中的PK分布显示于图25和表33中。在HemA小鼠中,观察到三个测试FVIII分子在5分钟间隔下的初始回收率类似。相较于野生型BDD-FVIII,两种CFXTEN融合蛋白均显示半衰期长2倍。在FVIII-VWF DKO小鼠中,由于VWF保护作用丧失,rBDD-FVIII仅具有15分钟的血浆半衰期。然而,在两个CFXTEN的情况下,半衰期分别延长至3.15小时和3.83

小时;所述数值与具有288C末端XTEN插入物的CFXTEN(实施例24)类似,从而表明在给定插入点处进一步延长XTEN长度可能不是必需的。在实验条件下,研究结果明确证明具有144个氨基酸残基的XTEN的结构域内插入不仅使FVIII活性保持,而且也提供与C末端288氨基酸XTEN插入变体类似的FVIII半衰期益处,从而表明FVIII结构域内插入物和C末端插入物的组合可使FVIII半衰期进一步延长。

[0905] 表33:CFXTEN在HemA和FVIII/VWF DKO小鼠中的药代动力学参数

[0906]

小鼠品系	治疗剂	5分钟回收率(%)	$T_{1/2}$(小时)	MRT(小时)	Cl(mL/h/kg)	Vss(mL/kg)	AUC_D(hkgmIU/mL/mIU)	$T_{1/2}$倍数增加
HemA	pSD0050	40	14.12	14.25	5.27	75.03	0.19	2.3
	pSD0062	43	12.96	14.79	4.24	62.67	0.24	2.1
	rBDD-FVIII	47	6.19	2.62	6.35	16.62	0.16	
FVIII/VWF DKO	pSD0050	34	3.15	2.59	21.73	56.28	0.05	~12
	pSD0062	35	3.83	3.71	18.51	68.69	0.05	~15
	rBDD-FVIII	23	~0.25					

[0907] 相较于rBDD-FVIII

[0908] 实施例33:CFXTEN融合多肽在大鼠中的药代动力学分析

[0909] 相较于单独FVIII在Sprague-Dawley大鼠中测试各种CFXTEN融合蛋白的药代动力学。通过颈静脉导管以3-10 μg/大鼠向雌性Sprague-Dawley大鼠(n=3)施用CFXTEN和FVIII。在给药前、0.08、0.5、1、2、4、8、24、48、72小时时间点将血液样本(0.2mL)收集至预冷冻的肝素化管中,且处理成血浆。使用用于捕获与检测两者的抗FVIII抗体,通过ELISA测定对测试物品进行定量。在WinNonLin中进行非区室分析,其中在拟合中包括所有时间点以确定PK参数。预期结果显示相较于单独FVIII,CFXEN的终末半衰期和曲线下面积增加,且分布体积降低,且结果连同来自凝血和药效学测定的结果一起用于选择具有所需性质的那些融合蛋白构型。

[0910] 实施例34:分析FVIII的XTEN插入位点

[0911] 通过预测容许位点在环结构或另外可挠性表面暴露的结构元件内的位置来对因子VIII分子内的XTEN插入位点进行选择。对于这些分析,使用FVIII的两个独立测定的X射线晶体结构的原子坐标(Shen BW等The tertiary structure and domain organization of coagulation factor VIII.Blood.(2008)2月1日;111(3):1240-1247;Ngo JC等Crystal structure of human factor VIII:implications for the formation of the factor IXa-factor VIIIa complex.Structure(2008)16(4):597-606),以及因子VIII和因子VIIIa的由分子动态模拟(MDS)获得的那些原子坐标(Venkateswarlu,D.Structural investigation of zymogenic and activated forms of human blood coagulation

factor VIII:a computational molecular dynamics study.BMC Struct BiQ1.(2010)10:7)。分析呈蛋白质数据库(PDB)格式的原子坐标以使用算法ASAView(Ahmad S等ASAView:database and tool for solvent accessibility representation in proteins.BMC Bioinformatics(2004)5:51)和GetArea(Rychkov G,Petukhov M.Joint neighbors approximation of macromolecular solvent accessible surface area.J Comput Chem(2007)28(12):1974-1989)鉴定FVIII/FVIIIa的预测具有高度溶剂可及表面积的区域。接着根据基于MDS研究的公开结果预测的高原子位置波动进一步优先考虑所得位点组。去除对侧接A1、A2和A3结构域的酸性肽区域内的位点以及根据目视检查似乎在除表面暴露的环以外的区域中的那些位点的优先考虑。基于物种间序列保守性评估所得潜在位点组,其中在20个脊椎动物物种之中在序列高度保守的区域中的那些位点被分级为更有利。另外,也在融合位点选择中考虑推定清除受体结合位点、FVIII与其它分子(如vWF、FIX)的相互作用位点、结构域和外显子边界。最后,去除紧密邻近于牵涉于甲型血友病中的在甲型血友病突变、搜寻、测试和资源中心(Haemophilia A Mutation,Search,Test and Resource Site,HAMSTeRS)数据库中所列的突变内的位点(Kemball-Cook G等The factor VIII Structure and Mutation Resource Site:HAMSTeRS第4版.NucleicAcids Res.(1998)26(1):216-219)。基于这些准则,提出42个供XTEN插入的FVIII-XTEN变体的构造。在这些构造中,3个代表XTEN插入在残余B结构域序列内,2个代表延伸至因子VIII分子的C末端,且37个代表XTEN插入在结构确定的结构域间和结构域内结构元件内;所述结构元件即残基3、18、22、26、40、60、116、130、188、216、230、333、375、403、442、490、518、599、713、745、1720、1796、1802、1827、1861、1896、1900、1904、1937、2019、2068、2111、2120、2171、2188、2227、2277和2332。

[0912] 实施例35:对FVIII-XTEN构建体的功能性分析

[0913] 两个FVIII-XTEN融合蛋白FVIII-AE288(F8X-40)和FVIII-AG288(F8X-41)分别含有融合在FVIIIC2结构域的C末端处的AE288_1XTEN或AG288_1XTEN。为确定在XTEN融合之后,FVIII活性是否得以保留,通过使用聚乙烯亚胺(PEI)在无血清培养基中用这两个FVIII-XTEN融合构建体分别转染HEK293细胞。在转染后3或5天,通过两级显色测定测试细胞培养上清液的FVIII活性。相对于WHO国际标准物校准的纯化重组FVIII用于建立显色测定中的标准曲线。F8X-40构建体与F8X-41构建体两者的融合蛋白产物均在与野生型BDD-FVIII构建体的水平类似的水平下表达。(表34)。

[0914] 表34.短暂转染细胞培养物中的FVIII-XTEN融合蛋白的FVIII效价

[0915]

FVIII分子		FVIII 066[a]	pBC 0114[a]	F8X-40	F8X-41
FVIII 活 性 (IU/ml)	样本A	6.42	6.68	7.47	3.32[b]
	样本B	7.13	7.61	8.25	未进行

[0916] a.FVIII 066与pBC 0114两者均含有无XTEN融合物的B结构域缺失的FVIII。

[0917] b.F8X-41样本来自3天转染而其它样本来自5天短暂转染。

[0918] 实施例36:对FVIII-XTEN构建体的功能性分析:FVIII活性和PK性质

[0919] 通过流体动力学质粒DNA注射来评估F8X-40和F8X-41构建体在FVIII和血管性血友病因子双重敲除小鼠中的半衰期延长潜力,其中FVIIIFc DNA构建体充当阳性对照。将小鼠随机分成3组,其中每组4只小鼠。向相应组中的小鼠施用编码BDD FVIIIFc融合蛋白、

F8X-40或F8X-41的都共有相同DNA载体骨架的质粒DNA。通过流体动力学注射将约100微克适当质粒DNA注射至各小鼠中,且在注射后24小时和48小时收集血液血浆样本。使用校正的重组FVIII作为标准物,通过两级显色测定测量血浆FVIII活性。如图23中所示,来自F8X-40和F8X-41组的样本显示血浆FVIII效价高于由BDD FVIIIFc获得的效价,从而表明FVIII与XTEN融合使FVIII体内半衰期延长。总之,这些数据支持以下结论:FVIII-XTEN融合蛋白在短暂转染中保留FVIII活性且展现在动物模型中的循环半衰期延长。

[0920] 实施例37:对CFXTEN在动物模型中的药效学评估

[0921] 使用多种临床前出血模型评估CFXTEN融合蛋白的体内药理学活性,所述模型包括但不限于血友病、手术、创伤、血小板减少/血小板功能障碍、氯吡格雷/肝素诱发的出血和流体动力学注射的模型。使用等效于针对其它FVIII方案使用和公开的方法的方法,在包括小鼠、大鼠、兔和狗的多个物种中开发这些模型。CFXTEN组合物是提供于可与体内施用相容的水性缓冲液(例如:磷酸盐缓冲生理盐水或Tris缓冲生理盐水)中。以针对特定模型而加以最优化的适当剂量、给药频率、给药时程和施用途径施用组合物。功效测定包括尤其FVIII活性、单级凝结测定、FVIII显色测定、活化的部分凝血酶原时间(aPTT)、出血时间、全血凝结时间(WBCT)、血栓弹力描记(TEG或ROTEM)的测量结果。

[0922] 在PD模型的一个实例中,向遗传缺陷性或实验诱发性HemA小鼠施用CFXTEN和FVIII。在施用后各种时间点,通过ELISA测量FVIII和CFXTEN的水平,通过可商购获得的FVIII活性试剂盒测量FVIII和CFXTEN的活性且通过aPTT测定测量凝结时间。总之,结果可指示相较于FVIII,CFXTEN构建体在频率较小或更适宜的给药间隔下可更有效抑制出血,和/或效能等效于类似剂量的FVIII。

[0923] 在一小鼠出血激发PD模型中,向遗传缺陷性或实验诱发性HemA小鼠施用CFXTEN和FVIII且测量对止血激发的作用。止血激发可尤其包括尾部横切激发、血液关节病变关节病变激发、关节出血或隐静脉激发。在施用后各种时间点,通过ELISA测量FVIII和CFXTEN的水平,通过可商购获得的FVIII活性试剂盒测量FVIII和CFXTEN的活性,测量出血时间,且通过aPTT测定测量凝结时间。总之,预期结果指示相较于FVIII,CFXTEN构建体在频率较小或更适宜的给药间隔下更有效抑制出血,和/或效能等效于类似剂量的FVIII,且结果连同来自凝血和其它测定的结果一起用于选择具有所需性质的那些融合蛋白构型。

[0924] 在狗PD模型中,向遗传缺陷性血友病狗施用CFXTEN和FVIII。在施用后各种时间点,通过ELISA测量FVIII和CFXTEN的水平,通过可商购获得的FVIII活性试剂盒测量FVIII和CFXTEN的活性且通过aPTT测定测量凝结时间。总之,结果指示相较于FVIII,CFXTEN构建体在频率较小或更适宜的给药下可更有效抑制出血,和/或效能等效于类似剂量的FVIII,且结果连同来自凝血和其它测定的结果一起用于选择具有所需性质的那些融合蛋白构型。

[0925] 在一狗出血激发PD模型中,向遗传缺陷性血友病狗施用CFXTEN和FVIII且测量对止血激发的作用。止血激发尤其包括角质层出血时间。在施用后各种时间点,通过ELISA测量FVIII和CFXTEN的水平,通过可商购获得的FVIII活性试剂盒测量FVIII和CFXTEN的活性,测量出血时间,且通过aPTT测定测量凝结时间。总之,结果指示相较于FVIII,CFXTEN构建体在频率较小或更适宜的给药间隔下可更有效抑制出血,和/或效能等效于类似剂量的FVIII,且结果连同来自凝血和其它测定的结果一起用于选择具有所需性质的那些融合蛋白构型。

[0926] 其它临床前出血模型包括但不限于血友病、手术、创伤、血小板减少/血小板功能障碍、氯吡格雷/肝素诱发的出血和流体动力学注射的模型。可使用等效于针对其它FVIII方案使用和公开的方法的方法,在包括小鼠、大鼠、兔和狗的多个物种中开发这些模型。总之,结果指示相较于FVIII,CFXTEN构建体在频率较小或更适宜的给药间隔下可更有效抑制出血,和/或效能等效于类似剂量的FVIII,且结果连同来自凝血和其它测定的结果一起用于选择具有所需性质的那些融合蛋白构型。

[0927] 实施例38:具有裂解序列的CFXTEN

[0928] 可由FXIa释放的C末端XTEN

[0929] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,将含有由FXIa蛋白酶(EC 3.4.21.27,Uniprot P03951)识别并裂解的氨基酸序列的释放位点裂解序列并入CFXTEN中。具体来说,氨基酸序列KLTRAET(SEQ ID NO:1688)是在序列的精氨酸之后由FXIa蛋白酶切割。FXI是在内源性或接触活化的凝血路径中紧靠FVIII之前定位的促凝血蛋白酶。活性FXIa是通过由FXIIa蛋白水解裂解酶原来自FXI产生。FXIa的产生受严密控制且仅在凝血为适当止血所必需时发生。因此,通过并入KLTRAET裂解序列(SEQ ID NO:1688),XTEN结构域仅与内源性凝血路径的活化同时且当凝血为生理所需时自FVIII移除。这产生在内源性路径的活化期间,CFXTEN融合蛋白是以另一方式处理的情况。

[0930] 可由FIIa(凝血酶)释放的C末端XTEN

[0931] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。在这个情况下,释放位点含有由FIIa蛋白酶(EC 3.4.21.5,Uniprot P00734)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列LTPRSLLV(SEQ ID NO:1618)[Rawlings N.D.等(2008)Nucleic Acids Res.,36:D320]是在序列中的位置4处的精氨酸之后被切割。活性FIIa是通过在磷脂和钙存在下由FXa裂解FII来产生且在凝血路径中处于因子IX的下游。一旦活化,它在凝血中的天然作用将裂解纤维蛋白原(图2),所述纤维蛋白原接着又开始形成凝块。FIIa活性受严密控制且仅在凝血为适当止血所必需时存在。因此,通过并入LTPRSLLV序列(SEQ ID NO:1618),XTEN结构域仅与外源性或内源性凝血路径的活化同时,且当凝血为生理所需时自FVIII移除。这产生在凝血的活化期间,CFXTEN融合物是以另一方式处理的情况。

[0932] 可由弹性蛋白酶.2释放的C末端XTEN

[0933] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,释放位点含有由弹性蛋白酶-2蛋白酶(EC 3.4.21.37,Uniprot P08246)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列LGPVSGVP(SEQ ID NO:1689)[Rawlings N.D.等(2008)Nucleic Acids Res.,36:D320]是在序列中的位置4之后被切割。弹性蛋白酶由嗜中性白细胞组成性表达且一直存在于循环中。它的活性受丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(serpin)严密控制且因此在大多数时间具有最小活性。因此,当长寿命的CFXTEN循环时,它的一部分被裂解,从而产生待用于凝血中的较短寿命的FVIII集合。在本发明组合物的一合乎需要的特征中,这产生恒定释放防治性量的FVIII的循环前药储槽。

[0934] 可由MMP-12释放的C末端XTEN

[0935] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,释放位点含有由MMP-12蛋白酶(EC 3.4.24.65,Uniprot P39900)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列GPAGLGGA(SEQ ID NO:1690)[Rawlings N.D.等(2008) Nucleic Acids Res.,36:D320]是在序列的位置4之后被切割。MMP-12组成性表达于全血中。因此,当长寿命的CFXTEN循环时,它的一部分被裂解,从而产生待用于凝血中的较短寿命的FVIII集合。在本发明组合物的一合乎需要的特征中,这产生恒定释放防治性量的FVIII的循环前药储槽。

[0936] 可由MMP-13释放的C末端XTEN

[0937] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,释放位点含有由MMP-13蛋白酶(EC 3.4.24.-,Uniprot P45452)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列GPAGLRGA(SEQ ID NO:1691)[Rawlings N.D.等(2008) Nucleic Acids Res.,36:D320]是在位置4之后被切割。MMP-13组成性表达于全血中。因此,当长寿命的CFXTEN循环时,它的一部分被裂解,从而产生待用于凝血中的较短寿命的FVIII集合。在本发明组合物的一合乎需要的特征中,这产生恒定释放防治性量的FVIII的循环前药储槽。

[0938] 可由MMP-17释放的C末端XTEN

[0939] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,释放位点含有由MMP-20蛋白酶(EC.3.4.24.-,Uniprot Q9ULZ9)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列APLGLRLR(SEQ ID NO:1692)[Rawlings N.D.等(2008) Nucleic Acids Res.,36:D320]是在序列中的位置4之后被切割。MMP-17组成性表达于全血中。因此,当长寿命的CFXTEN循环时,它的一部分被裂解,从而产生待用于凝血中的较短寿命的FVIII集合。在本发明组合物的一合乎需要的特征中,这产生恒定释放防治性量的FVIII的循环前药储槽。

[0940] 可由MMP-20释放的C末端XTEN

[0941] 产生由XTEN蛋白融合于FVIII的C末端所组成的CFXTEN融合蛋白,其具有置放在FVIII与XTEN组分之间的XTEN释放位点裂解序列,如图12中所描绘。示例性序列提供于表51中。在这个情况下,释放位点含有由MMP-20蛋白酶(EC.3.4.24.-,Uniprot O60882)识别并裂解的氨基酸序列。具体来说,序列PALPLVAQ(SEQ ID NO:1693)[Rawlings N.D.等(2008) Nucleic Acids Res.,36:D320]是在位置4(用箭头描绘)之后被切割。MMP-20组成性表达于全血中。因此,当长寿命的CFXTEN循环时,它的一部分被裂解,从而产生待用于凝血中的较短寿命的FVIII集合。在本发明组合物的一合乎需要的特征中,这产生恒定释放防治性量的FVIII的循环前药储槽。

[0942] XTEN的释放速率的优化

[0943] 可产生前述实施例的变体,其中改变并入在C末端、N末端处的XTEN或内部XTEN的释放速率。因为由XTEN释放蛋白酶达成的XTEN释放速率取决于XTEN释放位点的序列,所以

通过改变XTEN释放位点中的氨基酸序列,可控制XTEN释放速率。许多蛋白酶的序列特异性在本领域中是熟知的,且记载在若干数据库中。在这个情况下,使用底物的组合文库[Harris,J.L等(2000)Proc NatlAcad Sci U SA,97:7754]或通过追踪如[Schellenberger,V等(1993)Biochemistry,32:4344]中所说明的对底物混合物的裂解来测绘蛋白酶的氨基酸特异性。一替代方案是通过噬菌体展示来鉴定最优蛋白酶裂解序列[Matthews,D.等(1993)Science,260:1113]。制备具有变异序列的构建体且使用用于检测XTEN多肽的标准测定来测定XTEN释放。

[0944] 实施例39:用于评估包含FVIII的CFXTEN的人临床试验设计

[0945] Kogenate®FS是意图用于促进甲型血友病受试者的止血的重组人凝血因子VIII。由于它的半衰期较短,Kogenate是每隔一天进行静脉内给药以进行防治且在治疗出血时是8至每12小时进行静脉内给药直至实现止血。据信使一个或多个XTEN融合于FVIII会改善蛋白质的半衰期,从而使得使用所述含有CFXTEN的融合蛋白组合物能够降低给药频率。

[0946] 设计临床试验以使CFXTEN相对于Kogenate或其它可商购获得的FVIII制剂的功效和优势可在人中得以验证。所述研究包含三期。首先,在成年患者中进行I期安全性和药代动力学研究以确定在人(正常受试者或患有血友病的患者)中的最大耐受剂量以及药代动力学和药效学,以及确定待在未来研究中追踪的潜在毒性和不利事件。进行I期研究,其中通过所述途径(例如,皮下、肌肉内或静脉内)施用单次升高剂量的CFXTEN组合物,且以确定间隔测量生物化学、PK和临床参数。这允许确定最小有效剂量和最大耐受剂量且确定剂量和循环药物的构成相应组分的治疗窗的阈值浓度和最大浓度,以及当通过肌肉内或皮下途径施用时的生物可用度。根据这个信息,获得允许以较小频率施用CFXTEN组合物,但保留药理学反应的剂量和给药时程。此后,在患有病状的患者中进行临床试验,从而验证CFXTEN组合物在各剂量条件下的有效性,所述临床试验可相较于如Kogenate的阳性对照来进行以确定CFXTEN组合物的性质增强。

[0947] II期和III期临床试验是在罹患因子VIII可被预期来提供临床益处的任何疾病的患者中进行。举例来说,CFXTEN在临床试验中用于治疗核准使用因子VIII的适应症;所述适应症包括甲型血友病中的出血事件,患者具有针对因子VIII的抑制剂,在手术介入或侵袭性程序中防止具有针对因子VIII的抑制剂的甲型血友病患者的出血,处理先天性缺乏因子VIII的患者的出血事件,以及在手术介入或侵袭性程序中防止先天性缺乏因子VIII的患者的出血。CFXTEN也可被指示在其它患者群体中使用。在甲型血友病患者中进行II期给药研究,其中测量随融合蛋白组合物的给药而变的适于试验的药效学、凝血、出血和其它生理、PK、安全性和临床参数以及临床终点,从而除收集与不利事件相关的安全性数据之外也产生适于随后III期试验的关于剂量的剂量范围信息。使PK参数与生理、临床和安全性参数数据相关联以确定CFXTEN组合物的治疗窗和治疗剂量方案,从而允许临床医师确定组合物的适当剂量范围。在一个试验中,将评估具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者以确定CFXTEN药物组合物的导致实现和维持止血以及防止或减弱出血事件的剂量和剂量方案。最后,进行III期功效研究,其中使用鉴于相应组合物的由II期研究结果获得的药代动力学和药效学性质而视为适当的给药时程向患者施用CFXTEN药物组合物和阳性对照(如可商购获得的Kogenate),其中所有药剂都持续适当延长的时期施用以完成研究。监测的参数包括aPTT测定、单级或两级凝结测定、出血事件的控制或自发性出血事件的出现;所述参数是相

对于安慰剂或阳性对照组加以追踪。使用标准统计方法确定功效结果。在这个研究中也追踪毒性和不利事件指标以验证化合物在以所述方式使用时是安全的。在另一III期试验中，将评估具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者以确定CFXTEN药物组合物实现和维持止血以及防止或减弱出血事件的有效性。

[0948] 实施例40:具有不同有效负载的XTEN融合蛋白的分析型尺寸排阻色谱

[0949] 对含有各种治疗性蛋白质和长度递增的非结构化重组蛋白的融合蛋白进行尺寸排阻色谱分析。一示例性测定使用TSKGel-G4000SWXL(7.8mm x 30cm)柱,其中用20mM磷酸盐(pH 6.8)、114mM NaCl以流速0.6ml/min分离浓度是1mg/ml的40μg纯化胰高血糖素(glucagon)融合蛋白。使用OD214nm和OD280nm监测色谱分布图。所有测定的柱校准都是使用来自BioRad的尺寸排阻校准标准物来进行;标示物包括甲状腺球蛋白(670kDa)、牛γ-球蛋白(158kDa)、鸡卵清蛋白(44kDa)、马肌红蛋白(17kDa)和维生素B12(1.35kDa)。胰高血糖素-Y288、胰高血糖素-Y144、胰高血糖素-Y72、胰高血糖素-Y36的代表性色谱分布图以上覆形式显示于图21中。数据显示各化合物的表观分子量与连接的XTEN序列的长度成比例。然而,数据也显示各构建体的表观分子量显著大于对于球状蛋白质所预期的表观分子量(如通过与在相同测定中操作的标准蛋白质进行比较所示)。基于对评估的所有构建体(包括CFXTEN组合物)的SEC分析,表观分子量、表观分子量因子(表示为表观分子量与计算分子量的比率)和流体动力学半径(R_H,以nm计)显示于表35中。结果指示并入576个氨基酸或更多个氨基酸的不同XTEN赋予融合蛋白的表观分子量约339kDa至760,且864个氨基酸或或更多个氨基酸的XTEN赋予表观分子量大于约800kDA。表观分子量与实际分子量成比例增加的结果对于用来自若干不同基序家族的XTEN产生的融合蛋白而言是一致的;所述基序家族即AD、AE、AF、AG和AM,其中增加至少4倍且比率高达约17倍。另外,将具有576个氨基酸或更多个氨基酸的XTEN融合配偶体并入具有各种有效负载(且在胰高血糖素融合于Y288的情况下是288个残基)的融合蛋白中产生流体动力学半径7nm或更大,完全超出约3-5nm的肾小球孔尺寸。因此,预期包含生长因子和XTEN的融合蛋白相对于相应未融合生物有效负载蛋白质具有降低的肾清除率,从而有助于增加终末半衰期以及改进治疗或生物作用。

[0950] 表35:对各种多肽的SEC分析

[0951]

构建体名称	XTEN或融合配偶体	治疗性蛋白质	实际MW(kDa)	表观MW(kDa)	表观分子量因子	R_H (nm)
AC14	Y288	胰高血糖素	28.7	370	12.9	7.0
AC28	Y144	胰高血糖素	16.1	117	7.3	5.0
AC34	Y72	胰高血糖素	9.9	58.6	5.9	3.8
AC33	Y36	胰高血糖素	6.8	29.4	4.3	2.6

[0952]

构建体名称	XTEN或融合配偶体	治疗性蛋白质	实际MW(kDa)	表观MW(kDa)	表观分子量因子	R_H (nm)
AC89	AF120	胰高血糖素	14.1	76.4	5.4	4.3
AC88	AF108	胰高血糖素	13.1	61.2	4.7	3.9
AC73	AF144	胰高血糖素	16.3	95.2	5.8	4.7
AC53	AG576	GFP	74.9	339	4.5	7.0
AC39	AD576	GFP	76.4	546	7.1	7.7
AC41	AE576	GFP	80.4	760	9.5	8.3
AC52	AF576	GFP	78.3	526	6.7	7.6
AC398	AE288	FVII	76.3	650	8.5	8.2
AC404	AE864	FVII	129	1900	14.7	10.1
AC85	AE864	唾液素-4	83.6	938	11.2	8.9
AC114	AM875	唾液素-4	82.4	1344	16.3	9.4
AC143	AM875	hGH	100.6	846	8.4	8.7
AC227	AM875	IL-1ra	95.4	1103	11.6	9.2
AC228	AM1318	IL-1ra	134.8	2286	17.0	10.5

[0953] 实施例41:融合于GFP的延伸多肽在食蟹猕猴中的药代动力学

[0954] 测试GFP-L288、GFP-L576、GFP-XTEN-AF576、GFP-XTEN_Y576和XTEN_AD836-GFP在食蟹猕猴中的药代动力学以确定非结构化多肽的组成和长度对PK参数的影响。在注射之后各时间分析血液样本且使用用于捕获的针对GFP的多克隆抗体和相同多克隆抗体的用于检测的生物素化制剂,通过ELISA测量血浆中的GFP的浓度。结果概述于图19中。它们显示半衰期随XTEN序列的长度增加而惊人增加。举例来说,测定GFP-XTEN_L288(在XTEN中具有288个氨基酸残基)的半衰期是10小时。使非结构化多肽融合配偶体的长度倍增至576个氨基酸使多个融合蛋白构建体的半衰期增加至20-22小时;所述构建体即GFP-XTEN_L576、GFP-XTEN_AF576、GFP-XTEN_Y576。使非结构化多肽融合配偶体长度进一步增加至836个残基导致XTEN_AD836-GFP的半衰期是72-75小时。因此,使聚合物长度自288个残基至576个残基增加288个残基使体内半衰期增加约10小时。然而,使多肽长度自576个残基至836个残基增加260个残基使半衰期增加超过50小时。这些结果显示存在非结构化多肽长度的导致体内半衰期大于成比例增加的惊人阈值。因此,预期包含延伸非结构化多肽的融合蛋白相较于长度较短的多肽具有药代动力学增强的性质。

[0955] 实施例42:XTEN的血清稳定性

[0956] 在37℃下在猴血浆和大鼠肾溶解产物中孵育含有融合于GFP的N末端的XTEN AE864的融合蛋白多达7天。在时间0、第1天和第7天取样且依次通过SDS PAGE以及使用蛋白质印迹分析进行检测和用针对GFP的抗体进行检测加以分析,如图20中所示。XTEN_AE864的序列显示历经7天在血浆中的降解征象可忽略。然而,历经3天,XTEN_AE864在大鼠肾溶解产物中快速降解。测试融合蛋白在血浆样本中的体内稳定性,其中使GFP_AE864免疫沉淀且如上所述通过SDS PAGE进行分析。在注射之后多达7天取出的样本显示极少降解征象。结果证明CFXTEN对归因于血清蛋白酶的降解具有抗性;所述抗性是CFXTEN融合蛋白的药代动力学性质增强的因素。

[0957] 实施例43:通过连接于XTEN来增加肽有效负载的溶解度和稳定性

[0958] 为评估XTEN增强物理化学性质溶解度和稳定性的能力,制备且评估胰高血糖素加较短长度XTEN的融合蛋白。在Tris-缓冲生理盐水中在中性pH下制备测试物品且通过反相HPLC和尺寸排阻色谱表征Gcg-XTEN溶液以确认蛋白质在溶液中是均质和非聚集的。数据呈现于表36中。出于比较目的,在60μM(0.2mg/mL)下测量未修饰胰高血糖素在相同缓冲液中的溶解度限度,且结果证明对于添加的所有XTEN长度,都实现溶解度的实质性增加。重要的是,在大多数情况下,制备胰高血糖素-XTEN融合蛋白以实现靶标浓度且不评估来确定给定构建体的最大溶解度限度。然而,在胰高血糖素连接于AF-144XTEN的情况下,测定溶解度限度,结果是相较于未连接于XTEN的胰高血糖素,溶解度实现增加60倍。此外,评估胰高血糖素-AF144CFXTEN的稳定性,且发现在冷藏条件下以液体制剂形式稳定至少6个月且在37℃下稳定约1个月(数据未显示)。

[0959] 数据支持以下结论:使短长度XTEN多肽连接于如胰高血糖素的生物活性蛋白质可显著增强就所得融合蛋白而言的蛋白质的溶解度性质,以及赋予在较高蛋白质浓度下的稳定性。

[0960] 表36:胰高血糖素-XTEN构建体的溶解度

[0961]

测试物品	溶解度
胰高血糖素	60μM
胰高血糖素-Y36	＞370μM
胰高血糖素-Y72	＞293μM
胰高血糖素-AF108	＞145μM
胰高血糖素-AF120	＞160μM
胰高血糖素-Y144	＞497μM
胰高血糖素-AE144	＞467μM
胰高血糖素-AF144	＞3600μM
胰高血糖素-Y288	＞163μM

[0962] 实施例44:通过预测算法对二级结构的序列的分析

[0963] 可通过某些计算机程序或算法,如熟知的Chou-Fasman算法(Chou,P.Y.等(1974)Biochemistry,13:222-45)和Garnier-Osguthorpe-Robson或“GOR”方法(Gamier J,Gibrat JF,Robson B.(1996).GOR method for predicting protein secondar.y structure from amino acid sequence.Methods Enzymol 266:540-553)评估二级结构的氨基酸序列。对于给定序列,算法可预测是否存在一些或完全不存在二级结构,表示为序列中形成例如α螺旋或β折叠的总残基数和/或残基的百分比或序列中预测会导致形成无规卷曲的残基的百分比。

[0964] 已使用Chou-Fasman和GOR方法的两种算法工具评估来自XTEN“家族”的若干代表性序列以评估这些序列中的二级结构的程度。Chou-Fasman工具由William R.Pearson和弗吉尼亚大学(Universityof Virginia)在“Biosupport”因特网站提供,所述站点的URL在万维网上位于.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_www.cgi?rm=misc 1(如它在2009年6月19日所存在)处。GOR工具由Pole Informatique Lyonnais在网络蛋白质序列分析(Network Protein Sequence Analysis)因特网站提供,所述站点的URL在万维网上位于.npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/secpred_gor4.pl(如它在2008年6月19日所存在)处。

[0965] 作为分析中的第一步,通过两种算法分析单一XTEN序列。AE864组合物是具有自四个含12个氨基酸的序列基序的多个拷贝产生的864个氨基酸残基的XTEN,所述基序由氨基酸G、S、T、E、P和A组成。序列基序的特征在于以下事实:在基序内和在总体序列内存在有限重复性,因为任何两个连续氨基酸的序列在任一含12个氨基酸的基序中不重复超过两次,且全长XTEN中没有三个连续氨基酸是相同的。通过Chou-Fasman和GOR算法(后者需要17个氨基酸的最小长度)分析来自N末端的AF 864序列的连续较长部分。通过将FASTA格式序列输入预测工具中且运行分析来分析序列。来自分析的结果呈现于表37中。

[0966] 结果指示,根据Chou-Fasman计算结果,AE和AG家族的多达至少288个氨基酸残基的短XTEN不具有α螺旋或β折叠,但通过GOR算法预测的无规卷曲百分比的量自78%至99%变化。随着504个残基的XTEN长度增加至大于1300,通过Chou-Fasman算法分析的XTEN的预测α螺旋或β折叠百分比是0至约2%,而计算的无规卷曲百分比增加至94%-99%。具有α螺旋或β折叠的那些XTEN是具有一个或多个导致形成预测β折叠的三个连续丝氨酸残基的情况的那些序列。然而,即使这些序列也仍然具有约99%无规卷曲形成率。

[0967] 本文提供的数据表明1)预测自G、S、T、E、P和A的关于连续氨基酸具有有限重复性的多个序列基序产生的XTEN具有极低量的α螺旋和β折叠;2)增加XTEN的长度不可观地增加α螺旋或β折叠形成概率;以及3)通过添加由氨基酸G、S、T、E、P和A组成的非重复12-mer来渐进增加XTEN序列的长度导致无规卷曲形成的百分比增加。结果进一步指示预期本文定义的具有有限重复性(包括在任一基序中具有至多两个相同连续氨基酸的XTEN序列)的XTEN序列(包括例如自G、S、T、E、P和A的序列基序产生的XTEN)具有极有限的二级结构。来自表3的序列基序的任何顺序或组合都可用于产生将导致XTEN序列大致上缺乏二级结构的XTEN多肽,但三个连续丝氨酸不是优选的。然而,三个连续丝氨酸的不利性质可通过增加XTEN的长度来改善。预期所述序列具有本文公开的本发明的CFXTEN实施方案中所述的特征。

[0968] 表37:多肽序列的CHOU-FASMAN和GOR预测计算结果

[0969]

序列名称	SEQ ID NO:	残基数	Chou-Fasman 计算结果	GOR 计算结果
AE36: LCW0402_002	1489	36	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	94.44%
AE36: LCW0402_003	1490	36	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	94.44%
AG36: LCW0404_001	1491	36	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	77.78%
AG36: LCW0404_003	1492	36	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	83.33 %
AE42_1	1493	42	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	90.48%
AE42_1	1494	42	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	90.48%
AG42_1	1495	42	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	88.10%
AG42_2	1496	42	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	88.10%
AE144	1497	144	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	98.61%
AG144_1	1498	144	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	91.67%
AE288	1499	288	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	99.31%
AG288_2	1500	288	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	92.71
AF504	1501	504	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	94.44%
AD 576	1502	576	残基总数：H：7 E：0 百分比：H：1.2 E：0.0	99.65%
AE576	1503	576	残基总数：H：2 E：0 百分比：H：0.4 E：0.0	99.65%
AG576	1504	576	残基总数：H：0 E：3 百分比：H：0.4 E：0.5	99.31%

[0970]

序列名称	SEQ ID NO:	残基数	Chou-Fasman 计算结果	GOR 计算结果
AF540	1505	540	残基总数：H：2 E：0 百分比：H：0.4 E：0.0	99.65
AD836	1506	836	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	98.44%
AE864	1507	864	残基总数：H：2 E：3 百分比：H：0.2 E：0.4	99.77%
AF864	1508	875	残基总数：H：2 E：0 百分比：H：0.2 E：0.0	95.20%
AG864	1509	864	残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0.0 E：0.0	94.91%
AM875	1510	875	残基总数：H：7 E：3 百分比：H：0.8 E：0.3	98.63%
AM1318	1511	1318	残基总数：H：7 E：0 百分比：H：0.7 E：0.0	99.17%
AM923	1512	924	残基总数：H：4 E：3 百分比：H：0.4 E：0.3	98.70%
AE912	1513	913	残基总数：H：8 E：3 百分比：H：0.9 E：0.3	99.45%
BC 864	1514		残基总数：H：0 E：0 百分比：H：0 E：0	99.77%

[0971] H:α螺旋E:β折叠

[0972] 实施例45:对多肽序列的重复性的分析

[0973] 在这个实施例中,评估包括若干XTEN序列的不同多肽在氨基酸序列方面的重复性。可通过定量较短子序列在总体多肽内出现的次数来评估多肽氨基酸序列的重复性。举例来说,200个氨基酸残基长度的多肽具有总计165个重叠36氨基酸“嵌段”(或“36-mer”)和198个3-mer“子序列”,但独特3-mer子序列的数目将取决于序列内重复的量。对于分析,通过确定通过应用以下等式获得的子序列计分来评估不同多肽序列的重复性:

[0974] $$\text{子序列计分} = \frac{\sum_{i=1}^{m} \text{计数}_i}{m} \qquad \text{I}$$

[0975] 其中:m＝(多肽的氨基酸长度)-(子序列的氨基酸长度)+1;且计数$_i$＝序列$_i$内各独特子序列的累积出现次数

[0976] 在本实施例的分析中,在使用图27中描绘的算法的计算机程序中使用前述等式确定表38的多肽的子序列计分,其中子序列长度设置在3个氨基酸下。所得子序列计分是对多肽内重复性程度的反映。

[0977] 表38中所示的结果指示由2或3个氨基酸类型组成的非结构化多肽具有高子序列计分,而由六种氨基酸G、S、T、E、P和A的含12个氨基酸的具有低程度的内部重复性的基序组成的那些多肽具有小于10,且在一些情况下小于5的子序列计分。举例来说,L288序列具有两种氨基酸类型且具有短高度重复序列,从而产生子序列计分50.0。多肽J288具有三种氨

基酸类型,但也具有短重复序列,从而产生子序列计分33.3。Y576也具有三种氨基酸类型,但不由内部重复序列构成,反映在历经前200个氨基酸的子序列计分是15.7。W576由四种类型的氨基酸组成,但具有较高程度的内部重复性,例如“GGSG”(SEQ ID NO:1694),从而产生子序列计分23.4。AD576由四种类型的含12个氨基酸的基序组成,各基序由四种类型的氨基酸组成。由于个别基序的内部重复性的程度较低,历经前200个氨基酸的总体子序列计分是13.6。相反,由含有六种类型的氨基酸的四个各自具有低程度的内部重复性的基序组成的XTEN具有较低子序列计分;即AE864(6.1)、AF864(7.5)和AM875(4.5),而由含有五种类型的氨基酸的四个基序组成的XTEN处于中等;即AE864具有计分7.2。

[0978] 结论:结果指示将各自由四至六种非重复氨基酸类型组成的含12个氨基酸子序列基序组合成较长XTEN多肽导致总体序列大致上是非重复的,如通过总体子序列计分小于10,且在许多情况下小于5所指示。这不考虑各子序列基序可跨越序列使用多次的事实。相反,自较小数目的氨基酸类型产生的聚合物产生较高子序列计分,其中由两种氨基酸类型组成的多肽具有的计分高于由三种氨基酸类型组成的那些多肽。

[0979] 表38:多肽序列的子序列计分计算结果

[0980]

序列名称	SEQ ID NO:	计分
J288	1515	33.3
K288	1516	46.9
L288	1517	50.0
Y288	1518	26.8
Q576	1519	18.5
U576	1520	18.1
W576	1521	23.4
Y576	1522	15.7
AE288	1523	6.0
AG288_1	1524	6.9
AD576	1525	13.6
AE576	1526	6.1
AF540	1527	8.8
AF504	1528	7.0
AE864	1529	6.1
AF864	1530	7.5
AG864	1531	7.2
AG868	1532	7.5
AM875	1533	4.5

[0981]

序列名称	SEQ ID NO:	计分
AE912	1534	4.5
AM923	1535	4.5
AM1296	1536	4.5

[0982] 实施例46:计算TEPITOPE计分

[0983] 9mer肽序列的TEPITOPE计分可通过如由Sturniolo[Sturniolo,T.等(1999)Nat Biotechnol,17:555]所述添加口袋潜能(pocket potential)来计算。在本实施例中,计算

个别HLA等位基因的单独Tepitope计分。表39显示以高频率存在于高加索人群体中的HLA0101B的口袋潜能作为一实例。为计算具有序列P1-P2-P3-P4-P5-P6-P7-P8-P9的肽的TEPITOPE计分,添加表39中的相应个别口袋潜能。具有序列FDKLPRTSG(SEQ ID NO:1695)的9mer肽的HLA0101B计分是0、-1.3、0、0.9、0、-1.8、0.09、0、0的总和。

[0984] 为评估长肽的TEPITOPE计分,可对序列的所有9mer子序列重复所述过程。可对由其它HLA等位基因编码的蛋白质重复这个过程。表40-43给出以高频率存在于高加索人群体中的HLA等位基因的蛋白质产物的口袋潜能。

[0985] 通过这个方法计算的TEPITOPE计分在约-10至+10的范围内。然而,在P1位置中缺乏疏水性氨基酸的9mer肽(FKLMVWY(SEQ ID NO:1696))的计算TEPITOPE计分在-1009至-989的范围内。这个值在生物学上无意义并反映疏水性氨基酸充当HLA结合的锚定残基的事实且在P1中缺乏疏水性残基的肽被视为HLA的非结合剂。因为大多数XTEN序列缺乏疏水性残基,所以9mer子序列的所有组合将具有在-1009至-989的范围内的TEPITOPE。这个方法确认XTEN多肽可具有少数或不具有预测T细胞表位。

[0986] 表39:HLA0101B等位基因的口袋潜能。

[0987]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-2.4	-	-2.7	-2	-	-1.9
E	-999	0.1	-1.2	-0.4	-	-2.4	-0.6	-	-1.9
F	0	0.8	0.8	0.08	-	-2.1	0.3	-	-0.4
G	-999	0.5	0.2	-0.7	-	-0.3	-1.1	-	-0.8
H	-999	0.8	0.2	-0.7	-	-2.2	0.1	-	-1.1
I	-1	1.1	1.5	0.5	-	-1.9	0.6	-	0.7
K	-999	1.1	0	-2.1	-	-2	-0.2	-	-1.7
L	-1	1	1	0.9	-	-2	0.3	-	0.5
M	-1	1.1	1.4	0.8	-	-1.8	0.09	-	0.08
N	-999	0.8	0.5	0.04	-	-1.1	0.1	-	-1.2
P	-999	-0.5	0.3	-1.9	-	-0.2	0.07	-	-1.1

[0988]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
Q	-999	1.2	0	0.1	-	-1.8	0.2	-	-1.6
R	-999	2.2	0.7	-2.1	-	-1.8	0.09	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	-0.7	-	-0.6	-0.2	-	-0.3
T	-999	0	0	-1	-	-1.2	0.09	-	-0.2
V	-1	2.1	0.5	-0.1	-	-1.1	0.7	-	0.3
W	0	-0.1	0	-1.8	-	-2.4	-0.1	-	-1.4
Y	0	0.9	0.8	-1.1	-	-2	0.5	-	-0.9

[0989] 表40:HLA0301B等位基因的口袋潜能。

[0990]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0

C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	2.3	-	-2.4	-0.6	-	-0.6
E	-999	0.1	-1.2	-1	-	-1.4	-0.2	-	-0.3
F	-1	0.8	0.8	-1	-	-1.4	0.5	-	0.9
G	-999	0.5	0.2	0.5	-	-0.7	0.1	-	0.4
H	-999	0.8	0.2	0	-	-0.1	-0.8	-	-0.5
I	0	1.1	1.5	0.5	-	0.7	0.4	-	0.6
K	-999	1.1	0	-1	-	1.3	-0.9	-	-0.2
L	0	1	1	0	-	0.2	0.2	-	-0
M	0	1.1	1.4	0	-	-0.9	1.1	-	1.1
N	-999	0.8	0.5	0.2	-	-0.6	-0.1	-	-0.6
P	-999	-0.5	0.3	-1	-	0.5	0.7	-	-0.3
Q	-999	1.2	0	0	-	-0.3	-0.1	-	-0.2
R	-999	2.2	0.7	-1	-	1	-0.9	-	0.5
S	-999	-0.3	0.2	0.7	-	-0.1	0.07	-	1.1
T	-999	0	0	-1	-	0.8	-0.1	-	-0.5
V	0	2.1	0.5	0	-	1.2	0.2	-	0.3
W	-1	-0.1	0	-1	-	-1.4	-0.6	-	-1
Y	-1	0.9	0.8	-1	-	-1.4	-0.1	-	0.3

[0991] 表41:HLA0401B等位基因的口袋潜能。

[0992]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	1.4	-	-1.1	-0.3	-	-1.7
E	-999	0.1	-1.2	1.5	-	-2.4	0.2	-	-1.7
F	0	0.8	0.8	-0.9	-	-1.1	-1	-	-1
G	-999	0.5	0.2	-1.6	-	-1.5	-1.3	-	-1
H	-999	0.8	0.2	1.1	-	-1.4	0	-	0.08
I	-1	1.1	1.5	0.8	-	-0.1	0.08	-	-0.3
K	-999	1.1	0	-1.7	-	-2.4	-0.3	-	-0.3
L	-1	1	1	0.8	-	-1.1	0.7	-	-1

[0993]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
M	-1	1.1	1.4	0.9	-	-1.1	0.8	-	-0.4
N	-999	0.8	0.5	0.9	-	1.3	0.6	-	-1.4
P	-999	-0.5	0.3	-1.6	-	0	-0.7	-	-1.3
Q	-999	1.2	0	0.8	-	-1.5	0	-	0.5
R	-999	2.2	0.7	-1.9	-	-2.4	-1.2	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	0.8	-	1	-0.2	-	0.7
T	-999	0	0	0.7	-	1.9	-0.1	-	-1.2
V	-1	2.1	0.5	-0.9	-	0.9	0.08	-	-0.7
W	0	-0.1	0	-1.2	-	-1	-1.4	-	-1
Y	0	0.9	0.8	-1.6	-	-1.5	-1.2	-	-1

[0994] 表42:HLA0701B等位基因的口袋潜能。

[0995]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-1.6	-	-2.5	-1.3	-	-1.2
E	-999	0.1	-1.2	-1.4	-	-2.5	0.9	-	-0.3
F	0	0.8	0.8	0.2	-	-0.8	2.1	-	2.1
G	-999	0.5	0.2	-1.1	-	-0.6	0	-	-0.6
H	-999	0.8	0.2	0.1	-	-0.8	0.9	-	-0.2
I	-1	1.1	1.5	1.1	-	-0.5	2.4	-	3.4
K	-999	1.1	0	-1.3	-	-1.1	0.5	-	-1.1
L	-1	1	1	-0.8	-	-0.9	2.2	-	3.4
M	-1	1.1	1.4	-0.4	-	-0.8	1.8	-	2
N	-999	0.8	0.5	-1.1	-	-0.6	1.4	-	-0.5
P	-999	-v.5	0.3	-1.2	-	-0.5	-0.2	-	-0.6
Q	-999	1.2	0	-1.5	-	-1.1	1.1	-	-0.9
R	-999	2.2	0.7	-1.1	-	-1.1	0.7	-	-0.8
S	-999	-0.3	0.2	1.5	-	0.6	0.4	-	-0.3
T	-999	0	0	1-4	-	-0.1	0.9	-	0.4
V	-1	2.1	0.5	0.9	-	0.1	1.6	-	2
W	0	-0.1	0	-1.1	-	-0.9	1.4	-	0.8
Y	0	0.9	0.8	-0.9	-	-1	1.7	-	1.1

[0996] 表43:HLA1501B等位基因的口袋潜能。

[0997]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
A	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
C	-999	0	0	0	-	0	0	-	0
D	-999	-1.3	-1.3	-0.4	-	-0.4	-0.7	-	-1.9
E	-999	0.1	-1.2	-0.6	-	-1	-0.7	-	-1.9
F	-1	0.8	0.8	2.4	-	-0.3	1.4	-	-0.4
G	-999	0.5	0.2	0	-	0.5	0	-	-0.8
H	-999	0.8	0.2	1.1	-	-0.5	0.6	-	-1.1

[0998]

氨基酸	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9
I	0	1.1	1.5	0.6	-	0.05	1.5	-	0.7
K	-999	1.1	0	-0.7	-	-0.3	-0.3	-	-1.7
L	0	1	1	0.5	-	0.2	1.9	-	0.5
M	0	1.1	1.4	1	-	0.1	1.7	-	0.08
N	-999	0.8	0.5	-0.2	-	0.7	0.7	-	-1.2
P	-999	-0.5	0.3	-0.3	-	-0.2	0.3	-	-1.1
Q	-999	1.2	0	-0.8	-	-0.8	-0.3	-	-1.6
R	-999	2.2	0.7	0.2	-	1	-0.5	-	-1
S	-999	-0.3	0.2	-0.3	-	0.6	0.3	-	-0.3
T	-999	0	0	-0.3	-	-0	0.2	-	-0.2
V	0	2.1	0.5	0.2	-	-0.3	0.3	-	0.3
W	-1	-0.1	0	0.4	-	-0.4	0.6	-	-1.4
Y	-1	0.9	0.8	2.5	-	0.4	0.7	-	-0.9

[0999] 实施例46:XTEN插入容许环中的评估。

[1000] XTENAE42-4插入

[1001] 具有XTENAE42插入物的FVIII的构建和表达描述于实施例17和24中。因此,当残基X表示插入位点且残基Z表示天然FVIII多肽序列中的下一残基时,由插入XTENAE42产生的多肽将含有序列:

[1002] X-GAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPASS-Z(SEQ ID NO:1697)

[1003] 选择FVIII序列中的16个不同位点供XTEN AE42插入,且这些位点是设计批次1。选择供XTEN AE42插入的额外21个位点是设计批次2。总之,批次1和批次2位点代表A1结构域中的12个位点、A2结构域中的7个位点、A3结构域中的10个位点、C1结构域中的4个位点和C2结构域中的3个位点。批次1和2位点在FVIII的3D结构中的位置描绘于图32中。

[1004] 这些批次1和批次2插入位点的定位产生37个指定为pSD0001-pSD0004、pSD0009-pSD0012、pSD0023-pSD0032、pSD0034-pSD0063[前述范围也包括所有中间编号]的构建体,其序列阐述于表21中且其插入位点阐述于表23中。

[1005] 体外测定

[1006] 为评估FVIII对XTEN AE42-4插入物的耐受性,使用FVIII显色测定分析来自FVIII-XTEN细胞培养物的培养基样本中的FVIII活性。通过FVIII-HC(FVIII重链)和FVIII-LC(FVIII轻链)ELISA分析抗原表达水平。

[1007] 通过显色测定测量FVIII活性

[1008] 使用来自DiaPharma的COATEST® SP FVIII试剂盒(批号N089019)测量FVIII活性,且所有孵育都在37℃板加热器上在振荡下进行。使用1x FVIIICOATEST®缓冲液将来自6孔板的FVIII-XTEN AE42-4变体的短暂转染培养基的细胞培养收集物稀释至所需FVIII活性范围。于含有模拟转染培养基的1x FVIIICOATEST®缓冲液中制备FVIII标准物,所述缓冲液具有与测试样本匹配的培养基浓度。重组因子VIII(rFVIII)标准物的范围是100mIU/mL至0.78mIU/mL。一式两份添加标准物、稀释的细胞培养物样本和汇合的正常人血浆测定对照至Immulon®2HB 96孔板中(25 μL/孔)。

[1009] 依序添加新鲜制备的IXa/FX/磷脂混合物(50 μL)、25μL 25mM CaCl2和50μL FXa底物至各孔中,其中在各次添加之间孵育5分钟。在与底物一起孵育之后,添加25μL 20%乙酸以终止显色反应,且用SpectraMAX®plus(Molecular Devices)仪器测量在405nm下的吸光度。

[1010] 使用SoftMax Pro软件(5.2版)进行数据分析。最低定量水平(LLOQ)是39mIU/mL。结果呈现于表22中。

[1011] 通过FVIII-HC和FVIII-LC ELISA测量表达

[1012] 使用ELISA来定量变体的表达。通过FVIII-LC ELISA分析对应于XTEN插入FVIII的A1和A2结构域中的DNA构建体的FVIII抗原表达水平。通过FVIII-HC ELISA分析对应于XTEN插入FVIII的A3、C1和C2结构域中的DNA构建体的FVIII抗原表达水平。结果呈现于表22中。

[1013] 通过用于FVIII-LC ELISA)的GMA011抗体(Green Mountain Antibodies)或通过用于FVIII-HC ELISA的GMA016抗体(Green MountainAntibodies)捕获在收集之后细胞培养基中的FVIII-XTEN抗原。通过在4℃下过夜孵育,用100μl/孔的抗FVIII抗体(2μg/ml)涂布Immulon®2HB96孔板。各板接着用具有吐温-20的磷酸盐缓冲生理盐水(PBST)洗涤四次且在室温下用阻断缓冲液(具有10%热失活马血清的PBST)阻断1小时。

[1014] 使用1x阻断缓冲液将来自6孔板的FVIII-XTEN变体的短暂转染培养基的细胞培养收集物稀释至所需FVIII抗原范围。于含有模拟转染培养基的1x FVIII阻断缓冲液中制备FVIII标准物,所述缓冲液具有与测试样本匹配的培养基浓度。rFVIII标准物的范围是50ng/mL至0.39ng/mL。

[1015] 一式两份添加标准物、稀释的细胞培养物样本、和汇合的正常人血浆测定对照至Immulon®2HB 96孔板中(100μL/孔)且在37oC下孵育2小时。在用PBST洗涤四次之后,添加100μl HRP-绵羊抗hFVIII抗体(Affinity Biologicals,F8C-EIC-D)至各孔中且在37℃下孵育各板1小时。在又用PBST洗涤四次之后,添加100μl TMB超灵敏底物(Super Sensitive Substrate)(BioFX)至各孔中,随后显色5-10分钟。为终止显色反应,添加50μL H2SO4至各孔中,且用SpectraMAX plus(Molecular Devices)仪器测量在450nm下的吸光度。

[1016] 使用SoftMax Pro软件(5.4版)进行数据分析。最低定量水平(LLOQ)是0.0039μg/mL。结果呈现于表22中。

[1017] 将插入XTEN序列而不消除重组蛋白的促凝血活性或重组蛋白在宿主细胞中表达的能力的容许位点群集在FVIII的三个A结构域的各者中的环内。图36显示在显示FVIII活性的重组FVIII蛋白中的结构域A1、A2和A3上的插入位点的位置。图33显示描绘显示FVIII活性的重组FVIII蛋白中的插入位点的位置的结构示意图。

[1018] 容许位点群集在溶剂暴露的高度可挠性表面环(XTEN容许环)中。在成熟人FVIII

的序列中,A1结构域环分别位于大致对应于氨基酸位置15至45以及201至232的区域中(图30)。在成熟人FVIII的序列中,A2结构域环分别位于大致对应于氨基酸位置395至421以及577至635的区域中(图30)。在成熟人FVIII的序列中,A3结构域环分别位于大致对应于氨基酸位置1705至1732以及1884至1917的区域中(图30)。图38和39显示在FVIII的三维结构中,XTEN容许环相对于二级结构元件的位置。

[1019] 实施例47:插入有具有144个氨基酸的XTEN的CFXTEN

[1020] 对以上呈现的初步数据(实施例46)的分析表明在FVIII A结构域的线性多肽序列和3D结构内存在可容纳XTEN序列的插入的确定区域。为测试这个假设且进一步确定可容纳XTEN序列的插入而不损失FVIII活性的推定区域的边界,选择23个不存在于批次1或2中的额外插入位点且指定为批次3。

[1021] 通过插入包含氨基酸残基Gly(G)、Ala(A)、Pro(P)、Ser(S)、Thr(T)和Glu(E)的含144个残基的XTEN AE多肽、或包含氨基酸残基Gly(G)、Ala(A)、Pro(P)、Ser(S)和Thr(T)的含144个残基的XTEN AG多肽来产生批次3构建体。产生五种不同形式的含144个残基的AE多肽且指定为XTEN-AE144-2A、XTEN-AE144-3B、XTEN-AE144-4A、XTEN-AE144-5A、XTEN-AE144-6B。氨基酸序列如表4中所阐述。产生五种不同形式的含144个残基的多肽且指定为XTEN-AG144-1、XTEN-AG144-A、XTEN-AG144-B、XTEN-AG144-C和XTEN-AG144-F。氨基酸序列如表4中所阐述。

[1022] 通过化学合成跨越基础载体内最近独特限制位点的DNA区段(DNA2.0,Redwood City,CA)来在插入位点的任一侧上引入含144个残基的XTEN的编码DNA序列。

[1023] 插入对应于XTEN 144肽的DNA序列以使所得DNA构建体将编码FVIII蛋白,其中XTEN 144蛋白序列紧靠在位点选择中指示的残基之后插入,且由AscI和XhoI位点侧接。

[1024] 除这些位点之外,通过用限制酶AscI及XhoI切除AE42多肽编码DNA区段,且在相同位点处引入XTENAE144和XTENAG144编码序列来修饰插入XTENAE42多肽不消除FVIII促凝血活性所处的来自批次1和2的那些位点。这些批次1,批次2和批次插入位点的位置概述于表III中。图34呈现显示XTEN 144插入位点的位置的FVIII结构示意图。

[1025] 产生总计48个具有144XTEN插入物的构建体。构建体是pSD0001-pSD0004、pSD0009-pSD0012、pSD0023-63[前述范围也包括所有中间编号],其序列阐述于表21中且其插入位点详述于表22中。

[1026] FVIII-XTEN 144变体的表达

[1027] 使用聚乙烯亚胺(PEI,Polysciences Inc.Warrington,PA)或Lipofectamine转染试剂(Invitrogen,Carlsbad,CA),将具有XTEN 144插入物的FVIII变体转染至HEK293F细胞(Invitrogen,Carlsbad,CA)中。使短暂转染的细胞在293Free Style培养基或293Free Style与CD Opti CHO培养基(Invitrogen,Carlsbad,CA)的混合物中生长。在转染之后3-5天收集细胞培养基且通过如本文所述进行的显色FVIII活性测定和FVIII ELISA分析FVIII表达。

[1028] 将来自短暂转染的细胞培养基在Centricon®旋转柱(100kd截断值)中浓缩10倍。接着快速冷冻浓缩物质且储存在-80℃下以用于未来体外分析和体内PK研究。

[1029] 体外测定

[1030] 为评估FVIII对插入物的耐受性,使用FVIII显色测定分析来自细胞培养物的培养

基样本中的FVIII活性。通过FVIII-HC(FVIII重链)和FVIII-LC(FVIII轻链)ELISA分析抗原表达水平。

[1031] 通过显色测定测量FVIII活性以及通过FVIII-HC和FVIII-LC ELISA测量表达

[1032] 如所述执行显色和ELISA测定方法。所得结果概述于表23中。

[1033] 将插入XTEN序列而不消除重组蛋白的促凝血活性或重组蛋白在宿主细胞中表达的能力的容许位点群集在FVIII的三个A结构域的各者中的环内。发现耐受较短插入的XTEN序列的相同XTEN容许环区域耐受较长XTEN序列的插入物。图38显示在显示FVIII活性的重组FVIII蛋白中的结构域A1、A2和A3上的XTEN 144插入位点的位置。图35显示描绘显示FVIII活性的重组FVIII蛋白中的插入位点的位置的结构示意图。

[1034] 这些观察结果指示FVIII的各A结构域内的两个区域能够容纳XTEN序列的插入物而不损失FVIII辅因子活性。这些所谓XTEN容许环的结构描绘(图40和41)证明它们在各A结构域中占据结构类似位置且自FVIII分子的一面突出。鉴定的XTEN容许环对应于位于A1、A2和A3结构域的三维结构中的β链之间的高度可挠性环,如图38和39中所示。

[1035] 实施例32中描述关于FVIII半衰期延长而对XTEN 144插入物的体内评估,如通过药代动力学所确定。

[1036] 实施例48:通过在FVIII的a3酸性肽区域内插入XTEN序列来挽救或增强FVIII表达。

[1037] 用FVIII-XTEN DNA构建体转染(如实施例24中所述)粘着HEK293细胞,在所述构建体中,B结构域缺失的因子VIII的编码序列含有2至4个各自具有144个氨基酸残基的XTEN插入物,组成和插入位置如下表44中所指示。在转染后5天,通过显色测定(如实施例25中所述)测定细胞培养上清液的FVIII活性。结果显示于表44中。

[1038] 表44.就在位置1720处含有XTEN以及一个、两个或三个额外XTEN插入物的CFXTEN变体而言的FVIII活性的表达水平。

[1039]

构建体名称	XTEN插入的结构域、位置和类型					活性 (mIU/mL)
	A1	A2	a3	A3-1	A3-2	
LSD0040.002				1720 AG144		175
LSD0041.008		403 AE144		1720 AG144		279
LSD0045.002			1656 AG144	1720 AG144		2598
PSD080.002	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144		1081
PSD083.001		403 AE144	1656 AG144	1720 AG144		789
PSD082.001	26 AG144			1720 AG144	1900 AE144	<LLOQ
PSD090.003	26 AG144		1656 AG144	1720 AG144	1900 AE144	316

[1040] 出于比较的目的,所有FVIII-XTEN构建体都在A3结构域内的氨基酸位置1720(相对于全长因子VIII加以编号)处具有AG144XTEN插入物。通过显色测定来测定FVIII-XTEN变体的表达水平且用单位mIU/mL表示。在A1结构域中的位置26(LSD0040.002)或A2结构域中

的位置403(LSD0041.008)处具有单一额外XTEN插入物的构建体分别产生表达水平175和279mIU/mL。相反,在a3酸性肽内的位置1656处具有单一额外XTEN插入物的构建体产生表达水平2598mIU/mL,从而证明相对于A1和A2插入构建体,a3XTEN插入构建体的表达水平增强。此外,相较于在A1结构域中的位置26和A3结构域中的位置1720处具有XTEN插入物的FVIII-XTEN构建体(LSD0040.002),在a3酸性肽区域内的位置1656处具有额外XTEN插入物的构建体(PSD080.002)产生显著较高表达(分别是175和1081 mIU/mL)。与这些研究结果一致,在A2结构域中的位置403和A3结构域中的位置1720处具有XTEN插入物的构建体(LSD0041.008)产生表达水平279mIU/mL,而在a3酸性肽区域内的位置1656处的额外XTEN插入物(PSD083.001)导致表达水平增加至789mIU/mL。最后,具有在A1结构域内的位置26处的XTEN插入物和在A3结构域内的位置1720和1900处的两个XTEN插入物的FVIII-XTEN构建体(PSD082.001)不产生高于定量下限的活性。然而,在a3酸性肽区域内具有额外XTEN插入物的FVIII-XTEN构建体(PSD090.003)产生可检测活性,从而证明在a3结构域内包括XTEN序列可导致否则在低于定量下限的水平下表达的FVIII-XTEN构建体的表达恢复(如通过活性所量度)。在实验条件下,结果支持以下结论:在1656位置处且推而广之在a3区域内插入XTEN会导致促凝血FVIII-XTEN组合物的表达增强。

[1041] 实施例49:XTEN插入物对通过aPTT测量的FVIII活性的影响

[1042] 除显色测定(如实施例25中所述)之外,单级活化的部分凝血酶原(aPTT)凝血测定也用于测定各种FVIII-XTEN融合蛋白的FVIII活性。

[1043] 方法:使用Sysmex CA-1500仪器(Siemens Healthcare Diagnostics Inc.,Tarrytown,NY)测量FVIII-XTEN aPTT活性。为产生用于测定的标准曲线,WHO因子VIII标准物用2%模拟转染培养基稀释至100mU/mL且接着进行2倍连续稀释,其中末个标准物是0.78mU/mL。FVIII-XTEN细胞培养样本首先在1:50下用aPTT测定缓冲液稀释,必要时用2%模拟转染培养基进行进一步稀释。

[1044] 在稀释之后,如下使用Sysmex仪器进行aPTT测定:使50μl稀释的标准物和样本与50μl人FVIII缺乏的血浆混合且接着与50μl aPTT试剂混合。在37℃下孵育混合物4分钟,且在孵育之后,添加50μl $CaCl_2$至混合物中,且立刻测量凝结时间。

[1045] 为测定测试样本FVIII活性,使用半对数尺度(凝结时间:线性;标准浓度:对数)绘制标准物的凝结时间以外推凝结时间与FVIII活性之间的等式,且接着相对于标准曲线计算FVIII-XTEN活性。测定灵敏度是40mU/mL因子VIII。

[1046] 结果:结果概述于图44-46中。当将144或288个氨基酸的单一XTEN插入FVIII中时,在显色测定中展现活性的所有FVIII-XTEN融合蛋白也在aPTT测定中具有活性。aPTT活性遵循显色测定的趋势,举例来说,在显色测定中显示低FVIII活性的那些分子也具有低aPTT值。通常,融合蛋白的aPTT结果低于通过显色测定获得的结果,其中显色与aPTT比率是1.1直至2.2,如图44中对于单一XTEN插入物所说明。一般来说,具有多个XTEN插入物的FVIII-XTEN融合蛋白显示aPTT活性相较于显色测定进一步降低。对具有两个XTEN插入物的FVIII-XTEN的测定显示所有构建体都具有活性,但其中在一些情况下,显色/aPTT比率接近4(图45)。对具有一些三个XTEN插入物的FVIII-XTEN的测定也显示在两种测定中均具有活性,其中在一些情况下,显色/aPTT比率接近5(图46),而BDD FVIII对照的比率更类似(图46的右侧)。另外,XTEN插入位点似乎促成在aPTT活性与显色活性之间所见的差异。举例来说,尽管

具有2个XTEN插入物的一些分子产生的活性低于显色值多达4倍,但具有2个XTEN的其它FVIII分子的aPTT活性与显色活性相当类似(图45)。具有3个XTEN插入物的一些分子显示低于显色活性多达5倍,具有3个XTEN的其它FVIII分子具有的aPTT活性低于显色活性小于2倍(图45)。在实验条件下,结果支持以下结论:FVIII-XTEN融合蛋白构建体保留促凝血活性,但显色分析通常提供的活性水平高于在用于研究中的aPTT测定系统中的活性水平。

[1047] 实施例50:评估XTEN插入位点对FVIII半衰期延长的影响

[1048] 方法:在FVIII/VWF DKO小鼠中测试六个在确定位置处具有单一XTEN AG-144插入物的FVIII-XTEN融合蛋白(大体上如实施例32中所述)以评估XTEN插入位点对FVIII半衰期的影响。选择六个在A1、A2、a3、A3-区域1(A3-R1)、A3-区域2(A3-R2)内或在C末端处具有XTEN插入物的代表性XTEN变体(列于表1中)用于这个研究,且自基础载体产生的BDD-FVIII用作对照。FVIII/VWF DKO小鼠用单次静脉内施用来自六个FVIII-XTEN构建体的短暂转染细胞培养基浓缩物(或阳性对照培养基)以100-200IU/kg治疗,且随后在给药后5分钟、7小时及16小时收集血浆样本。使用FVIII显色测定测试血浆FVIII活性且使用WinNonlin程序估计FVIII-XTEN半衰期。研究数据概述于表45和图47中。

[1049] 结果:相较于BDD-FVIII对照,观察到所有测试FVIII-XTEN变体的半衰期都显著较长,但半衰期增加程度不同,其中在403插入位点处具有XTEN的变体以10倍赋予最小半衰期延长(相较于对照),而1900插入变体以18倍赋予最大半衰期延长。XTEN插入位点关于FVIII半衰期延长的差异可反映不同FVIII结构域在FVIII体内清除中的作用。

[1050] 表45:FVIII-XTEN单一AG-144插入变体在FVIII/VWF DKO小鼠中的PK

[1051]

治疗剂	BDD-FVIII	pSD-050	pSD-0003	pSD-0039	pSD-0010	pSD-063	pSD-014
插入位点	无	26	403	1656	1720	1900	CT
回收率	21.3	33.8	34.8	36.0	33.6	39.6	32.4
t1/2 (小时)	0.25	3.15	2.4	3.3	4.28	4.54	3.91
t1/2增加 (倍数)		13	10	13	17	18	16

[1052] 实施例51:评估XTEN插入物对FVIII半衰期延长的累加作用。

[1053] 方法:为评估多个XTEN插入物对FVIII-XTEN融合蛋白半衰期的影响,使用来自五个构建体的细胞培养浓缩物测定具有1-3个XTEN插入物的FVIII-XTEN变体在FVIII-XTEN DKO小鼠中的半衰期(大体上如实施例32中所述)。在研究中测试五个FVIII-XTEN变体:在位置1900(相对于全长因子VIII加以编号)处具有AE144插入物的pSD-062;在FVIII B结构域(B结构域氨基酸位置745)中具有AE144的pSD-0005;在FVIII C末端(CT)处具有AE288的pSD-0019;AE144插入B结构域中且AE288插入在C末端处的LSD0003.006;以及具有三个XTEN,其中AE144、AE144和AE288插入在位置1900处、B结构域内和C末端处的LSD0055.021。使用WinNonlin程序估计FVIII-XTEN半衰期值。

[1054] 结果:研究结果概述于表46中,且PK曲线显示于图48中。研究结果明确证明多个XTEN插入物对FVIII半衰期延长具有累加作用。就单一XTEN插入物而言,FVIII的半衰期自0.25小时延长至3.2-4.0小时,即增加13至16倍。当B及CT XTEN插入物组合在一起时,FVIII

半衰期进一步延长至10.6小时,即延长42倍。最后,在于位置1900处向B/CT构建体中添加第三XTEN插入物的情况下,在FVIII-VWF DKO小鼠中的半衰期达到16小时,即增加64倍。

[1055] 表46:XTEN插入物对FVIII/VWF DKO小鼠中的FVIII $t_{1/2}$的累加作用

[1056]

治疗剂	BDD-FVIII	pSD-062	pSD-0005	pSD-0019	LSD-0003.006	LSD-0055.021
XTEN插入位点	无	1900	B	CT	B/CT	1900/B/CT
回收率	21.3	35.3	44.9	33.3	39.0	37.2
t1/2(小时)	0.25	3.8	3.2	4.0	10.6	16.0
t1/2增加(倍数)		15	13	16	42	64

[1057] 实施例52:使用毕提斯达测定评估FVIII-XTEN对抗FVIII抗体的结合的干扰

[1058] 评估FVIII分子中的XTEN插入物干扰由预先存在的抗FVIII抗体结合FVIII-XTEN融合蛋白的能力以确定它们在治疗具有抗FVIII抑制性抗体的患者方面具有效用。

[1059] 方法:为评估抗FVIII抗体的结合,相较于Refacto(一种销售的rFVIII),针对来自3名具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者的血浆样本(指定为04-483、05-505和GK1838-2079)以及来自Affinity Biologicals Inc的绵羊抗FVIII多克隆抗体(F8C-EIA-C)测试两个FVIII-XTEN变体(PSD088,其中144XTEN插入在位置26/403/1656/1900处;和PSD-090,其中144XTEN插入在位置26/1656/1720/1900处)。使用如下详述的改进毕提斯达测定方法测定四个抗FVIII抗体针对两个FVIII-XTEN变体(pSD-088和pSD-090)和Refacto对照的毕提斯达效价。以1:1比率使在各种稀释度下的热失活的抗FVIII抗体样本与1IU/mL各FVIII变体(以1X于FVIII显色测定缓冲液中稀释)一起孵育。接着在37℃孵育器中孵育FVIII/抗体混合物2小时。在孵育之后,用1x FVIII显色测定缓冲液将样本稀释10倍,且25μL稀释混合物接着用于FVIII显色测定。相对于已知非中和性样本的孵育后活性计算剩余FVIII活性的百分比,使用下式计算毕提斯达单位:BU=稀释因子X(LN(剩余活性百分比)+6.6438)。

[1060] 结果:结果列于表47中。当针对两个FVIII-XTEN变体测试时,相较于Refacto,观察到所有四种抗体的毕提斯达单位(BU)效价降低。分别获得针对PSD-088降低5至8倍以及针对pSD-090降低3至5倍。绘制各抗体的针对FVIII变体的抑制曲线(图49)并与Refacto进行比较,且显示两个FVIII-XTEN分子的抑制曲线明确左移,其中pSD-088FVIII-XTEN变体相较于pSD-090导致进一步左移。这些结果明确证明:1)两种FVIII-XTEN变异融合蛋白均比Refacto对预先存在的抗FVIII抑制性抗体具有更大抗性;以及2)PSD-088比PSD-090对抗FVIII抗体具有更大抗性,此可提供适用于确定XTEN插入位点在干扰抗FVIII抗体的结合方面的差异的信息。在实验条件下,结果提供对FVIII-XTEN组合物潜在用于治疗具有因子VIII抑制剂的甲型血友病患者的一定支持。

[1061] 表47:抗FVIII抗体针对FVIII-XTEN变体的毕提斯达效价

[1062]

抗FVIII抗体 / FVIII	04-483	05-505	GK1838-2079	F8C-EIA-C
pSD-088 (16/403/1656/1900)	2.5	8	47	57
pSD-090 (26/1656/1720/1900)	3.4	12	55	96
Refacto	12	66	268	337

[1063] 实施例53:含有四个XTEN插入物的FVIII XTEN融合分子在甲型血友病小鼠中的半衰期评估

[1064] 方法:在FVIII/VWF DKO小鼠中测试八个各自在确定位置处具有四个XTEN插入物的FVIII-XTEN融合蛋白以评估XTEN插入物对FVIII半衰期延长的影响:LSD0071.001,含有403-AG144、1900-AE144、745(B)-AE144、2332(CT)-AE288XTEN插入物(指定为FVIII氨基酸编号和插入的XTEN);LSD0071.002,含有403-AE144、1900-AE144、745(B)-AE144、2332(CT)-AE288XTEN插入物;LSD0072.001,含有403-AG144、1900-AG144、745(B)-AE144、2332(CT)-AE288XTEN插入物;LSD0072.002,含有403-AE144、1900-AG144、745(B)-AE144、2332(CT)-AE288XTEN插入物;pBC0247.004,含有18-AG144、403-AE144、1656-AG144、2332(CT)-AE288XTEN插入物;pBC0251.002,含有18-AG144、1656-AG144、1900-AE144、2332(CT)-AE288XTEN插入物;pSD088,含有26-AG144、403-AE144、1656)-AG144、1900-AE144XTEN插入物以及pSD090,含有26-AG144、1656-Ag144、1720-AG144、1900-AE144XTEN插入物。大体上如实施例32中所述以100-200IU/kg用单次静脉内施用八个构建体的FVIII-XTEN转染细胞培养基浓缩物来治疗FVIII/VWF DKO小鼠,且随后在给药后5分钟、8小时、24小时、48小时、72小时和96小时收集血浆样本。使用FVIII显色测定测试血浆FVIII活性且使用WinNonlin程序估计FVIII-XTEN半衰期。

[1065] 结果:八个含有四个XTEN插入物的FVIII XTEN融合分子都展现半衰期长于未修饰FVIII(结果在表48中)。XTEN插入在位置403、1900、B结构域和C末端处的三个分子达成半衰期多达16.3小时,此相较于未修饰BDD FVIII改进65倍。然而,用XTEN插入在26/403/1656/1900处(pSD088)或在26/1656/1720/1900处(pSD090)测试的分子分别显示半衰期9.1小时和9.5小时,此相较于BDD FVIII表示分别增加36倍和38倍。pBC247.004(XTEN插入在18/403/1656/CT处)和pBC251.002(XTEN插入在18/1900/1656/CT处)分别达成半衰期值14.1小时和13小时。结果证明多个XTEN插入物(在这个情况下是各FVIII分子具有四个XTEN插入物)可显著改进FVIII半衰期。进一步显示XTEN对FVIII半衰期的影响具有插入位点依赖性,即使在多个XTEN插入物的情况下也是这样。

[1066] 表48:具有四个XTEN插入物的FVIII-XTEN变体在FVIII/VWF DKO小鼠中的PK

[1067]

治疗剂	XTEN插入物	t1/2(小时)	t1/2增加(倍数)
BDD-FVIII	无	0.25	NA
LSD0071.001	403AG/1900AE/B/CT	16.2	64.8
LSD0071.002	403AE/1900AE/B/CT	16.3	65.2
LSD0072.001	403AG/1900AG/B/CT	11.8	47.2
LSD0072.002	403AE/1900AG/B/CT	16.1	64.4

pBC247.004	18/403/1656/CT	14.1	56.4
pBC251.002	18/1900/1656/CT	13.0	52
pSD088	26/403/1656/1900	9.1	36.4
pSD090	26/1656/1720/1900	9.5	38

[1068] 表49:示例性生物活性、示例性测定和优选适应症

[1069]

生物活性蛋白质	生物活性	示例性活性测定	优选适应症:
因子VIII (因子VIII; α辛凝血素 (Octocog alfa); α莫罗凝血素 (Moroctocog alfa);	凝血因子VIII是一种为止血所必需的因子。这个基因编码参与内源性凝血路径的凝血因子VIII; 因子VIII是在Ca+2和磷脂存在下使因子X转化成活化形式	Chromogenix测定 (Rosen S, Scand J Haematol (1984) 33 (增刊40):139-45); Chromogenix Coamatic®因子VIII测定; 单级凝结测定	甲型血友病; 出血; 因子VIII缺乏症; 具有因子VIII抑制剂的患者的出血事件;

[1070]

生物活性蛋白质	生物活性	示例性活性测定	优选适应症:
重组抗血友病因子; 诺黛特 (Nordiate); ReFacto; 拜科奇 (Kogenate); SF拜科奇 (Kogenate SF); 海利沙 (Helixate); 瑞可滨 (Recombinate))	Xa的因子IXa的辅因子。这个基因产生两种替代剪接转录物。转录物变体I编码大型糖蛋白亚型a,其在血浆中循环且与血管性血友病因子以非共价复合物形式缔合。这个蛋白质经受多个裂解事件。转录物变体2编码推定小蛋白质亚型b, 其主要由因子VIIIc的磷脂结合结构域组成。这个结合结构域为凝血活性所必需。这个基因的缺陷导致常见隐性X染色体关联的凝血病症甲型血友病。	(Lethagen, S.等, Scandinavian J Haematology (1986) 37:448-453)。单级凝结测定和两级凝结测定 (Barrowcliffe TW, Semin Thromb Hemost. (2002) 28(3):247-256); Development of a simple chromogenic factor VIII assay for clinical use. (Wagenvoord RJ, Hendrix HH, Hemker HC. Haemostasis 1989; 19(4): 196-204)、毕提斯达测定(Verbruggen B, 等 Improvements in factor VIII inhibitor detection: From Bethesda to Nijmegen. Semin Thromb Hemost. 2009年11月;35(8):752-759)	手术相关的出血性事件

[1071] 表50:包含FVIII和内部/外部XTEN序列的示例性CFXTEN(按照出现顺序分别是SEQ ID NO1537-1554)

[1072]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
FVIII BDD2 (A1-K127 - AE144- V128-N745- AE288- P1640- Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQAS LEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYD DDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSY KSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQA SRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRY YSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRF LPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGY TFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTG DYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLK RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEV EDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTK DEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMG SNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAG MSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-A375- AE576- K376-N745- AE144- P1640-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD

[1073]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
Y2332)	DNSPSFIQIRSVAGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEP SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRF MAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRL PKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIM HSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNA IEPRSFSQNGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDF DIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEF TDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA EPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCH TNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG VFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQ YGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMY SLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELM GCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPK EWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGN QDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-Y1792-AF144-E1793-Y2332-AE864)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYGGTSTPESGSASPGTSPSGESS TAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGT STPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGEEDQRQ GAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLV CHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRF HAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNL YPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITA SGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFI IMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRME LMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNN PKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEE GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG

[1074]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT SESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETP GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAP
FVIII BDD2 (A1-Y2043-AG144-G2044-Q2222-AG864-V2223-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNET KTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLV MAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKA GIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGT PGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGATGSPGTPGSG TASSSGGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYIS QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLR MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQG GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPS ASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGA SPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSST PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTS MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVH QIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-G1799-AE144-A1800-F2093-AE42-S2094-V2223-AE42-N2224-AE42-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFN IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTS QREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLV CREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQR IGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGIT DVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERD LASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLE DPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYE

[1075]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
N2225-G2278-AE42-K2279-Y2332)	DTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYED ISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGS FTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGGGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSG SETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEK DVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQ MEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPL GMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVGPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGGNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTT QGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGGTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESAT PESGPGSEPATSGSKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLG CEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-R28-AG144-F29-G244-AG288-L245-R2090-AG576-Q2091-Y2332-AG864)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARGPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSG TASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSGFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSY WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASA RAWPKMHTVNGYVNRSLPGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGAT GSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGLIGCHRKSVY WHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQH DGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNP PVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAGINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWY LLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGE HLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWST KEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGS PAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATS GSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAPGQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSS GIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQ IALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSP AGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE

[1076]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG SAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII (A1-T1651-AG576-R1652-K1808-AG144-P1809-F2093-AG288-S2094-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLR QSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQL RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDT TLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGP ALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTP LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPE SARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLK EMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKN LFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQI VEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTP STLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSS HLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKK VENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWN EANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDT ILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITGPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSSGRTTLQSDQEEI DYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRA QSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGPNETKTYFWKVQHHMAPTKD EFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSW YFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGM STLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWI KVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVK EFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLY

[1077]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	ASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGSSLYISQFII MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRME LMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNN PKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD2 (A1-A28-AG42-F29-E124-AG42-D125-E124-AG42-D125-P333-AG42-Q334-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAGGAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGPSGPGRFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEV YDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEGGPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYS YLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGGSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNSSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQT LLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKK HPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLK DFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQR GNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENP GLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNP PVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAA VERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHM APTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTK EPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFF GNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQIT ASSYFTNMFATWTPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQ SWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII (A1-D345-AE144-Y346-D403-AE144-R405-R1797-AE288-Q1798-Y2322)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDGGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGYD DDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDGGT STPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTAE SPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPG TSPSGESSTAPGRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLY GEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTV EDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVF DENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILS IGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGM TALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPEN DIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDS NNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTI PSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESG LMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRK THIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKN MEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGP EKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKI QEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLN DSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALK QFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNL

[1078]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	SLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKD LFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLA WDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWA KQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRG ELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRGGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPT STEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPAT SGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNI QMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVR KKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG MASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQG ARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRL HPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHL QGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQW TLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII (A1-N745)-AE864-(P1640-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG PGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPE SGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTIS VEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQ FKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISY EEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSG LIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTF KENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI RDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQN GKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY
FVIII BDD9 (A1-N745)-AE288-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR

[1079]

CFXTEN名称	氨基酸序列
(P1640-Y2332)	EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQREITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLY
FVIII BDD9(A1-S743)-AE288-(Q1638-Y2332)	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQE EIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLY
FVIII BDD9(A1-N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD

[1080]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
AG288_2	LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQA SRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSK ARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGC EAQDLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSP ATG
FVIII BDD9 (A1- S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGQNPPVLKRHQREITRTTLQS DQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQA SRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFS DVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCR APCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGH VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKC QTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIH GIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPII ARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSK ARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQ DGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGC EAQDLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSS PSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST

[1081]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSP ATG
FVIII BDD10 (A1-N745)-AE288-(P1640-Y2332)-AE288	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGT SESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESAT PESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGPPVLKRHQAEITRTTLQSDQ EEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRN RAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD10 (A1-S743)-AE288-(Q1638-Y2332)-AE288	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGQNPPVLKRHQAEITRTTLQSDQE EIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPC NIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFT VRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKT

[1082]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	QGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYI RLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAG SPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD10 (A1- N745)-AG288_2-(P1640-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSQNGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQAEITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQAS RPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVF TVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQT PLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARY IRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPAT G
FVIII BDD10 (A1- S743)-AG288_2-(Q1638-Y2332)-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVN RSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMD LGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLI GPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFP FSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLS KNNAIEPRSFSGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGP GSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQNPPVLKRHQAEITRTTLQSD

[1083]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQAS RPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSD VDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRA PCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVF TVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQT PLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIK TQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARY IRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGH QWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQ DLYGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGA SPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPAT G

[1084] 序列名称反映FVIII区段(氨基酸跨越编号是相对于成熟序列)和XTEN组分的N末端至C末端构型

[1085] 表51:包含FVIII、裂解序列和XTEN序列的示例性CFXTEN(按照出现顺序分别是SEQ ID NO 1555-1590)

[1086]

CFXTEN名称	氨基酸序列
SP-AE288-CS-L-(FVIII_1-745)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQGPEGPSATRRYYLGAVE LSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLG PTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSH TYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFI LLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWH VIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGM EAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKT WVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAI QHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEI FKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDF RNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTST EEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTST EPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV

[1087]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLL TRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGS ETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGS AP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQS PRSFQGPSGPATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFV EFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEY DDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA LLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNG YVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFD DDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKY KKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLY SRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHY FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHA GMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESA TPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH

[1088]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPR SFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGE LNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKT YFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQ EFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINA WSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQ ITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPEGPSQSPRSFQGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG SEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE GSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-745)-AE576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQS PRSFQGPEGPSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAE YDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG ALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRK YKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPS

[1089]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSP TSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHY FIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLG PYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHH MAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFD ETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLS MGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHA GMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSW IKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKE FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLY
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AE288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPIEP RSPSGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFT VHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLM DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYK KVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVF MSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS FSGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTE PSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTE EGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQS GSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYS SLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDV HSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDP TFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYK MALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRD FQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYI SQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLR MELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVN NPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQG NQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGIEPRSPSGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AG288-	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG

[1090]

CFXTEN名称	氨基酸序列
CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AG288	SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSIEPRSPSGSPGATRRYYLGAVEL SWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGP TIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHT YVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFIL LFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHV IGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGME AYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTW VHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQ HESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIF KYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKR NVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVA YWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFR NRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGT SSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSP GSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPS GATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP GASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPS GATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP GSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSA STGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLR NRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRP YSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL EKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQ MEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKK EEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMAS GHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQK FSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSI RSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAW RPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQ PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG PGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTG PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
SP-AG576-CS-L-(FVIII_1-745)-AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTG SQSPRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLF VEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAE YDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIG ALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVN GYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL LMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRK YKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPL YSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIG PLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNI MHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE

[1091]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIE PRSFSQNPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS SPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSP SASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVL RNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASR PYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVD LEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNI QMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRK KEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQ KFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHY SIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNA WRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNG KVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPR SFQGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AG576	MQIELSTCFFLCLLRFCFSATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH GITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSST PSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASS SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSQSPRS FQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGEL NEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTY FWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQE FALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQD QRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVE CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINA WSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLM VFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQ ITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVK SLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQS WVHQIALRMEVLGCEAQDLYGSPGQSPRSFQPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG

[1092]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGS
SP-AG288-CS-L-(FVIII_1-743)-AG288-(FVIII_1686-2332)-L-CS-AE288	MQIELSTCFFLCLLRFCFSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSQSPRSFQGPSGPATRRYYLGAV ELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLL GPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGS HTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHK FILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYW HVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDG MEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPK TWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREA IQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGE IFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDK RNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEV AYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDF RNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDG SFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKN FVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPA HGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL PGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGPSGPQSPRSFQGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
SP-AE576-CS-L-(FVIII_1-743)-AG576-(FVIII_1686-2332)	MQIELSTCFFLCLLRFCFSGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG SEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPQS PRSFQGSPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVE FTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYD DQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGAL LVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY VNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLM DLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDD DNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYK KVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSR RLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLI

[1093]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	CYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHS INGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVF MSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRS FSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSST GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS AVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYI RAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAP TKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKS WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGS NENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMS TLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKV DLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKH NIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFAT WSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLI SSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL GCEAQDLY
FVIII BDD2 S367-FXIa-AE42-F368-Y2332-FXIa-AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNSSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSKLT RAETGEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSGFIQIRSVAKKHPKTWVHY IAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESG ILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYK WTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVIL FSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWY ILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRG MTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSD QEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNR AQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYS FYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEK DVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEY KMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIR DFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSL YISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTL RMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWTPSKARLHLQGRSNAWRPQV NNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQ GNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGSPAGSP TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSE GSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE SGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTS TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTST EEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSE SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

[1094]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
FVIII BDD2 N745-FIXa-AG288-FIXa-P1640-Y2332-FIXa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPLGR IVGGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPG SSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGLPGRIVGGPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDT ISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQ FKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYE EDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIG PLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKEN YRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYN LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIM YSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW LQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSF TPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYPLGRIVGGGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPG SSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD2 V128-FVIIa-AG42-FVIIa-G2044-FVIIa-AG144-Y2332-FVIIa-AG576	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVLQVRIVGGGAPSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGPSGPGLQVRIVGG FPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQ TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAK KHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDF PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQ IMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSV CLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGC HNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQRE ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTF RNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHV FTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP

[1095]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	LGMASGHIRDFQITASGQYGLQVRIVGGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGLQVRIVGGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYLQVRIVGGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST GTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSAS TGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPG SSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG ATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGT ASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG SSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSAS TGTGPGASPGTSSTGS
AE864-FVIII-凝血酶-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF

[1096]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGLTPRSLLVGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-FXIIa-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGTMTRIVGGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-弹性蛋白酶-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAP

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-FXIa-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGKLTRAETGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD3-凝血酶-AE144	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTVHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQGEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYGLTPRSLLVGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTS TEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-MMP-17-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT

[1097]

[1098]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGAPLGLRLRGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-FXIIa-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGTMTRIVGGGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE

[1099]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AG144-FVIII BDD2-FXIa-AG576	SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGKLTRAETGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATG SPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSST PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGT GPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGS
AE144-FXIa-FVIII BDD2-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGKLTRAETGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI SPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYL NNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIY PHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLY RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNE TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE144-FVIII BDD2-Y2332-凝血酶-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKT LFVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEG AEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGL IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQ TLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVV RFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVR PLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGL IGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQAS NIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFS GETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNN AIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHL GLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKV QHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFF TIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRW YLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEH LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEP FSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV DSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYF TNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSM YVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIA LRMEVLGCEAQDLYGLTPRSLLVGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA

[1100]

[1101]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE864-FVIII-MMP-17-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGAPLGLRLRGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AF144-	GTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSESPSGTAPGSTSSTA

[1102]

CFXTEN名称	氨基酸序列
FXIIa-FVIII-FXIIa-AF864	ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGT SPSGESSTAPGTMTRIVGGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSV VYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYW KASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVK DLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAW PKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPI TFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD SEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNN GPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPH GITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMER DLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLED PEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTL TLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYL LSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLL RQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLR LNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLF GKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLT KDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDR MLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQ RTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSR NLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQN VEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRI SPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKE KGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSG VQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTS GKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATE SSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINE GQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFD IYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRK NFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNP AHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMD TLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEML PSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLG MESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKV TGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLL TRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGTMTRIVGGGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESP SGTAPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGT SPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSG TAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSP SGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPE SGPXXXGASASGAPSTXXXXSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAP GSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTA ESPGPGTSPSGESSTAPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGS TSESPSGTAPGTSTPESGSASPGTSTPESGSASPGSTSESPSGTAPGTSTPESGSASPGSTSSTAES PGPGSTSESPSGTAPGSTSESPSGTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGTSPSGESSTAPGTST PESGSASPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGTSPSGESSTAPGSTSSTAESPGPGSTSSTAESPG PGTSPSGESSTAPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSP
AE864-FVIII-FXIa-AE144	GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPS EGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGT SESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE SGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPA

[1103]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAG SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNI AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQRE KEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGS LAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLL FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQ IRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHP STRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKY ETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQLHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDF KVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEE NNDSKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKT SNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSN KTTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQ LVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQ EKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRS LNDSTNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRAL KQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLS LAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQKDLFP TETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDN HYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRT ERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTR HYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGL LGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIF DETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLH AGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFS WIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDS SGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYV KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALR MEVLGCEAQDLYGKLTRAETGGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSP TSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPG TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAP
AE144-FXIa-FVIII BDD9-AE864	GSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GTSTEPSEGSAPGKLTRAETGATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNT SVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDL VKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASAR AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEI SPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYL NNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIY PHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNM ERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQL EDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYED TLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQ

[1104]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	SPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLY RGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNE TKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQV TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIW RVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGS INAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGT LMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISD AQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQG VKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHP QSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPA GSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSE TPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTST EPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSE TPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSES ATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA PGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP SEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP GTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGS PTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGP GSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
AE48-FXIa-FVIII BDD9-AE864	MAEPAGSPTSTEEGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGKLTRAETGATRRYY LGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPW MGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVF PGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQ TLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRK SVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSH QHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAK KHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETF KTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDF PILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQ IMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSV CLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGC HNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQRE ITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMS SSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTF RNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWA YFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNC RAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHV FTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTP LGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQ GARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLH PTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGR SNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQ NGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYGGSPAG SPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPS EGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPG TSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATP ESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT STEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSE PATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS TEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTS ESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPES GPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSE SATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST

[1105]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	EEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
FVIII BDD9-FXIa-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGT GPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSP SASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
FVIII BDD9-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS

[1106]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD9 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD9 (1-743) AG288_2-(1638-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQPGASP GTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATG

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	SPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASP GTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTG SPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPG SGTASSSPGSSTPSGATGSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
[1107] BDD10 (1-745) AG288_2-(1640-Y2332)-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNGPG ASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTS STGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPG TPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDE DENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFV KPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAH GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLP GLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPS KAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARL HYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRG NSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGME SKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTG VTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTR YLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSS PSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS SSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSS TPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTG TGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTP

[1108]

CFXTEN 名称	氨基酸序列
	GSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTAS SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTG TGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGAS PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGAT GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGAS PGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSST GSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTP GSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD10-FXIa-AG288_2	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGAGSPGAETAPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSG ATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPG SSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAS TGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPG ASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSGAETAEQKLISEEDLSPATG
FVIII BDD10-FXIa-AG864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA

[1109]

CFXTEN名称	氨基酸序列
	QDLYKLTRAETGGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGS PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPG TSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS PGTPGSGTASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGS GTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTP SGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTP SGATGSPGASPGTSSTGSP
FVIII BDD10-FXIa-AE864	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIA KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGL IGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLF CHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQI RSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAY TDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVK HLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVD QRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFD SLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPG LWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVL KRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERL WDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVE DNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFT ENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIH SIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV YSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP MIIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPS KARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQD GHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEA QDLYKLTRAETGGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTE PSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTE EGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTE PSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSA PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPA TSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAP GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPAT SGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESA TPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGS PTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESA TPESGPGTSTEPSEGSAP

[1110] 序列名称反映FVIII变体和XTEN组分的N末端至C末端构型:信号肽(SP);接头(L);裂解序列(CS)可由对序列具有活性的蛋白酶名称表示,且XTEN组分由家族名称和长度表示,其中组分的插入点由邻近于插入序列的FVIII氨基酸和编号位置表示或A1是N末端且Y2332是FVIII的C末端。

[1111] 本公开涉及下述实施方案:

[1112] 1.重组因子VIII融合蛋白,其包含与至少一个延伸的重组多肽(XTEN)融合的因子VIII多肽,

[1113] 其中所述因子VIII多肽包含A1结构域、A2结构域、A3结构域、a3结构域、C1结构域、C2结构域、和任选B结构域或所述B结构域的一部分。

[1114] 2.如项1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在选自所述A1结构域、所述A2结构域、所述A3结构域、所述B结构域、所述a3结构域、所述C1结构域、或所述C2结构域的至少一个结构域内,或者所述至少一个XTEN融合至所述因子VIII多肽的C-末端。

[1115] 3.如项1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN或插入在所述B结构域或所述B结构域的一部分中,或融合至所述因子VIII多肽的C-末端,或两者都有。

[1116] 4.如项1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在所述A1结构域、所述A2结构域、所述A3结构域、所述a3结构域或其任意组合中。

[1117] 5.如项2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A1结构域包含容许环-1(A1-1)区域和容许环-2(A1-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A1-1、A1-2或两者中。

[1118] 6.如项2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A2结构域包含容许环-1(A2-1)区域和容许环-2(A2-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A2-1、A2-2或两者中。

[1119] 7.如项2或4所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述A3结构域包含容许环-1(A3-1)区域和容许环-2(A3-2)区域,其中所述至少一个XTEN插入在A3-1、A3-2或两者中。

[1120] 8.如项5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A1-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸15至约氨基酸45的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-1中。

[1121] 9.如项5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A1-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸18至约氨基酸32的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-1中。

[1122] 10.如项5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A1-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸201至约氨基酸232的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-2中。

[1123] 11.如项5所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A1-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸211至约氨基酸224的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A1-2中。

[1124] 12.如项6所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A2-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸395至约氨基酸421的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A2-1中。

[1125] 13.如项6所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A2-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸397至约氨基酸418的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A2-1中。

[1126] 14.如项6所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A2-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸577至约氨基酸635的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A2-2中。

[1127] 15.如项6所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A2-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸595至约氨基酸607的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A2-2中。

[1128] 16.如项7所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A3-1)区域对应于天

然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸1705至约氨基酸1732的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A3-1中。

[1129] 17.如项7所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-1(A3-1)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸1711至约氨基酸1725的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A3-1中。

[1130] 18.如项7所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A3-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸1884至约氨基酸1917的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A3-2中。

[1131] 19.如项7所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述容许环-2(A3-2)区域对应于天然成熟人因子VIII中SEQ ID NO:2的约氨基酸1900至约氨基酸1912的区域,并且其中所述至少一个XTEN插入A3-2中。

[1132] 20.如项5或8所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A1-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸17、SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸22、SEQ ID NO:2的氨基酸24、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸28、SEQ ID NO:2的氨基酸32、SEQ ID NO:2的氨基酸38、SEQ ID NO:2的氨基酸40和SEQ ID NO:2的氨基酸41。

[1133] 21.如项20所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A1-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸22、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸28、SEQ ID NO:2的氨基酸32和SEQ ID NO:2的氨基酸40。

[1134] 22.如项20或21所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A1-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸22、SEQ ID NO:2的氨基酸26和SEQ ID NO:2的氨基酸40。

[1135] 23.如项5或10所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A1-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸205、SEQ ID NO:2的氨基酸210、SEQ ID NO:2的氨基酸211、SEQ ID NO:2的氨基酸216、SEQ ID NO:2的氨基酸220、SEQ ID NO:2的氨基酸222、SEQ ID NO:2的氨基酸223、SEQ ID NO:2的氨基酸224和SEQ ID NO:2的氨基酸230。

[1136] 24.如项23所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A1-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸211、SEQ ID NO:2的氨基酸216、SEQ ID NO:2的氨基酸220和SEQ ID NO:2的氨基酸224。

[1137] 25.如项6或12所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A2-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID

NO:2的氨基酸405、SEQ ID NO:2的氨基酸409和SEQ ID NO:2的氨基酸416。

[1138] 26.如项25所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A2-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸409和SEQ ID NO:2的氨基酸416。

[1139] 27.如项26所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A2-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403和SEQ ID NO:2的氨基酸409。

[1140] 28.如项6或14所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A2-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸598、SEQ ID NO:2的氨基酸599、SEQ ID NO:2的氨基酸603和SEQ ID NO:2的氨基酸616。

[1141] 29.如项28所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A2-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸599和SEQ ID NO:2的氨基酸603。

[1142] 30.如项7或16所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A3-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸1711、SEQ ID NO:2的氨基酸1713、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1724、SEQ ID NO:2的氨基酸1725和SEQ ID NO:2的氨基酸1726。

[1143] 31.如项30所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A3-1内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸1711和SEQ ID NO:2的氨基酸1720。

[1144] 32.如项7或18所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A3-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸1896、SEQ ID NO:2的氨基酸1900、SEQ ID NO:2的氨基酸1904、SEQ ID NO:2的氨基酸1905和SEQ ID NO:2的氨基酸1910。

[1145] 33.如项32所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入A3-2内,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸1900、SEQ ID NO:2的氨基酸1904、SEQ ID NO:2的氨基酸1905和SEQ ID NO:2的氨基酸1910。

[1146] 34.如项33所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于SEQ ID NO:2的氨基酸1900的氨基酸下游插入A3-2内。

[1147] 35.如项1或2所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于在SEQ ID NO:2的氨基酸1656处的成熟天然人因子VIII的氨基酸的氨基酸的下游插入a3内。

[1148] 36.如项1或2所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在所述B结构域内。

[1149] 37.如项36所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于在SEQ ID NO:2的氨基酸740或745处的成熟天然人因子VIII的氨基酸的氨基酸下游插入。

[1150] 38.如项1或2所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN插入在所述C1结构域内或所述C2结构域内。

[1151] 39.如项1-38中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸2020、SEQ ID NO:2的氨基酸2044、SEQ ID NO:2的氨基酸2068、SEQ ID NO:2的氨基酸2073、SEQ ID NO:2的氨基酸2090、SEQ ID NO:2的氨基酸2092、SEQ ID NO:2的氨基酸2093、SEQ ID NO:2的氨基酸2111、SEQ ID NO:2的氨基酸2115、SEQ ID NO:2的氨基酸2120、SEQ ID NO:2的氨基酸2125、SEQ ID NO:2的氨基酸2171、SEQ ID NO:2的氨基酸2173、SEQ ID NO:2的氨基酸2188、SEQ ID NO:2的氨基酸2223、SEQ ID NO:2的氨基酸2224、SEQ ID NO:2的氨基酸2227、SEQ ID NO:2的氨基酸2268、SEQ ID NO:2的氨基酸2277、SEQ ID NO:2的氨基酸2278和SEQ ID NO:2的氨基酸2290。

[1152] 40.如项1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸22、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸28、SEQ ID NO:2的氨基酸32、SEQ ID NO:2的氨基酸40、SEQ ID NO:2的氨基酸211、SEQ ID NO:2的氨基酸216、SEQ ID NO:2的氨基酸220、SEQ ID NO:2的氨基酸224、SEQ ID NO:2的氨基酸333、SEQ ID NO:2的氨基酸336、SEQ ID NO:2的氨基酸339、SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸409、SEQ ID NO:2的氨基酸416、SEQ ID NO:2的氨基酸599、SEQ ID NO:2的氨基酸603、SEQ ID NO:2的氨基酸1711、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1796、SEQ ID NO:2的氨基酸1802、SEQ ID NO:2的氨基酸1900、SEQ ID NO:2的氨基酸1904、SEQ ID NO:2的氨基酸1905、SEQ ID NO:2的氨基酸1910、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸2068、SEQ ID NO:2的氨基酸2171、SEQ ID NO:2的氨基酸2227和SEQ ID NO:2的氨基酸2277。

[1153] 41.如项1所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18,22,24,26,28,32,38,40,41,60,61,65,81,111,116,119,120,128,129,130,182,185,188,205,210,211,216,220,222,223,224,230,243,244,250,318,333,334,336,339,345,357,367,370,375,376,378,399,403,405,409,416,434,438,441,442,463,487,490,492,493,494,500,506,518,556,565,566,598,599,603,616,686,713,719,730,733,745,1640,1652,1656,1685,1711,1713,1720,1724,1725,1726,1741,1744,1749,1773,1792,1793,1796,1798,1799,1802,1803,1807,1808,1827,1844,1861,1863,1896,1900,1904,1905,1910,1902,1937,1981,2019,2020,2044,2068,2073,2090,2092,2093,2111,2115,2120,2125,2171,2173,2188,2223,2224,2227,2268,2277,2278.2290.和2332。

[1154] 42.如项1-41中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其包含至少两个XTEN。

[1155] 43.如项42所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少两个XTEN紧靠对应于成

熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或两个氨基酸下游插入,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸40、SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸599、SEQ ID NO:2的氨基酸745、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1711、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1725、SEQ ID NO:2的氨基酸1900和SEQ ID NO:2的氨基酸1905。

[1156] 44.如项43所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少两个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1157] i.SEQ ID NO:2的氨基酸745和2332;

[1158] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和2332;

[1159] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和403;

[1160] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸40和403;

[1161] v.SEQ ID NO:2的氨基酸18和403;

[1162] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸26和599;

[1163] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和599;

[1164] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸18和599;

[1165] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1656;

[1166] x.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1656;

[1167] xi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1656;

[1168] xii.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1656;

[1169] xiii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1711;

[1170] xiv.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1711;

[1171] xv.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1720;

[1172] xvi.SEQ ID NO:2的氨基酸1659和1725;

[1173] xvii.SEQ ID NO:2的氨基酸1720和1900;

[1174] xviii.SEQ ID NO:2的氨基酸1725和1900;

[1175] xix.SEQ ID NO:2的氨基酸1711和1905;

[1176] xx.SEQ ID NO:2的氨基酸1720和1905;

[1177] xxi.SEQ ID NO:2的氨基酸1725和1905;

[1178] xxii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;

[1179] xxiii.SEQ ID NO:2的氨基酸18和399;

[1180] xxiv.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1711;

[1181] xxv.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1720;

[1182] xxvi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1720;

[1183] xxvii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1720;

[1184] xxviii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1720;

[1185] xxix.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1720;

[1186] xxx.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1725;

[1187] xxxi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1725;

[1188] xxxii.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1725;

[1189] xxxiii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1725;

[1190] xxxiv.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1725;

[1191] xxxv.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1900;

[1192] xxxvi.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1900;

[1193] xxxvii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1900;

[1194] xxxviii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1900;

[1195] xxxix.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1900;

[1196] xl.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1905;

[1197] xli.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1905;

[1198] xlii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1905;

[1199] xliii.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1905;

[1200] xliv.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1910;

[1201] xlv.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1910;

[1202] xlvi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;

[1203] xlvii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1656;

[1204] xlviii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1900;和

[1205] xlix.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1905。

[1206] 45.如项43或44所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少两个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1207] i.SEQ ID NO:2的氨基酸745和2332;

[1208] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和2332;

[1209] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和403;

[1210] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸40和403;

[1211] V.SEQ ID NO:2的氨基酸18和403;

[1212] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸26和599;

[1213] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和599;

[1214] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸18和599;

[1215] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1656;

[1216] x.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1656;

[1217] xi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1656;

[1218] xii.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1656;

[1219] xiii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1720;

[1220] xiv.SEQ ID NO:2的氨基酸1659和1725;

[1221] xv.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;

[1222] xvi.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1720;

[1223] xvii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1720;

[1224] xviii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1720;

[1225] xix.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1720;

[1226] xx.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1725;

[1227] xxi.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1900;

[1228] xxii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1900;

[1229] xxiii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1900;

[1230] xxiv.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1905;

[1231] xxv.SEQ ID NO:2的氨基酸18和399;

[1232] xxvi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;

[1233] xxvii.SEQ ID NO:2的氨基酸399和1656;

[1234] xxviii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1900;和

[1235] 46.xxix.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1905。如项43-45中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少两个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1236] i.SEQ ID NO:2的氨基酸745和2332;

[1237] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和2332;

[1238] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸26和403;

[1239] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸40和403;

[1240] v.SEQ ID NO:2的氨基酸18和403;

[1241] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸26和599;

[1242] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和599;

[1243] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸18和599;

[1244] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸18和1656;

[1245] x.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1656;

[1246] xi.SEQ ID NO:2的氨基酸40和1656;

[1247] xii.SEQ ID NO:2的氨基酸403和1656;

[1248] xiii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1720;

[1249] xiv.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;

[1250] xv.SEQ ID NO:2的氨基酸26和1900;

[1251] xvi.SEQ ID NO:2的氨基酸18和399;

[1252] xvii.SEQ ID NO:2的氨基酸40和399;和

[1253] xviii.SEQ ID NO:2的氨基酸1656和1900。

[1254] 47.如项1或2所述的重组因子VIII融合蛋白,其包含至少三个XTEN。

[1255] 48.如项47所述的重组因子VIII融合蛋白,其包含至少四个XTEN。

[1256] 49.如项48所述的重组因子VIII融合蛋白,其包含至少五个XTEN。

[1257] 50.如项49所述的重组因子VIII融合蛋白,其包含至少六个XTEN。

[1258] 51.如项47所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少三个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或多个氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸26、

SEQ ID NO:2的氨基酸40、SEQ ID NO:2的氨基酸399、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸599、SEQ ID NO:2的氨基酸745、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1711、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1725、SEQ ID NO:2的氨基酸1900、SEQ ID NO:2的氨基酸1905、SEQ ID NO:2的氨基酸1910和SEQ ID NO:2的氨基酸2332。

[1259] 52.如项51所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少三个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1260] i.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403和1656;

[1261] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403和1720;

[1262] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403和1900;

[1263] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1656和1720;

[1264] v.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1720和1900;

[1265] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656和1720;

[1266] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656和1900;

[1267] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1720和1900;

[1268] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸18、745和2332;

[1269] x.SEQ ID NO:2的氨基酸40、745和2332;

[1270] xi.SEQ ID NO:2的氨基酸26、745和2332;

[1271] xii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、745和2332;

[1272] xiii.SEQ ID NO:2的氨基酸399、745和2332;

[1273] xiv.SEQ ID NO:2的氨基酸1725、745和2332;

[1274] xv.SEQ ID NO:2的氨基酸1720、745和2332;

[1275] xvi.SEQ ID NO:2的氨基酸1711、745和2332;

[1276] xvii.SEQ ID NO:2的氨基酸1900、745和2332;

[1277] XV1ii.SEQ ID NO:2的氨基酸1905、745和2332;和

[1278] xix.SEQ ID NO:2的氨基酸1910、745和2332。

[1279] 53.如项51所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少三个XTEN紧靠对应于在SEQ ID NO:2的氨基酸26、1656和1900处的成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合。

[1280] 54.如项48所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少四个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或多个氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸40、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸409、SEQ ID NO:2的氨基酸745、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1900、SEQ ID NO:2的氨基酸1905、SEQ ID NO:2的氨基酸1910和SEQ ID NO:2的氨基酸2332。

[1281] 55.如项54所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少四个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或多个氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子

VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1720和SEQ ID NO:2的氨基酸1900。

[1282] 56.如项55所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少四个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1283] i.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403、1656和1720;

[1284] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403、1656和1900;

[1285] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、403、1720和1900;

[1286] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1656、1720和1900;

[1287] v.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656、1720和1900;

[1288] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸40、403、745和2332;

[1289] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、409、745和2332;

[1290] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸40、409、745和2332;

[1291] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸40、1720、745和2332;

[1292] x.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1720、745和2332;

[1293] xi.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1720、745和2332;

[1294] xii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1900、745和2332;

[1295] xiii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1900、745和2332;

[1296] xiv.SEQ ID NO:2的氨基酸40、1900、745和2332;

[1297] xv.SEQ ID NO:2的氨基酸40、1905、745和2332;

[1298] xvi.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1905、745和2332;

[1299] xvii.SEQ ID NO:2的氨基酸40、1905、745和2332;

[1300] xviii.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1905、745和2332;

[1301] xix.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1910、745和2332;

[1302] xx.SEQ ID NO:2的氨基酸40、1910、745和2332;

[1303] xxi.SEQ ID NO:2的氨基酸26、1910、745和2332;

[1304] xxii.SEQ ID NO:2的氨基酸409、1720、745和2332;

[1305] xxiii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1720、745和2332;

[1306] xxiv.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1900、745和2332;

[1307] xxv.SEQ ID NO:2的氨基酸409、1900、745和2332;

[1308] xxvi.SEQ ID NO:2的氨基酸409、1905、745和2332;

[1309] xxvii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1905、745和2332;

[1310] xxviii.SEQ ID NO:2的氨基酸409、1910、745和2332;

[1311] xxix.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1910、745和2332;

[1312] xxx.SEQ ID NO:2的氨基酸1720、1900、745和2332;

[1313] xxxi.SEQ ID NO:2的氨基酸1720、19005、745和2332;

[1314] xxxii.SEQ ID NO:2的氨基酸1720、1910、745和2332;

[1315] xxxiii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656、1720和2332;

[1316] xxxiv.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656、1900和2332;

[1317] xxxv.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1720、1900和2332;

[1318] xxxvi.SEQ ID NO:2的氨基酸1656、1720、1900和2332;

[1319] xxxvii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1656和2332;

[1320] xxxviii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1720和2332;

[1321] xxxix.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1900和2332;

[1322] x1.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1656、1720和2332;

[1323] xli.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1656、1900和2332;

[1324] xlii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1720、1900和2332;

[1325] xliii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、745和2332;

[1326] xliv.SEQ ID NO:2的氨基酸18、745、1720和2332;

[1327] xlv.SEQ ID NO:2的氨基酸18、745、1900和2332;

[1328] xlvi.SEQ ID NO:2的氨基酸403、745、1720和2332;

[1329] xlvii.SEQ ID NO:2的氨基酸403、745、1900和2332;和

[1330] xlviii.SEQ ID NO:2的氨基酸745、1720、1900和2332。

[1331] 57.如项49所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少五个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或多个氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸26、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸745、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1900和SEQ ID NO:2的氨基酸2332。

[1332] 58.如项57所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少五个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1333] i.SEQ ID NO:2的氨基酸403、1656、1720、1900和2332;

[1334] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1656、1720和2332;

[1335] iii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1656、1900和2332;

[1336] iv.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1720、1900和2332;

[1337] V.SEQ ID NO:2的氨基酸18、1656、1720、1900和2332;

[1338] vi.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、745、1720和2332;

[1339] vii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、745、1900和2332;

[1340] viii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、745、1720、1900和2332;和

[1341] ix.SEQ ID NO:2的氨基酸403、745、1720、1900和2332。

[1342] 59.如项50所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少六个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的一或多个氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:SEQ ID NO:2的氨基酸18、SEQ ID NO:2的氨基酸403、SEQ ID NO:2的氨基酸745、SEQ ID NO:2的氨基酸1656、SEQ ID NO:2的氨基酸1720、SEQ ID NO:2的氨基酸1900和SEQ ID NO:2的氨基酸2332。

[1343] 60.如项59所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少六个XTEN紧靠对应于成熟天然人因子VIII中的氨基酸的氨基酸下游插入或融合,所述成熟天然人因子VIII中的氨基酸选自由以下组成的组:

[1344] i.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、1656、1720、1900和2332;和

[1345] ii.SEQ ID NO:2的氨基酸18、403、745、1720、1900和2332。

[1346] 61.如项1-60中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN包含至少36个氨基酸、至少42个氨基酸、至少72个氨基酸、至少96个氨基酸、至少144个氨基酸或至少288个氨基酸。

[1347] 62.如项61所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN包含至少72个氨基酸、至少144个氨基酸或至少288个氨基酸。

[1348] 63.如项1-32中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN包含一或多个XTEN序列基序,其中所述一或多个XTEN序列基序选自由以下组成的组:SEQ ID NO:19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,和48。

[1349] 64.如项63所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述一或多个XTEN序列基序选自由以下组成的组:SEQ ID NO:23,24,25,和26。

[1350] 65.如项1-64中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN包含与选自由SEQ ID NO:49,50,51,52,57,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,78,和79组成的组的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[1351] 66.如项1-64中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个XTEN包含与选自由SEQ ID NO:279,281,283,385,287,289,291,293,295,297,299,301,303,305,307,309,311,313,315,317,319,321,323,325,327,329,331,333,335,337,339,341,343,345,347,349,和351组成的组的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

[1352] 67.如项1-66中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述因子VIII多肽包含天然因子VIII多肽。

[1353] 68.如项1-67中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述因子VIII多肽包含部分缺失的B结构域或全部缺失的B结构域。

[1354] 69.如项1-68中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述因子VIII多肽包含单链因子VIII多肽。

[1355] 70.如项1-69中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中对应于SEQ ID NO:2的氨基酸1648是甘氨酸或丙氨酸。

[1356] 71.如项1-70中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其进一步包含至少一个异源多肽。

[1357] 72.如项71所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源多肽插入在所述A1结构域、所述A2结构域、所述A3结构域、所述B结构域、所述a3结构域、所述C1结构域或所述C2结构域内,或者所述至少一个异源多肽融合至所述因子VIII多肽的C-末端。

[1358] 73.如项71或72所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源多肽或插入在所述A1结构域内、或插入在所述A2结构域内、或插入在所述A3结构域内、或插入在所述a3结构域内或其任意组合。

[1359] 74.如项71至73中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源多肽插入在所述B结构域内。

[1360] 75.如项71至74中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源

多肽或插入在所述C1结构域内、或插入在所述C2结构域内、或融合至所述C末端、或其任意组合。

[1361] 76.如项71至75中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源多肽是免疫球蛋白的Fc片段。

[1362] 77.如项71至75中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白,其中所述至少一个异源多肽选自由以下组成的组:白蛋白或其片段、人绒毛膜促性腺激素的C末端肽的β亚单位、HAP序列、转铁蛋白、PAS多肽、聚甘氨酸接头、聚丝氨酸接头及其组合。

[1363] 78.多核苷酸或多核苷酸组,其编码如项1-77中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白。

[1364] 79.如项78所述的多核苷酸或多核苷酸组,其包含与选自由以下组成的组的核酸序列具有至少约90%同一性的核酸序列:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1365] 80.如项79所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列与选自由以下组成

的组的核酸序列具有至少约95％同一性:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1366] 81.如项80所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列与选自由以下组成的组的核酸序列具有至少约96％同一性:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,

954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1367] 82.如项81所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列与选自由以下组成的组的核酸序列具有至少约97％同一性:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,

1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1368] 83.如项82所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列与选自由以下组成的组的核酸序列具有至少约98%同一性:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1369] 84.如项83所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列与选自由以下组成的组的核酸序列具有至少约99%同一性:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,

612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1000,1002,1004,1006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1370] 85.如项84所述的多核苷酸或多核苷酸组,其中所述核酸序列选自由以下组成的组:SEQ ID NO:596,598,600,602,604,606,608,610,612,614,616,618,620,622,624,626,628,630,632,634,636,638,640,642,644,646,648,650,652,654,656,658,660,662,664,666,668,670,672,674,676,678,680,682,684,686,688,690,692,694,696,698,700,702,704,706,708,710,712,714,716,718,720,722,724,726,728,730,732,734,736,738,740,742,744,746,748,750,752,754,756,758,760,762,764,766,768,770,772,774,776,778,780,782,784,786,788,790,792,794,796,798,800,802,804,806,808,810,812,814,816,818,820,822,824,826,828,830,832,834,836,838,840,842,844,846,848,850,852,854,856,858,860,862,864,866,868,870,872,874,876,878,880,882,884,886,888,890,892,894,896,898,900,902,904,906,908,910,912,914,916,918,920,922,924,926,928,930,932,934,936,938,940,942,944,946,948,950,952,954,956,958,960,962,964,966,968,970,972,974,976,978,980,982,984,986,988,990,992,994,996,998,1 000,1 002,1

004,1 006,1008,1010,1012,1014,1016,1018,1020,1022,1024,1026,1028,1030,1032,1034,1036,1038,1040,1042,1044,1046,1048,1050,1052,1054,1056,1058,1060,1062,1064,1066,1068,1070,1072,1074,1076,1078,1080,1082,1084,1086,1088,1090,1092,1094,1096,1098,1100,1102,1104,1106,1108,1110,1112,1114,1116,1118,1120,1122,1124,1126,1128,1130,1132,1134,1136,1138,1140,1142,1144,1146,1148,1150,1152,1154,1156,1158,1160,1162,1164,1166,1168,1170,1172,1174,1176,1178,1180,1182,1184,1186,1188,1190,1192,1194,1196,1198,1200,1202,1204,1206,1208,1210,1212,1214,1216,1218,1220,1222,1224,1226,1228,1230,1232,1234,1236,1238,1240,1242,1244,1246,1248,1250,1252,1254,1256,1258,1260,1262,1264,1266,1268,1270,1272,1274,1276,1278,1280,1282,1284,1286,1288,1290,1292,1294,1296,1298,1300,1302,1304,1306,1308,1310,1312,1314,1316,1318,1320,1322,1324,1326,1328,1330,1332,1334,1336,1338,1340,1342,1344,1346,1348,1350,1352,1354,1356,1358,1360,1362,1364,1366,1368,1370,1372,1374,1376,1378,1380,1382,1384,1386,1388,1390,1392,1394,1396,1398,1400,1402,1404,1406,1408,1410,1412,1414,1416,1418,1420,1422,1424,1426,1428,1430,1432,1434,1436,1438,1440,1442,1444,1446,1448,1450,1452,1454,1456,1458,1460,1462,1464,1466,1468,1470,1472,1474,1476,1478,1480,1482,1484,1486,和1488。

[1371] 86.载体或载体组,其包含如项78-85中任一项所述的多核苷酸或多核苷酸组。

[1372] 87.如项86所述的载体或载体组,其是质粒、粘粒、病毒粒子或噬菌体。

[1373] 88.如项86或87所述的载体或载体组,其是腺病毒载体或杆状病毒载体或自主复制载体。

[1374] 89.如项86-88中任一项所述的载体或载体组,其中所述多核苷酸或多核苷酸组可操作地连接于启动子、前导序列、终止子或增强子。

[1375] 90.一种宿主细胞,其包含如项78-85中任一项所述的多核苷酸或多核苷酸组。

[1376] 91.一种宿主细胞,其包含如项86-89中任一项所述的载体或载体组。

[1377] 92.如项90或91所述的宿主细胞,其中所述融合蛋白可以在体内表达。

[1378] 93.如项92所述的宿主细胞,其中所述表达的融合蛋白具有促凝血活性。

[1379] 94.一种药物组合物,其包含如项1至77中任一项所述的重组因子VIII融合蛋白和药学上可接受的载体。

[1380] 95.一种药物组合物,其包含如项78至85中任一项所述的多核苷酸或多核苷酸组、如项86-89中任一项所述的载体或载体组、或如项90-93中任一项所述的宿主细胞,和药学上可接受的载体。

[1381] 96.一种产生重组因子VIII融合蛋白的方法,其包括在合适的条件下在培养基中培养如项90-93中任一项所述的宿主细胞。

[1382] 97.如项96所述的方法,进一步包括从所述培养基分离所述重组因子VIII融合蛋白。

[1383] 98.如项94或95所述的药物组合物用于制备治疗凝血病变的药物的用途。

[1384] 99.如项98所述的用途,其中所述凝血病变是血友病A。

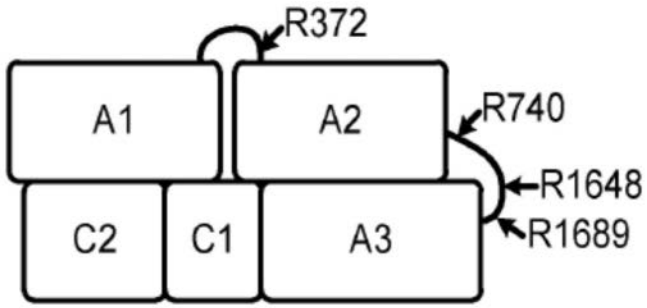
[1385] 100.如项98所述的用途,其中所述凝血病变创伤或手术或感染的结果。

[1386] 101.如项94或95所述的药物组合物用于制备治疗出血事件的药物的用途。

[1387] 102.如项94或95所述的药物组合物用于制备治疗血友病A的药物的用途。

图 1A

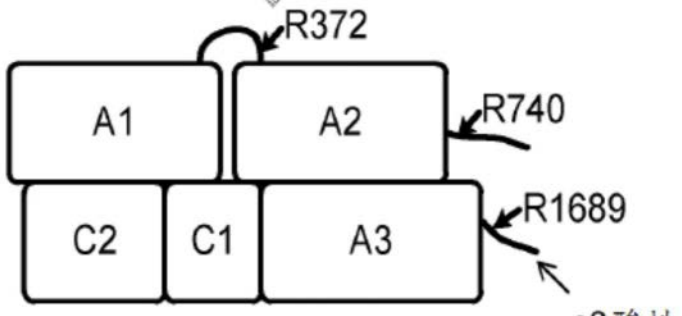
scFVIII



细胞内加工

图 1B

FVIII



凝结事件

图 1C

FVIIIa

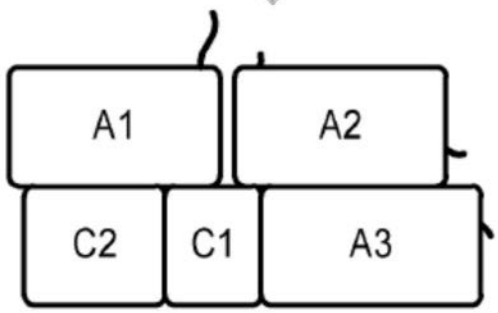


图1

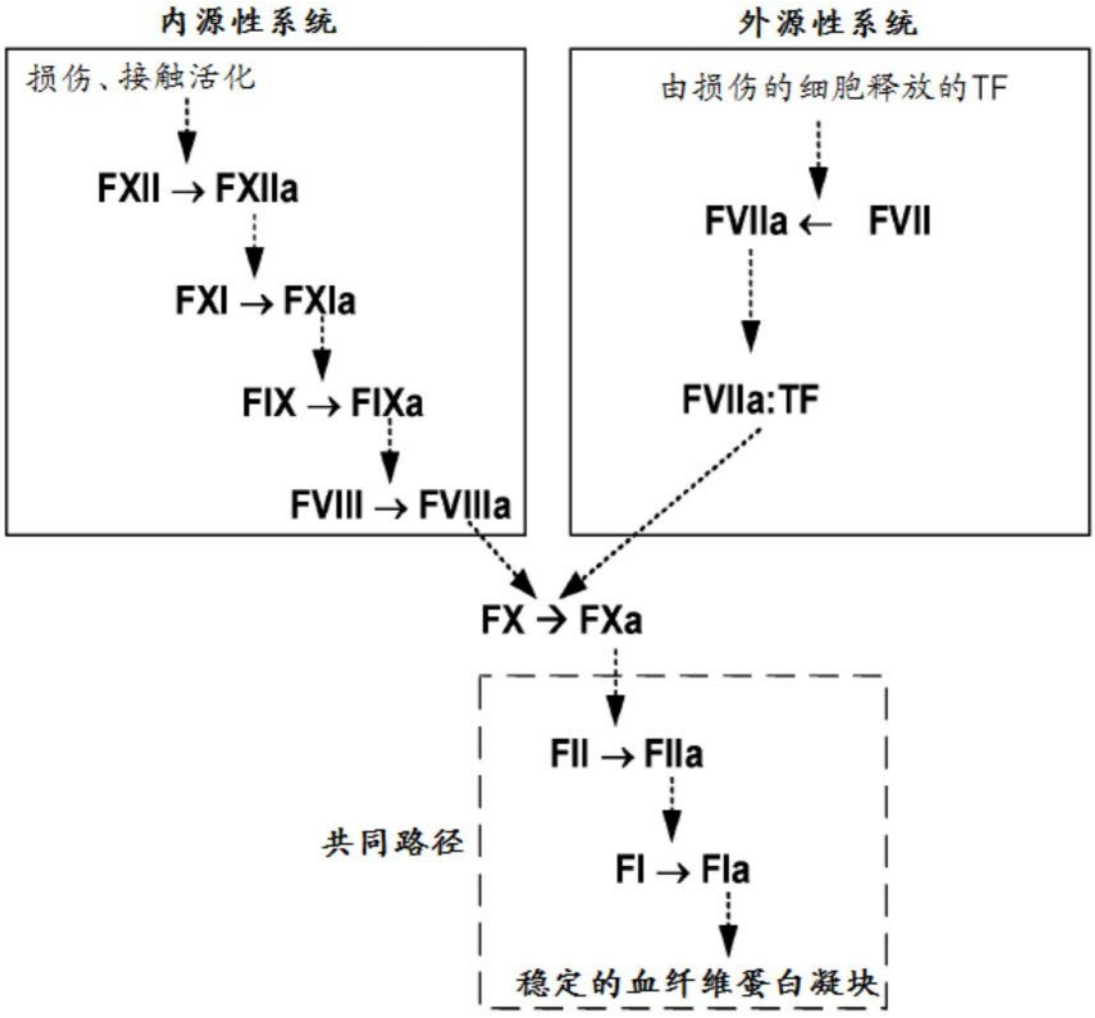

内源性系统
损伤、接触活化
FXII → FXIIa
FXI → FXIa
FIX → FIXa
FVIII → FVIIIa
外源性系统
由损伤的细胞释放的TF
FVIIa ← FVII
FVIIa:TF
FX → FXa
共同路径
FII → FIIa
FI → FIa
稳定的血纤维蛋白凝块

图2

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFN
IAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQ
REKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCR
EGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNR
SLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIG
RKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGI
TDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNME
RDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKH
KMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYE
DSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTPMP
KIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTHFRPQ
LHHSGDMVFTPESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDN
TSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDSKLLESGLMNSQESSW
GKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKDNALFKVSISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSL
LIENSPSVWQNILESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQQK
KEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEG
QNFLSEKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK
KETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVEGSYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR
TKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSKRALKQFRL
PLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSI
PQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKK
NNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSGKVELLPKVHI
YQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK
LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPEKTAFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKP
EIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIY
DEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTD
GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGA
EPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHT
NTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHA
INGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYP
GVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITAS
GQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSSLYISQ
FIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRS
TLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWR
PQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKV
KVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

图3

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLFV
EFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS
YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTY
SYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSW
HSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM
GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHI
SSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDN
SPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGP
QRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDTLLIIFKNQ
ASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG
PTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNQIMSDKRN
VILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDS
LQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGE
TVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISA
YLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKK
EDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGS
VPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ
ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEF
DCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI
FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM
AQDQRIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETV
EMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQIT
ASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGAR
QKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNP
PIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQ
GVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD
PPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

图4

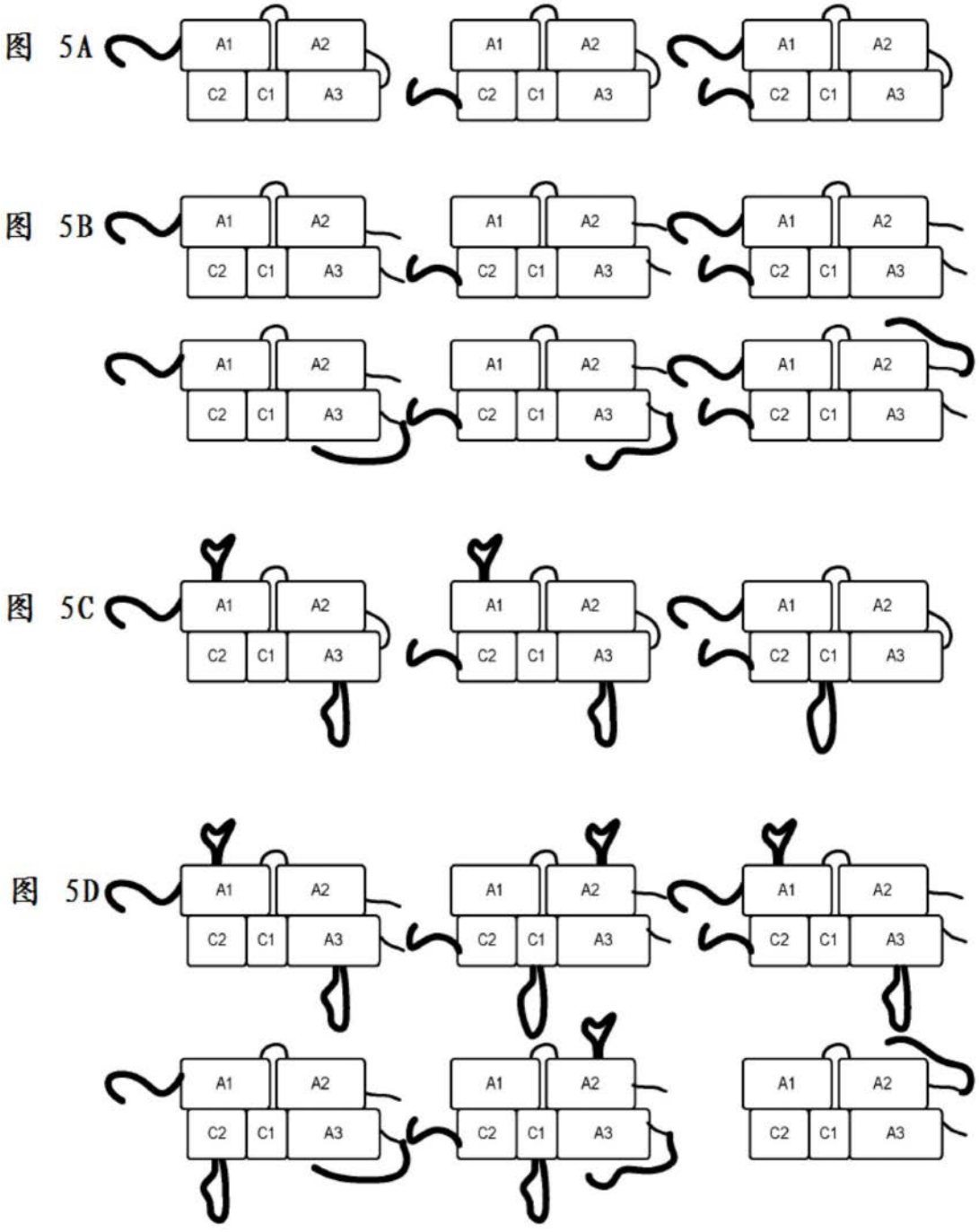


图5

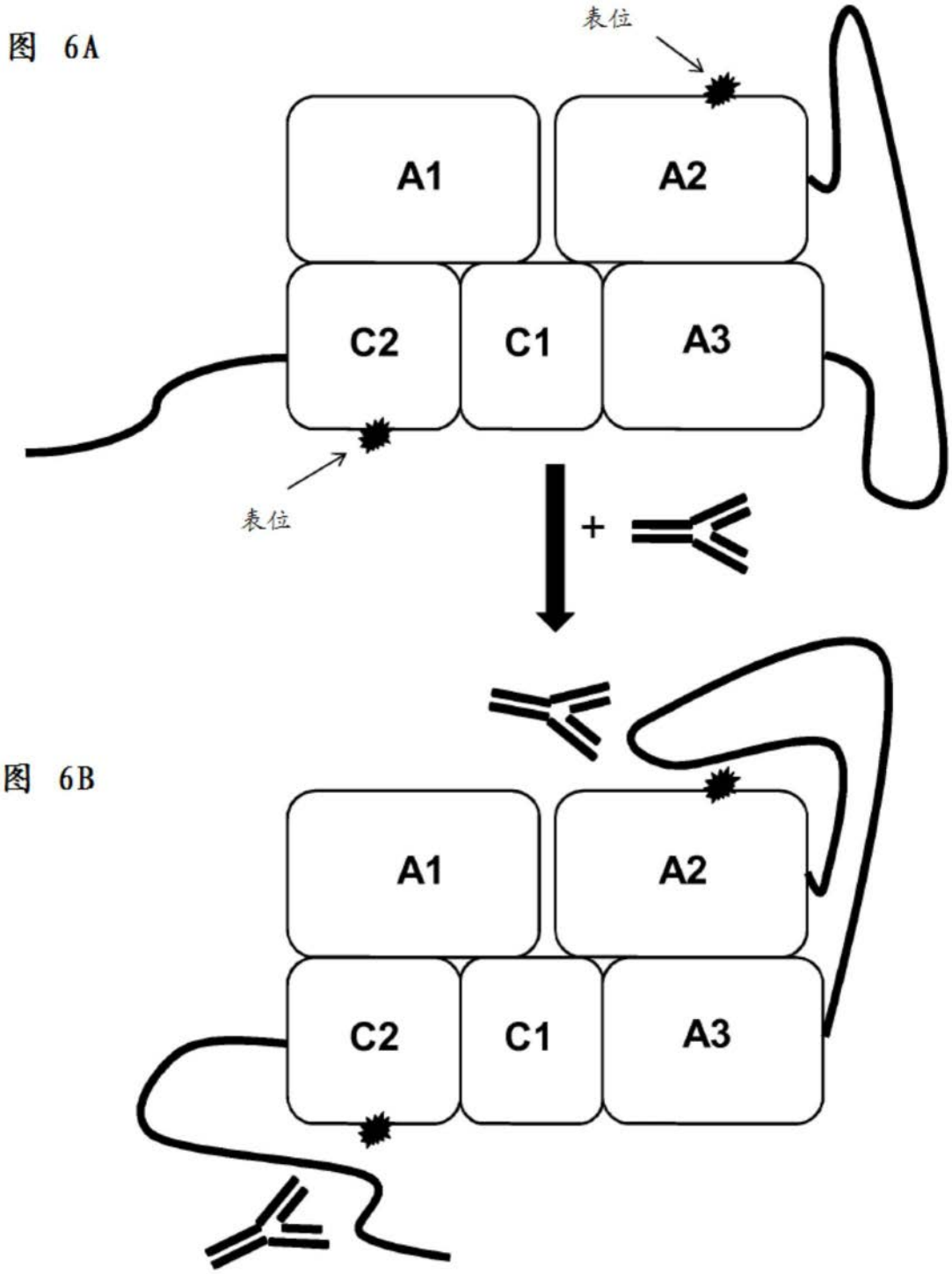


图6

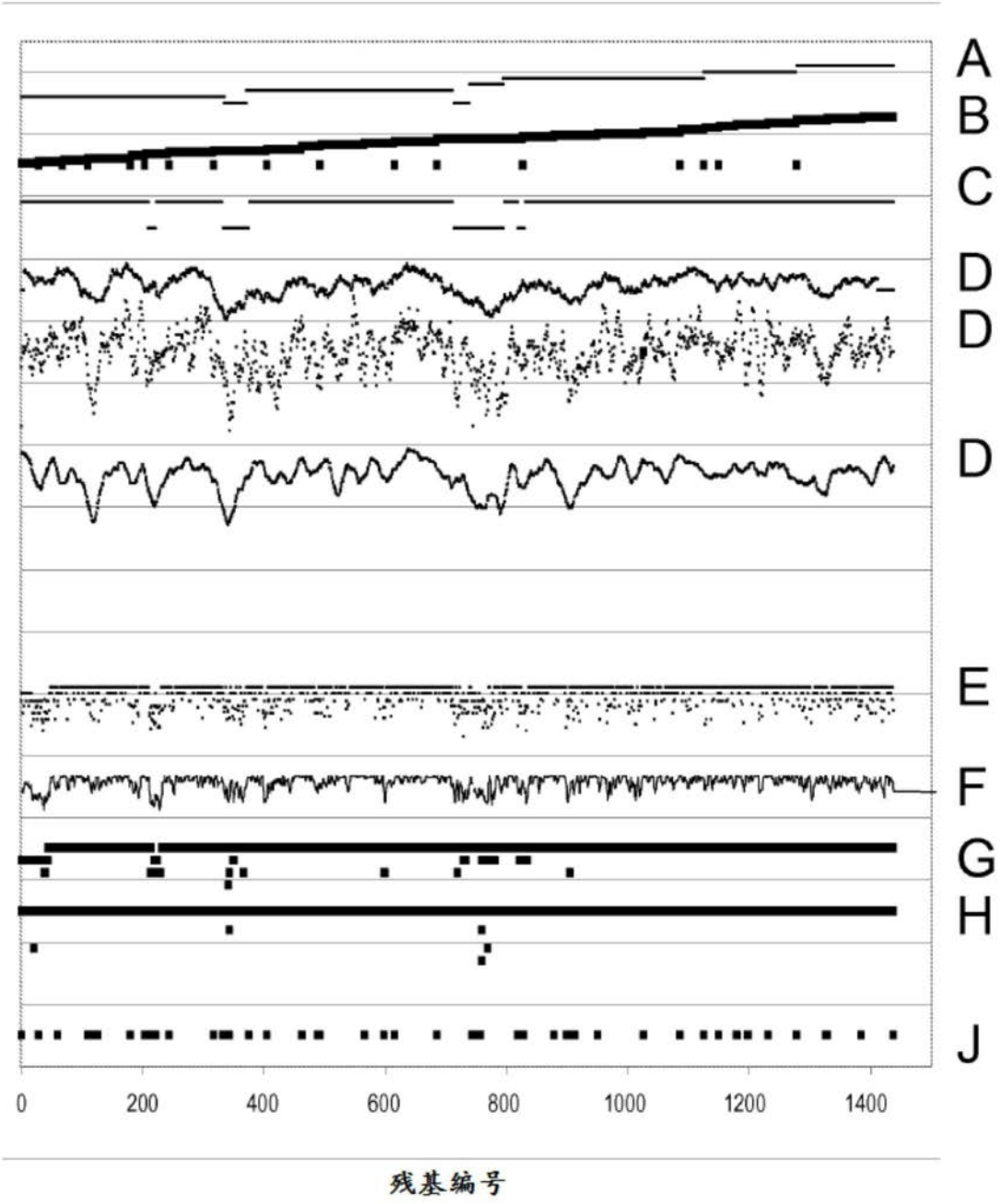


图7

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

图8

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTL
FVEFTVHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA
VGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD
PLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFA
VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHR
KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL
TDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL
APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILG
PLLYGEVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD
FPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSSFVNMERDLASGLIGP
LLICYKESVDQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG
VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS
VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNR
GMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSQNPPVLK
RHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKK
TRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFT
QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEE
DQRQGAEPRKNFVKPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLE
KDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTEN
MERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYL
LSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAG
IWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYG
QWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPI
IARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS
YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT
TQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVV
NSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

图9

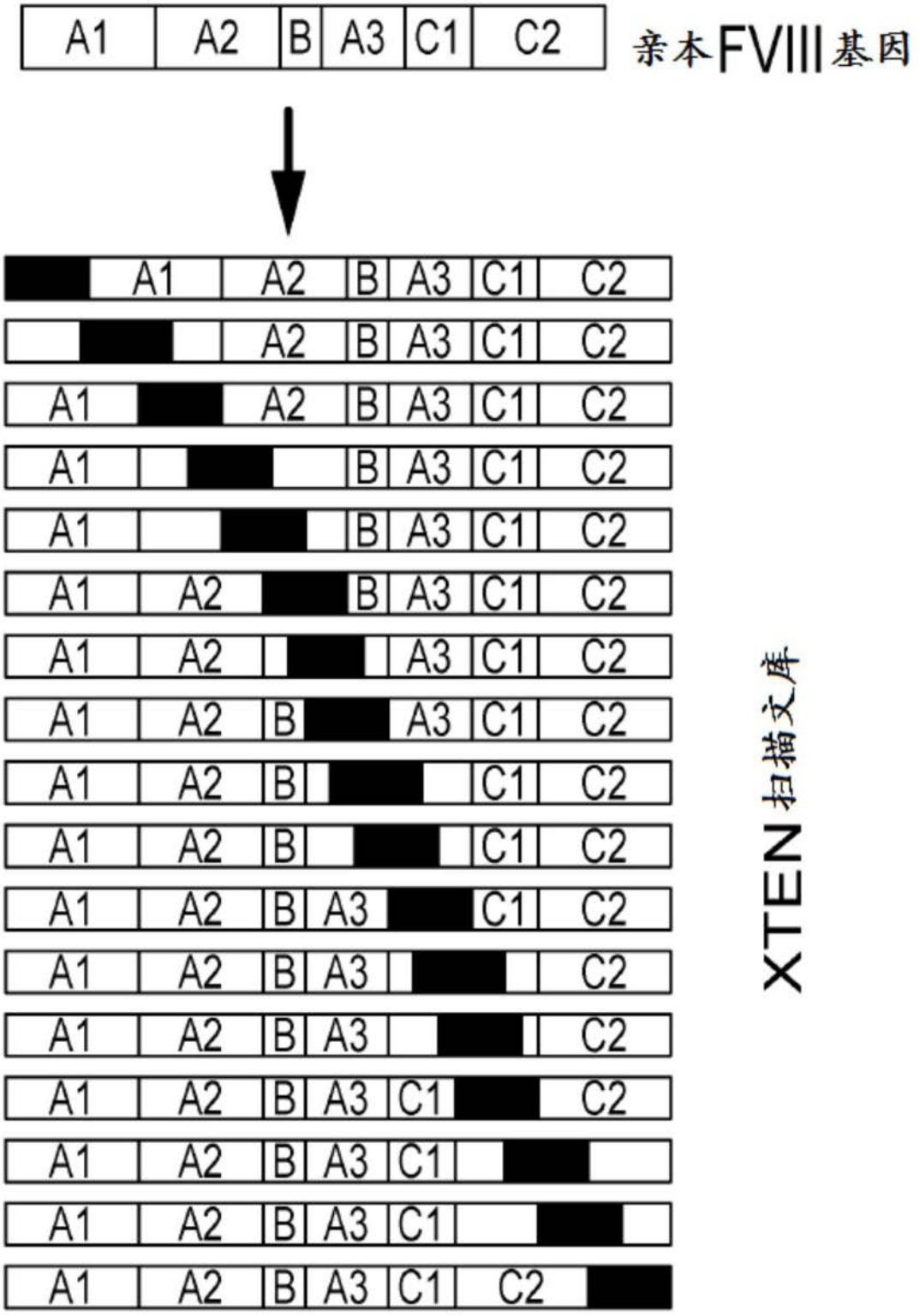


图10

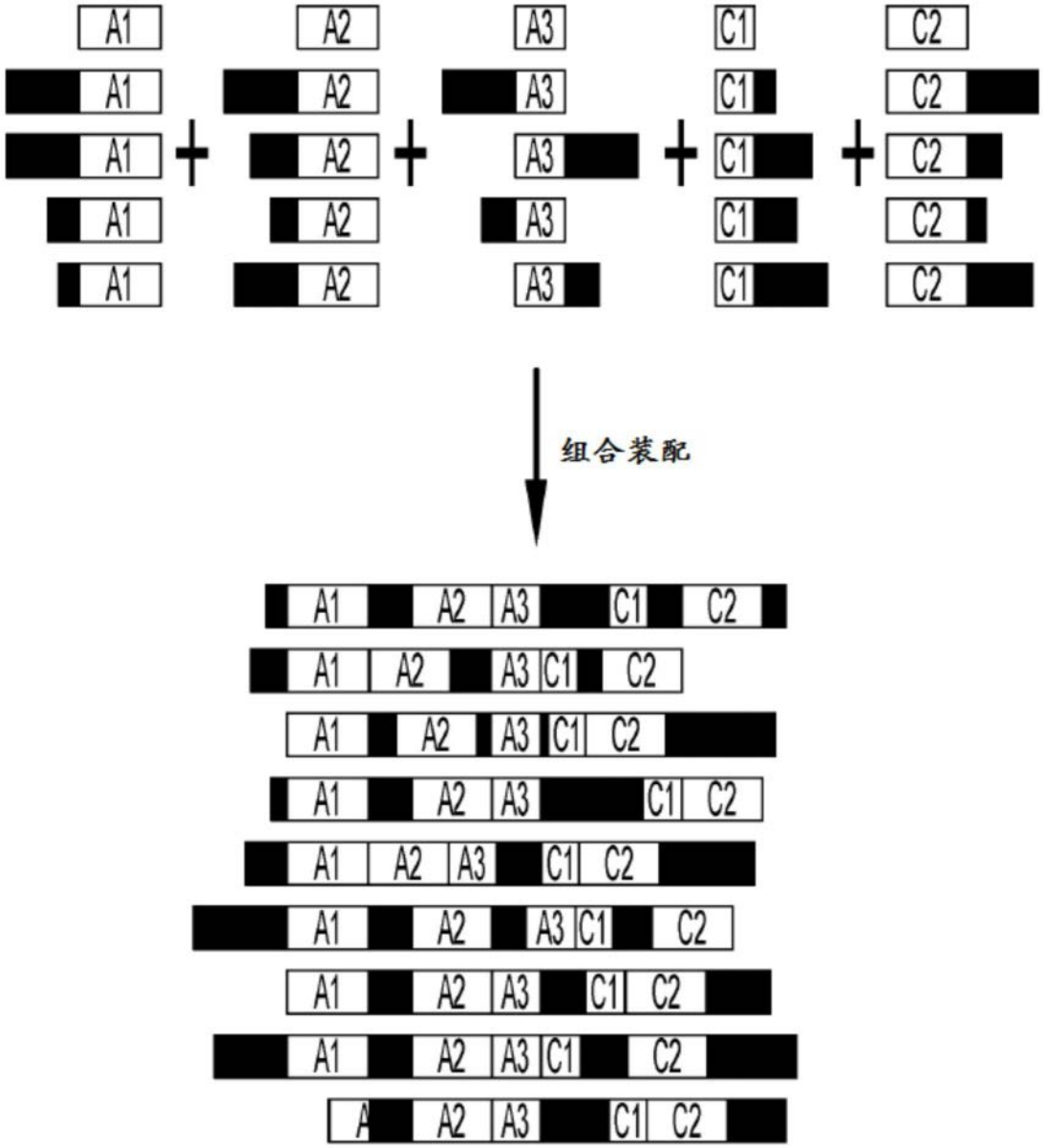


图11

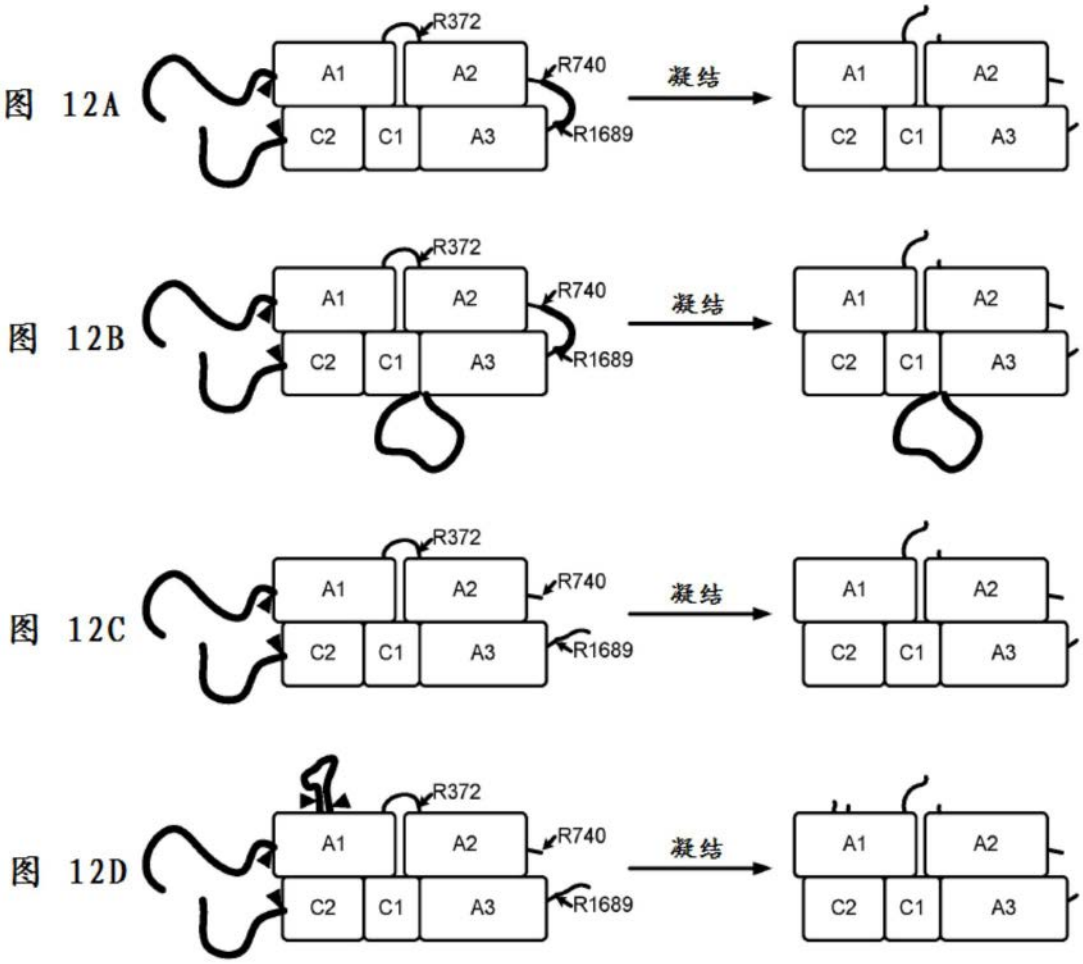


图12

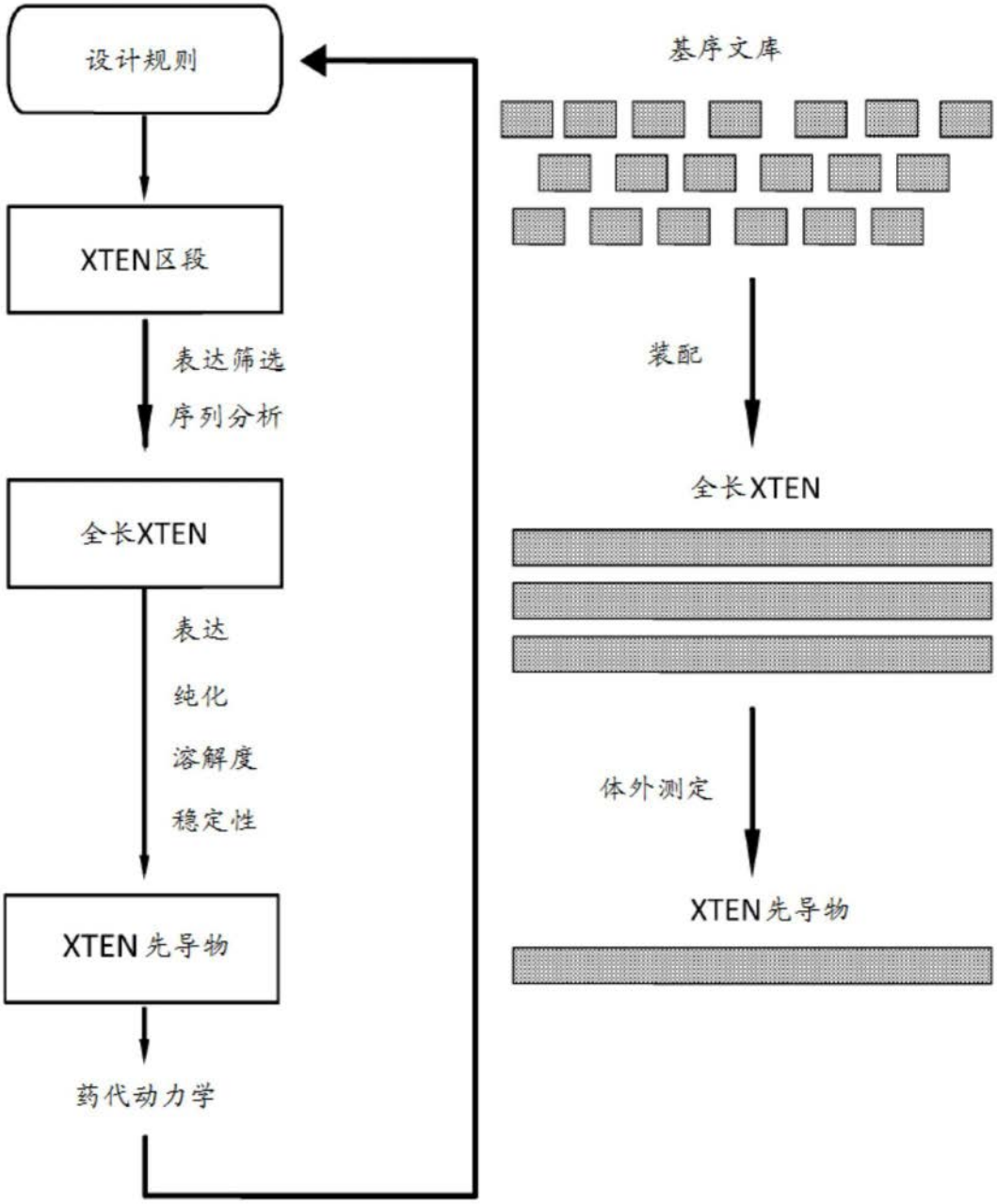

设计规则
XTEN区段
表达筛选
序列分析
全长XTEN
表达
纯化
溶解度
稳定性
XTEN先导物
药代动力学
基序文库
装配
全长XTEN
体外测定
XTEN先导物

图13

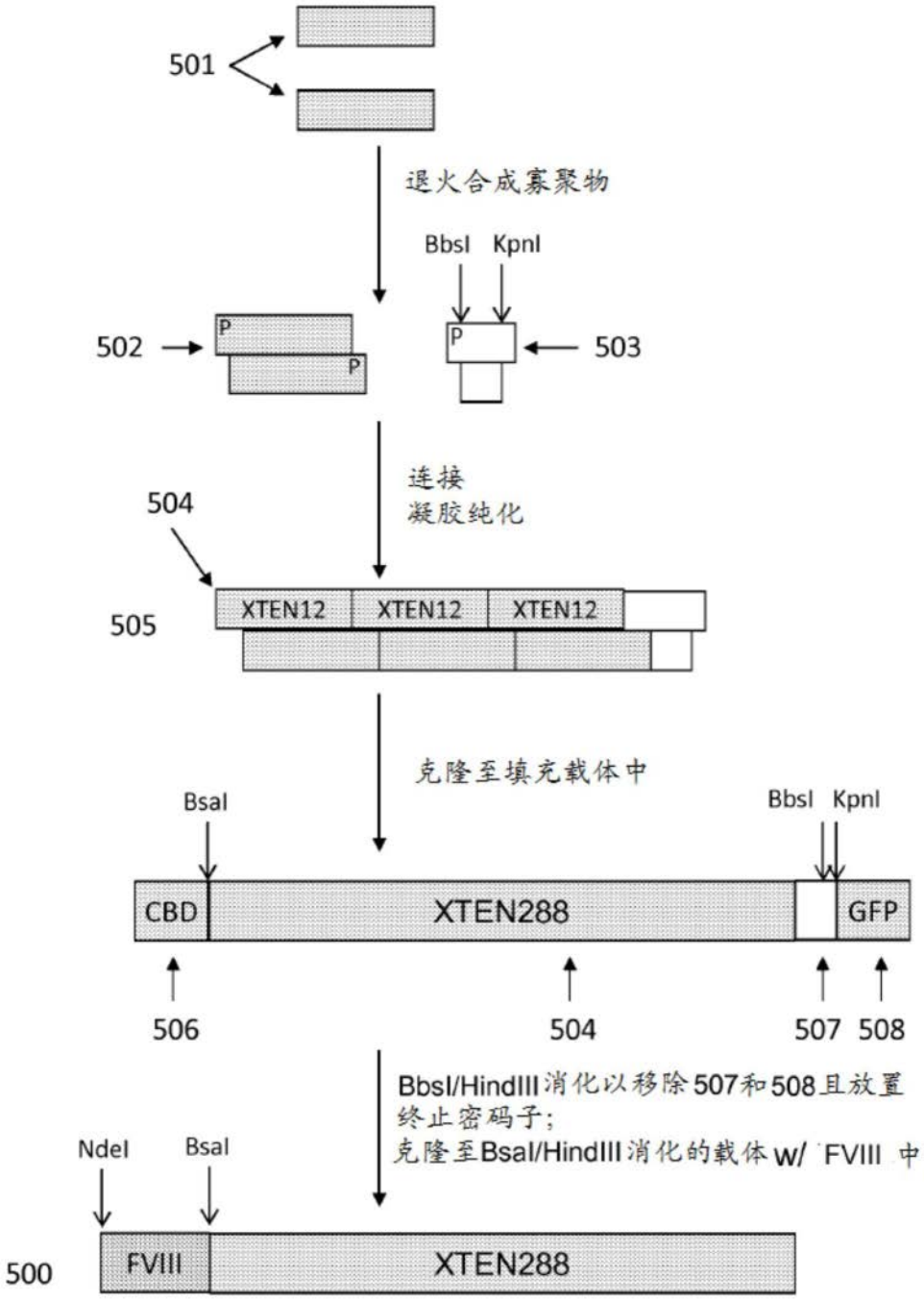

501
退火合成寡聚物
BbsI KpnI
502
P
P
P
503
连接
凝胶纯化
504
505
XTEN12
XTEN12
XTEN12
克隆至填充载体中
BsaI
BbsI KpnI
CBD
XTEN288
GFP
506
504
507 508
BbsI/HindIII消化以移除507和508且放置终止密码子;
克隆至BsaI/HindIII消化的载体w/ FVIII 中
NdeI
BsaI
500
FVIII
XTEN288

图14

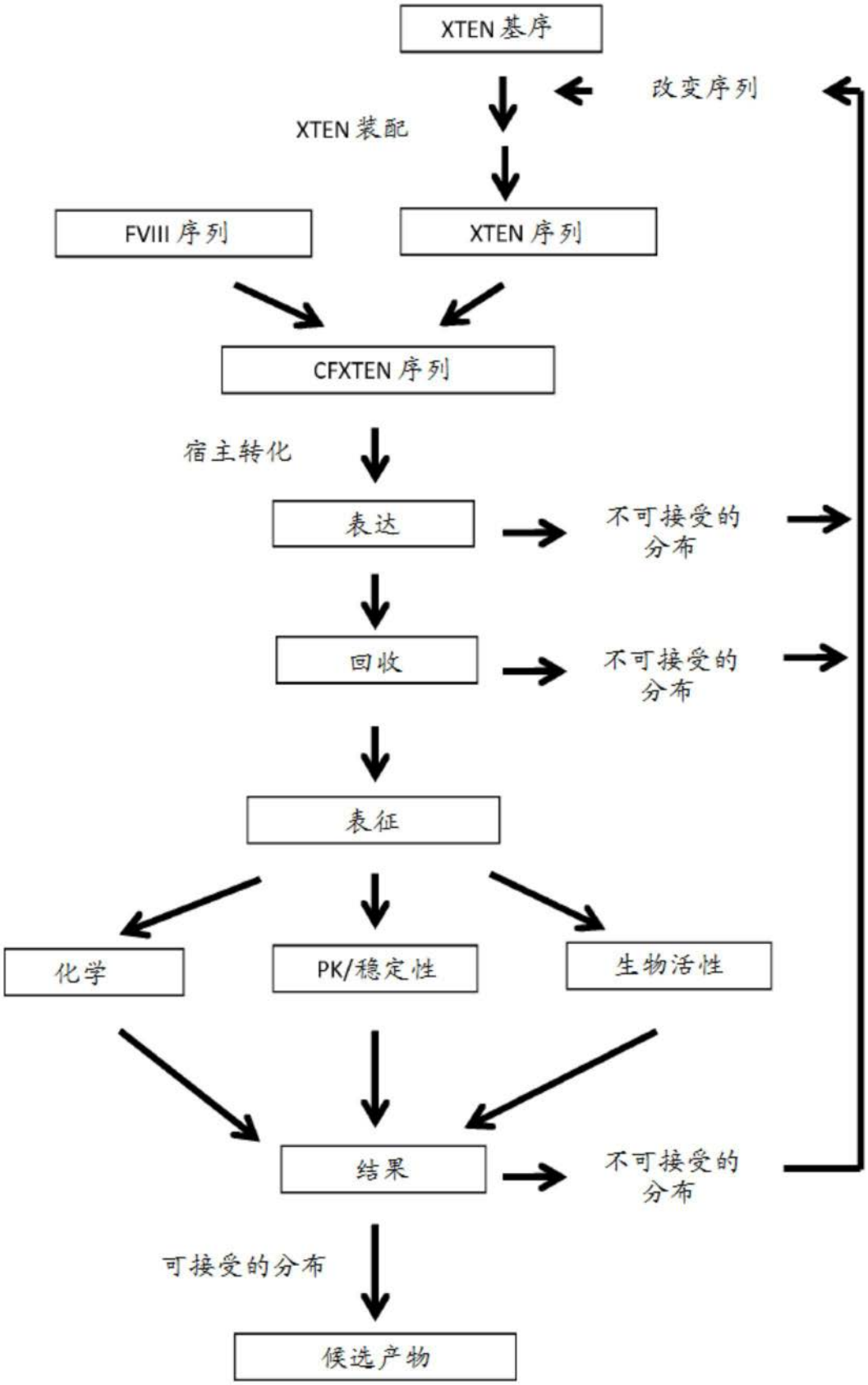

XTEN基序
改变序列
XTEN装配
FVIII序列
XTEN序列
CFXTEN序列
宿主转化
表达
不可接受的分布
回收
不可接受的分布
表征
化学
PK/稳定性
生物活性
结果
不可接受的分布
可接受的分布
候选产物

图15

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG576

PGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGATG
SPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTAS
SSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTA
SSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTPSG
ATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSTPS
GATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSST
PSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSS
TPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGS

图16A

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG288_1

PGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTA
SSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSSPS
ASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGS
SPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGA
TGS

图16B

AG864_2

GASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGS
PGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASS
SPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGASPGTSST
GSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGSSTPSGA
TGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGT
ASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSG
TASSSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGSSTPSGATGSPGSSTP
SGATGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGSST
PSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGAS
PGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGS
STPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPG
SSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSP
GSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGASPGTSSTGS
PGSSTPSGATGSPGSSPSASTGTGPGASPGTSSTGSPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASS
SPGSSTPSGATGSPGSSTPSGATGSPGASPGTSSTGSP

AG144_2

PGSSPSASTGTGPGSSPSASTGTGPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGSSPSAST
GTGPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSSPGSSTPSGATGSPGTPGSGTASSSPGASPG
TSSTGSPGASPGTSSTGSPGTPGSGTASSS

图16C

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE576

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGS
PTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTS
TEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGP
GSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTS
TEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPE
SGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEP
SEGSAP

图16D

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTST
EEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEG
SAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAG
SPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSP
AGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGS
EPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG
SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESG
PGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE288_2

GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPE
SGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESA
TPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTS
ESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEE
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEG
SAP

图16E

AE864

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPT
STEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEP
SEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEP
ATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGS
PAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP
GTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATP
ESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGS
PTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSE
SATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGT
STEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGP
GSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPES
GPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAP

AE144_1A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

AE144_2B

TSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPG

AE144_3A

SPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSA
PGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEG
SAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPG

AE144_4B

TSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESG
PGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

图16F

图 17A

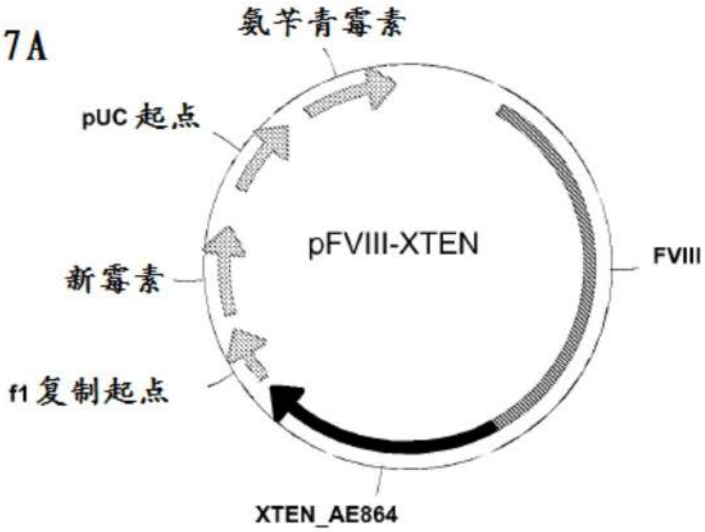


图 17B

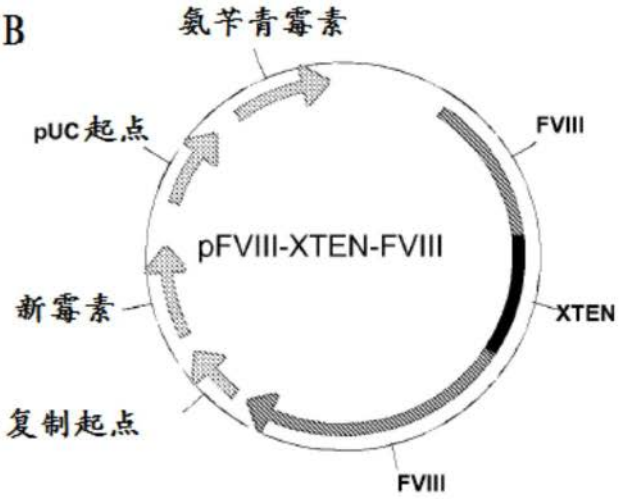


图 17C

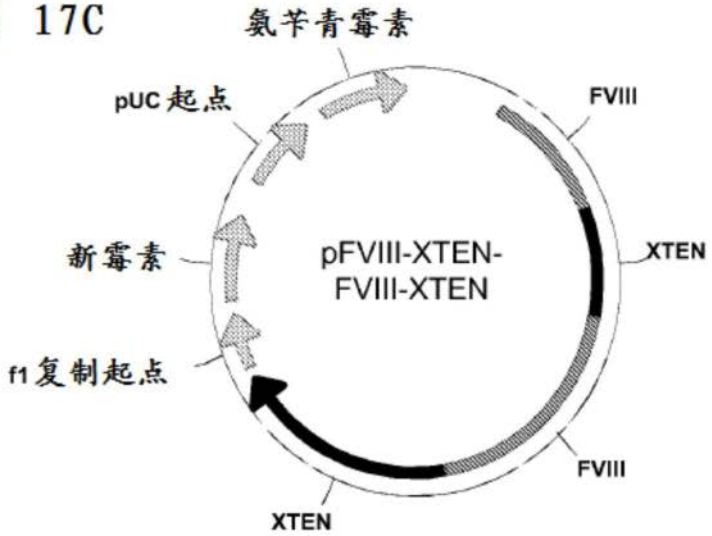


图17

Seg1_A Seg2_A Seg3_A Seg4_A Seg5_A Seg6_A
Seg1_B Seg2_B Seg3_B Seg4_B Seg5_B Seg6_B
Seg1_C Seg2_C Seg3_C Seg4_C Seg5_C Seg6_C
Seg1_D Seg2_D Seg3_D Seg4_D Seg5_D Seg6_D
片段收集
组合装配
Seg1_B Seg2_C Seg3_A Seg4_D Seg5_D Seg6_B
Seg1_C Seg2_A Seg3_C Seg4_C Seg5_D Seg6_A
Seg1_A Seg2_D Seg3_B Seg4_B Seg5_B Seg6_D
Seg1_C Seg2_B Seg3_D Seg4_B Seg5_A Seg6_B
Seg1_D Seg2_C Seg3_B Seg4_C Seg5_C Seg6_C
Seg1_B Seg2_B Seg3_D Seg4_A Seg5_B Seg6_A
XTEN基因的文库

图18

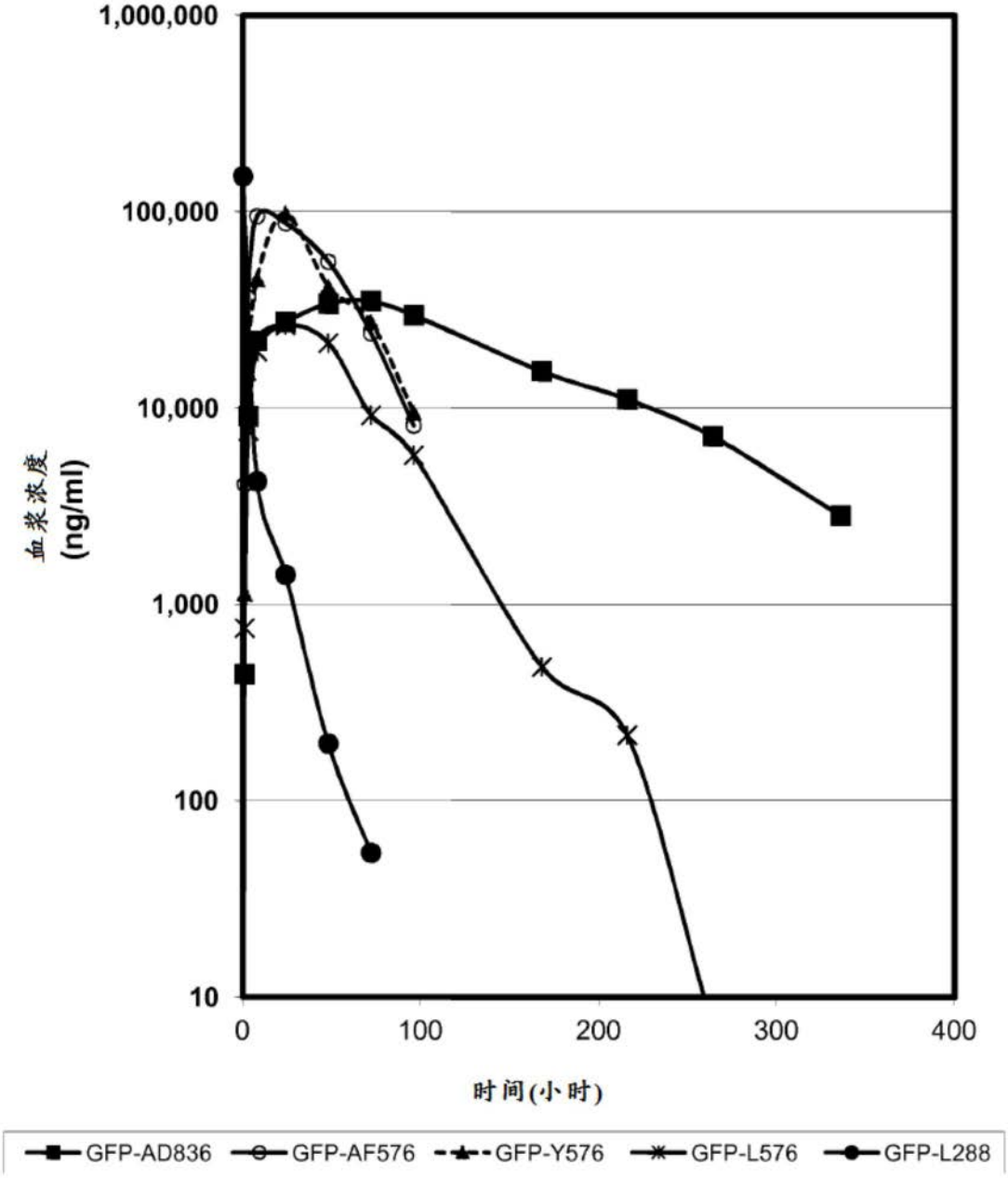

1,000,000
100,000
10,000
1,000
100
10
血浆浓度 (ng/ml)
0
100
200
300
400
时间(小时)
GFP-AD836
GFP-AF576
GFP-Y576
GFP-L576
GFP-L288

图19

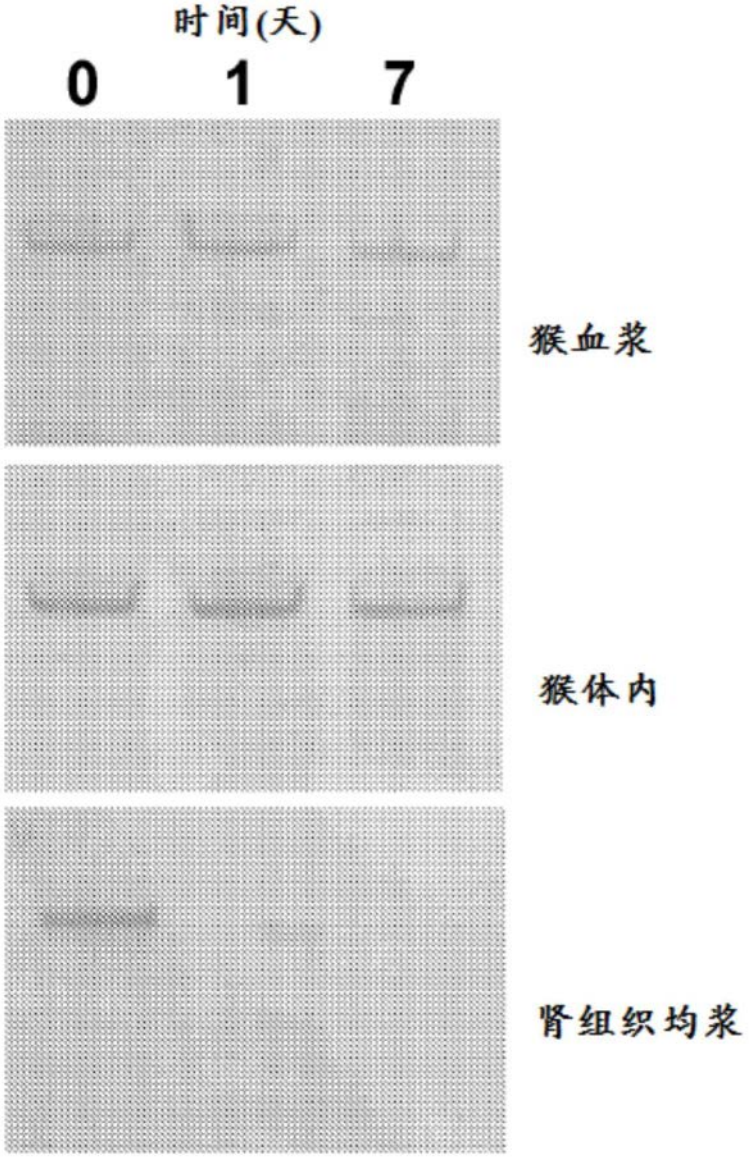


图20

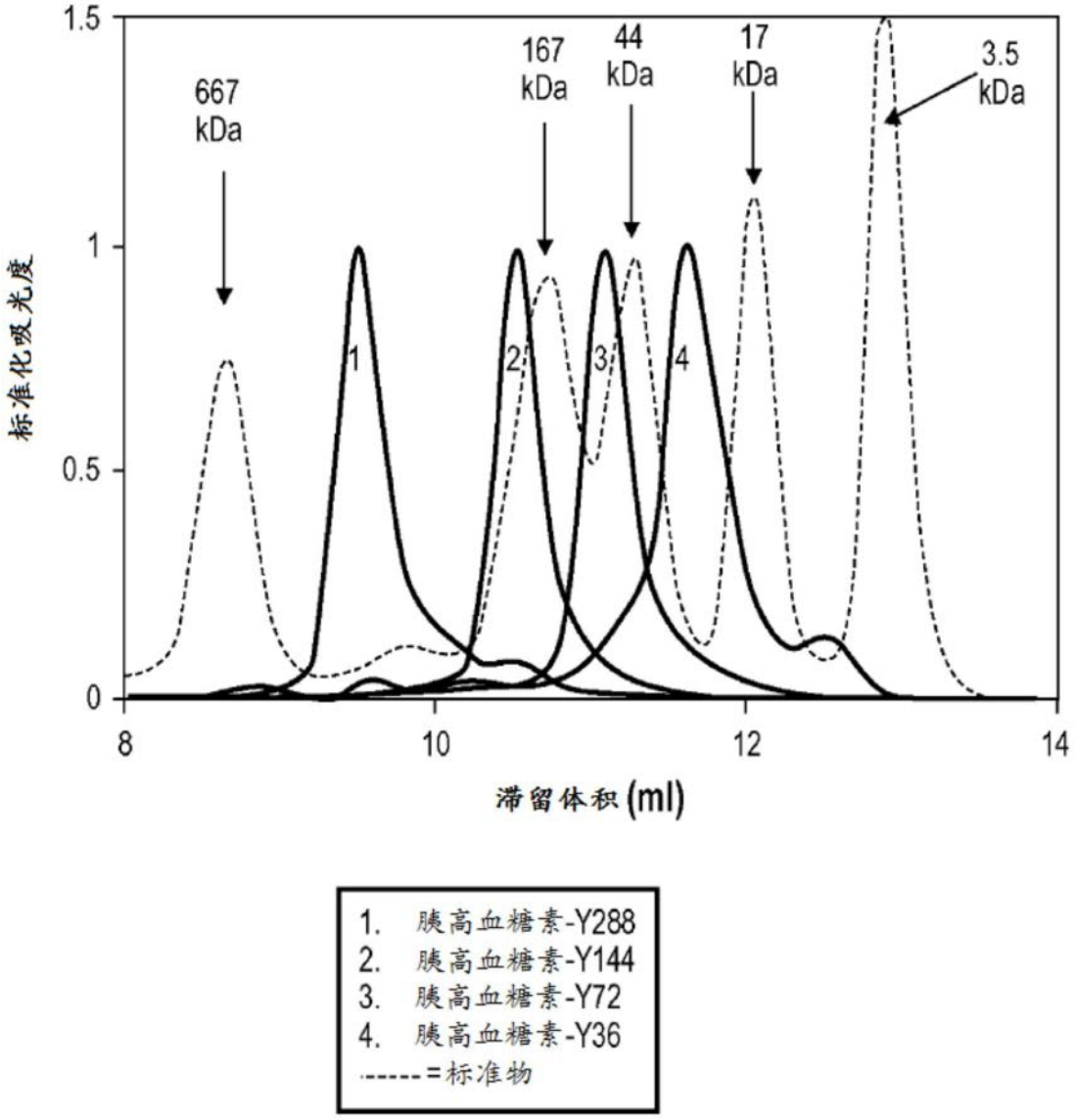

1.5
1
0.5
0
8
10
12
14
标准化吸光度
滞留体积 (ml)
667 kDa
167 kDa
44 kDa
17 kDa
3.5 kDa
1
2
3
4
1. 胰高血糖素-Y288
2. 胰高血糖素-Y144
3. 胰高血糖素-Y72
4. 胰高血糖素-Y36
-----=标准物

图21

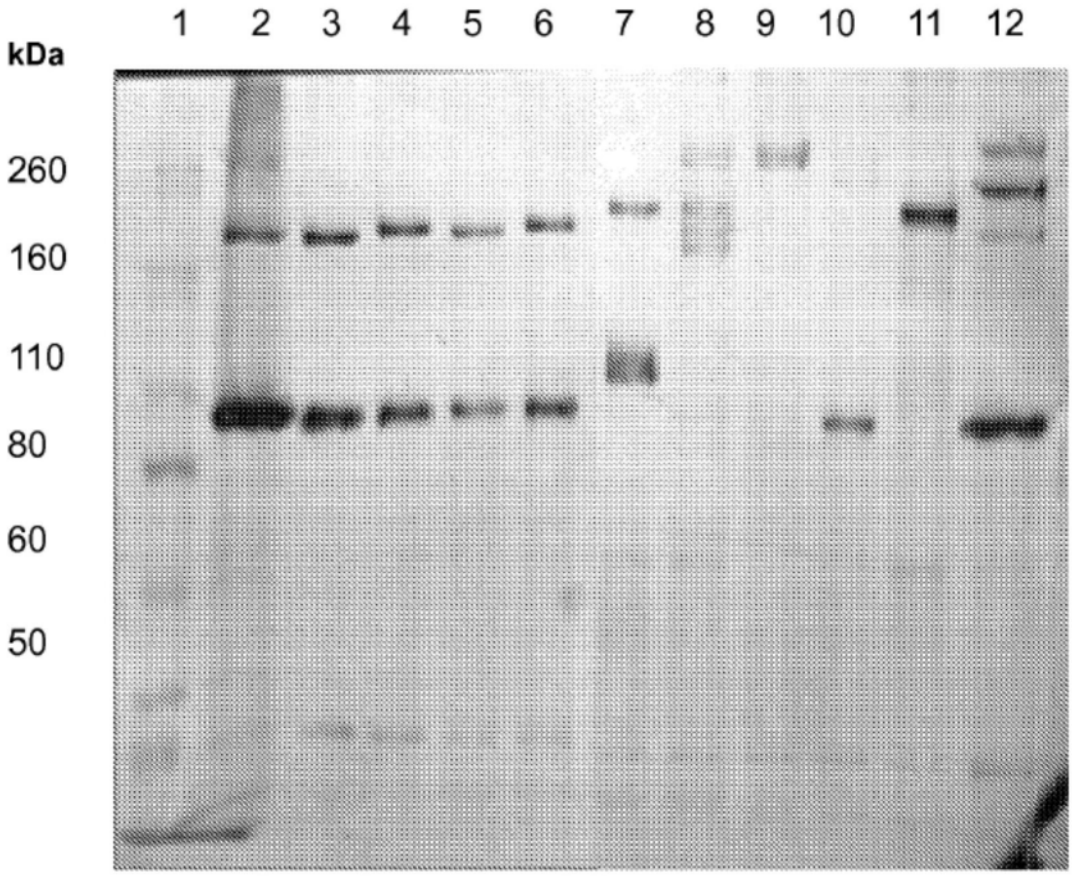


图22

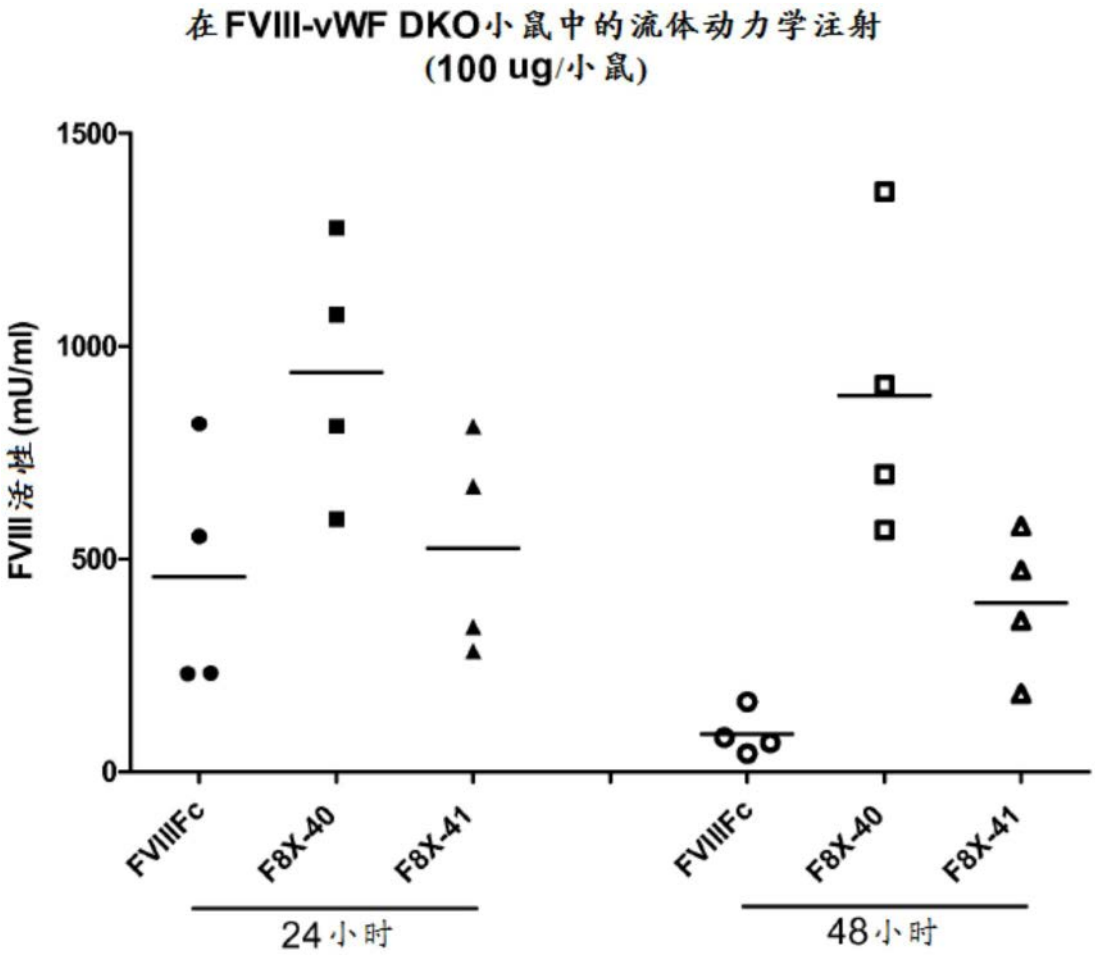

在FVIII-vWF DKO小鼠中的流体动力学注射
(100 ug/小鼠)
FVIII活性 (mU/ml)
1500
1000
500
0
FVIIIFc
F8X-40
F8X-41
FVIIIFc
F8X-40
F8X-41
24小时
48小时

图23

图 24A

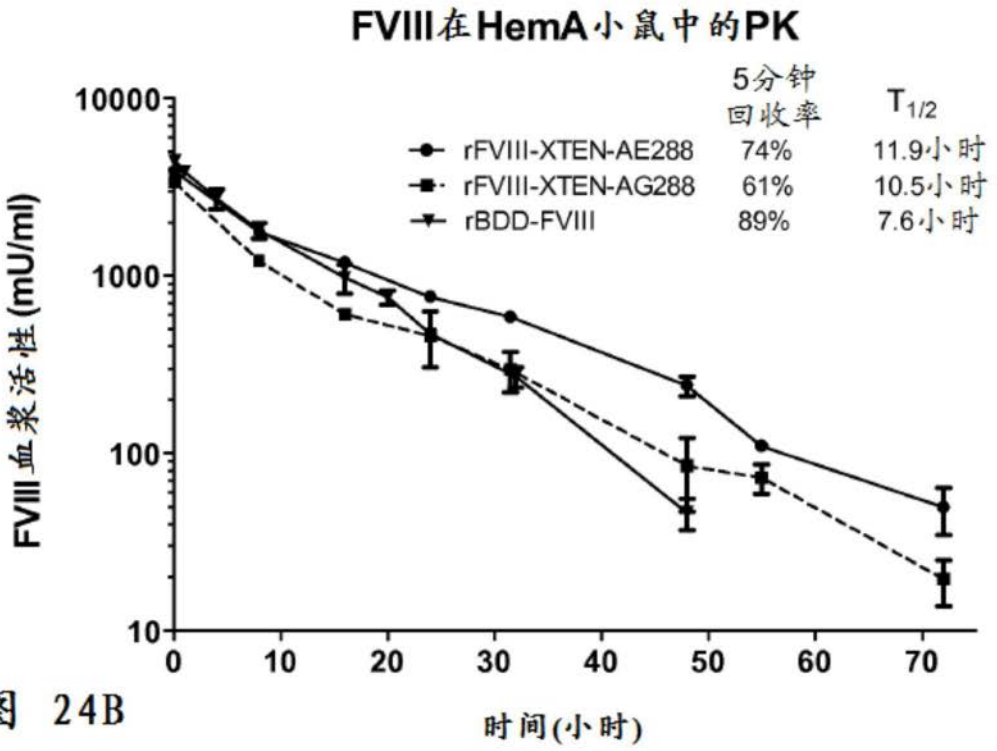


图 24B

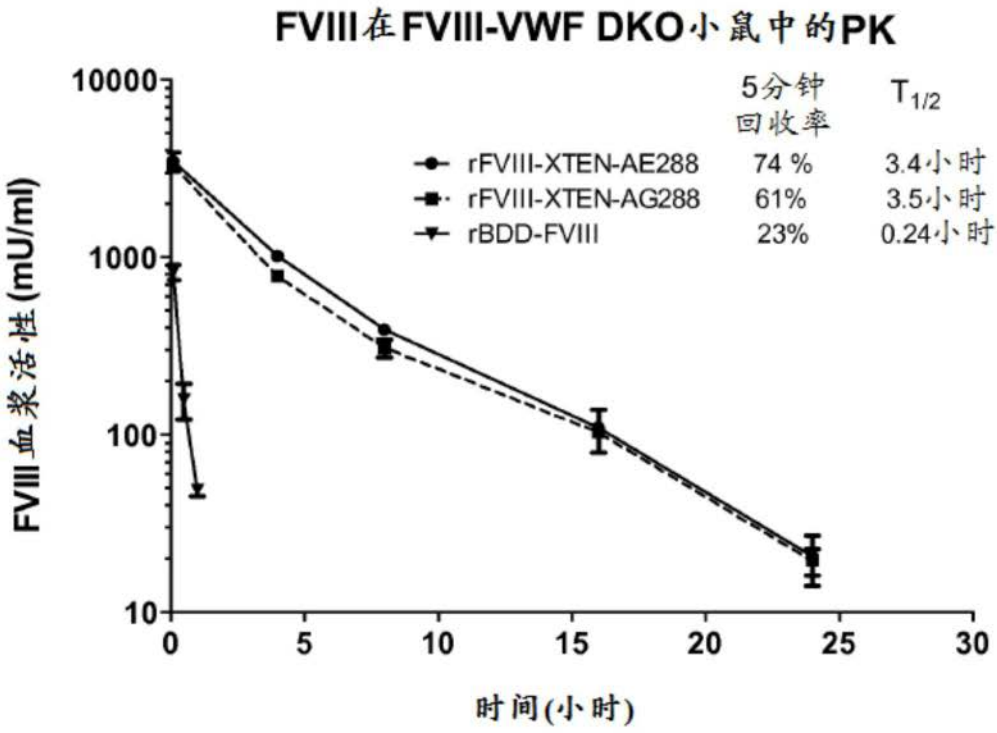


图24

图 25A

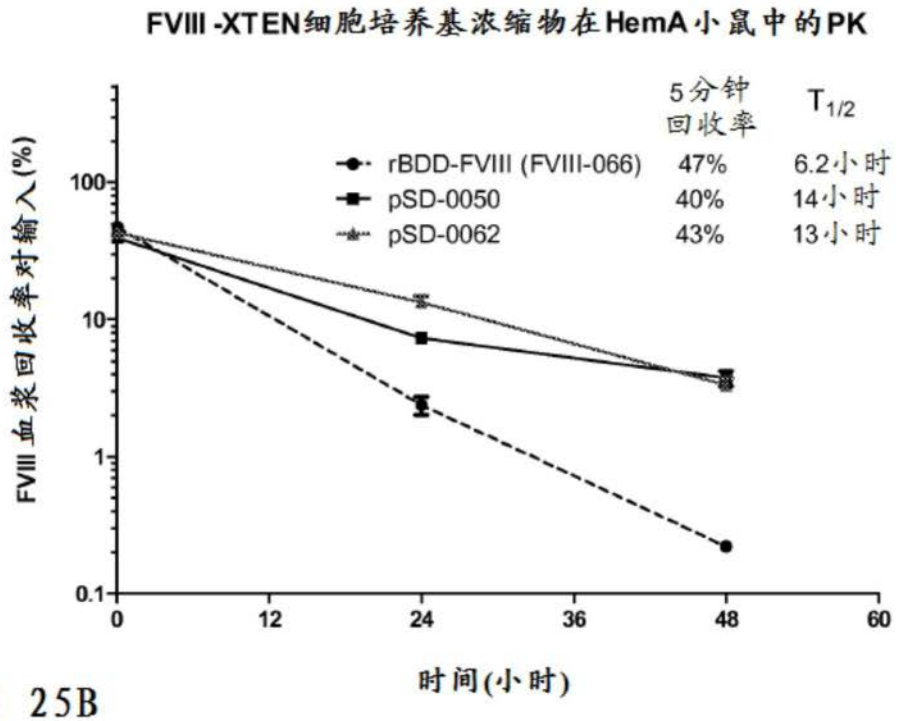


图 25B

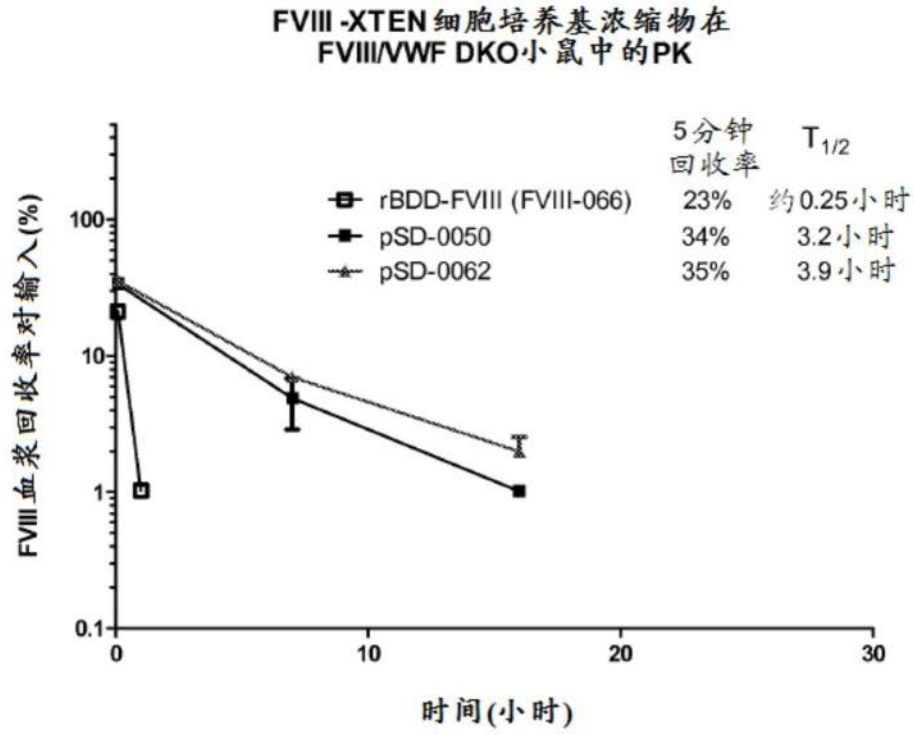


图25

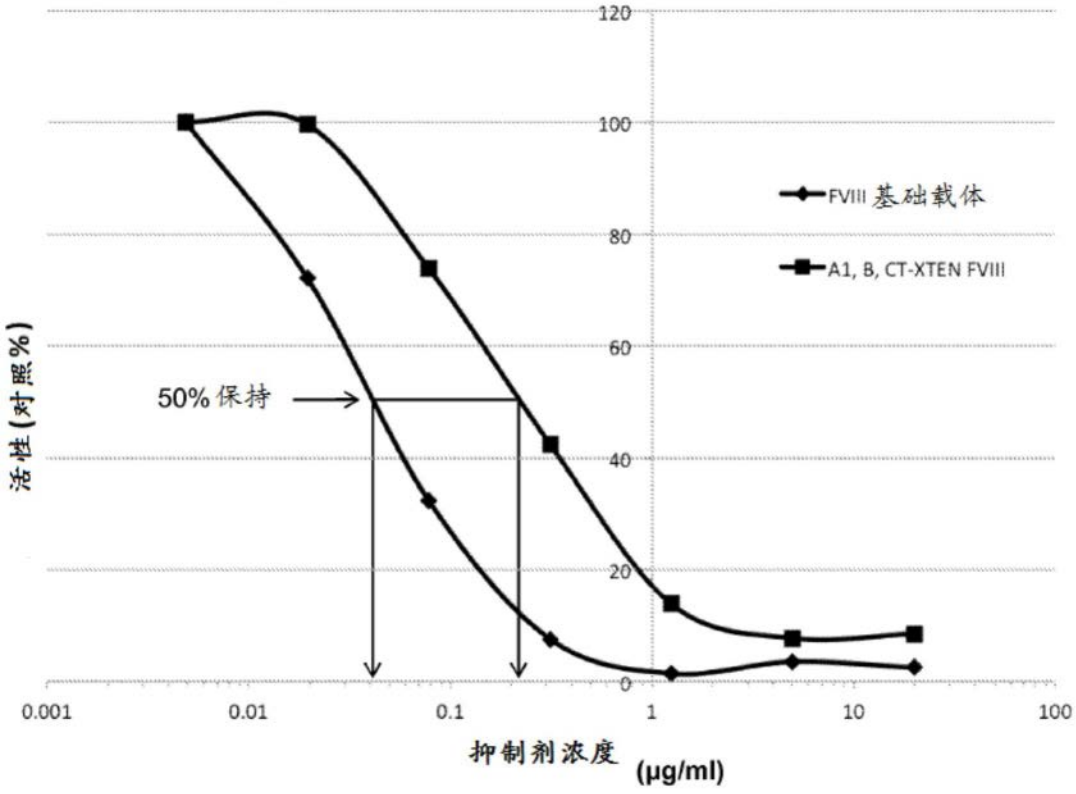

120
100
80
60
40
20
0
FVIII 基础载体
A1, B, CT-XTEN FVIII
50% 保持
活性(对照%)
0.001
0.01
0.1
1
10
100
抑制剂浓度 (μg/ml)

图26

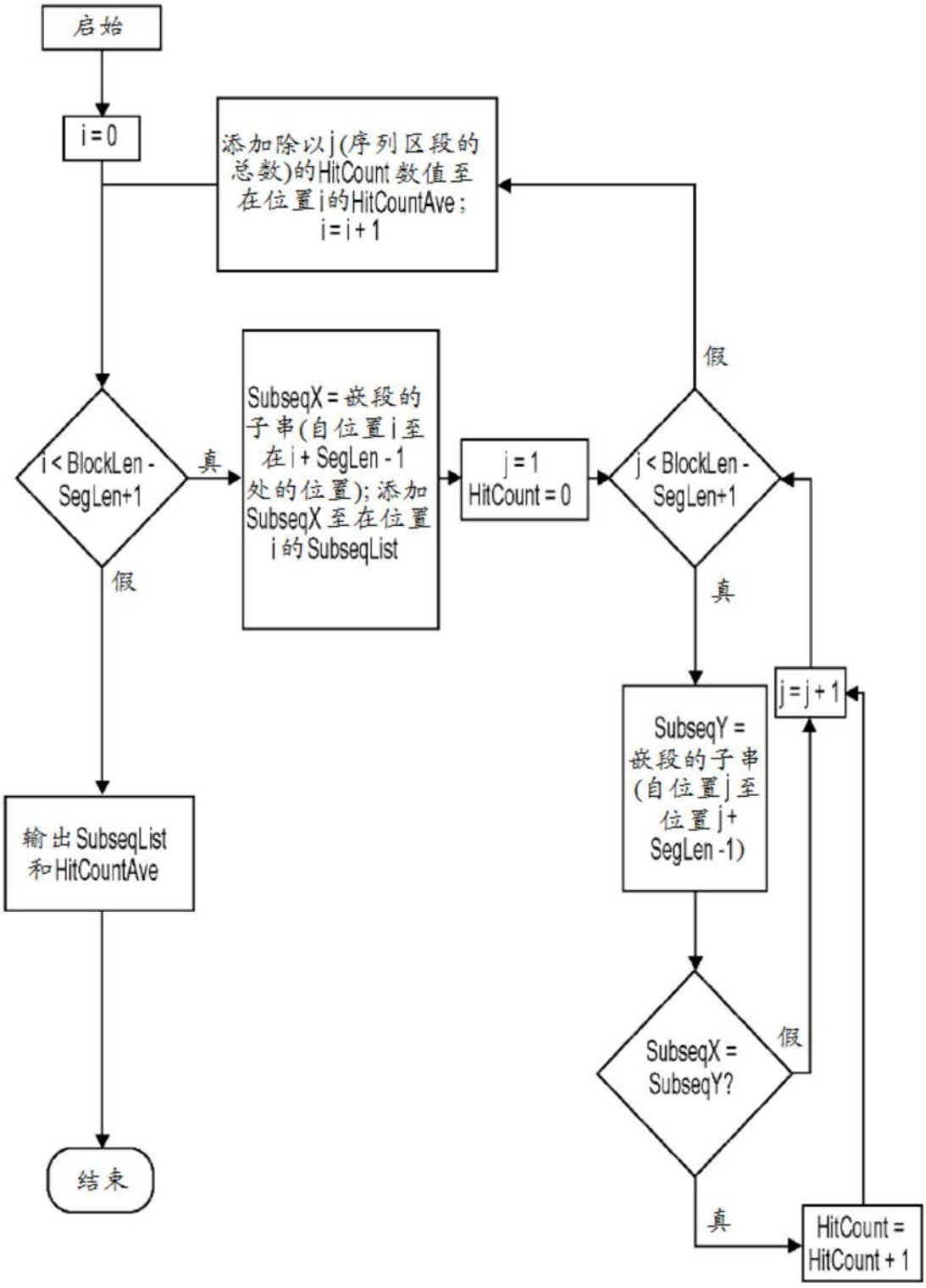

启始
i = 0
添加除以j(序列区段的总数)的HitCount数值至在位置i的HitCountAve；i = i + 1
i < BlockLen - SegLen+1
真
假
SubseqX = 嵌段的子串(自位置i至在i + SegLen - 1处的位置)；添加SubseqX至在位置i的SubseqList
j = 1 HitCount = 0
j < BlockLen - SegLen+1
假
真
SubseqY = 嵌段的子串(自位置j至位置j+SegLen -1)
SubseqX = SubseqY?
假
真
HitCount = HitCount + 1
j = j + 1
输出SubseqList和HitCountAve
结束

图27

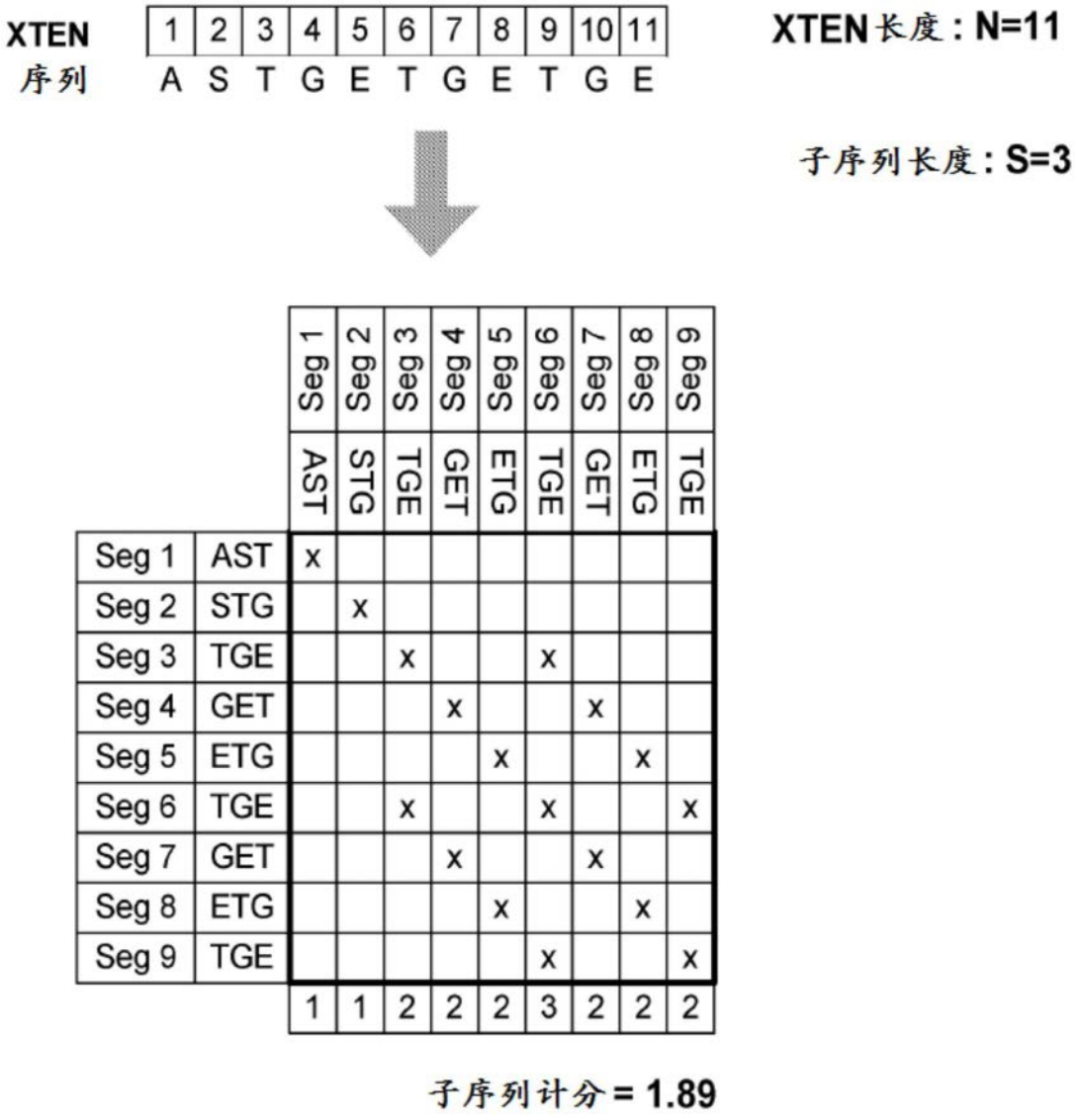

XTEN
序列
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
A S T G E T G E T G E
XTEN长度：N=11
子序列长度：S=3
Seg 1 AST
Seg 2 STG
Seg 3 TGE
Seg 4 GET
Seg 5 ETG
Seg 6 TGE
Seg 7 GET
Seg 8 ETG
Seg 9 TGE
1 1 2 2 2 3 2 2 2
子序列计分 = 1.89

图28

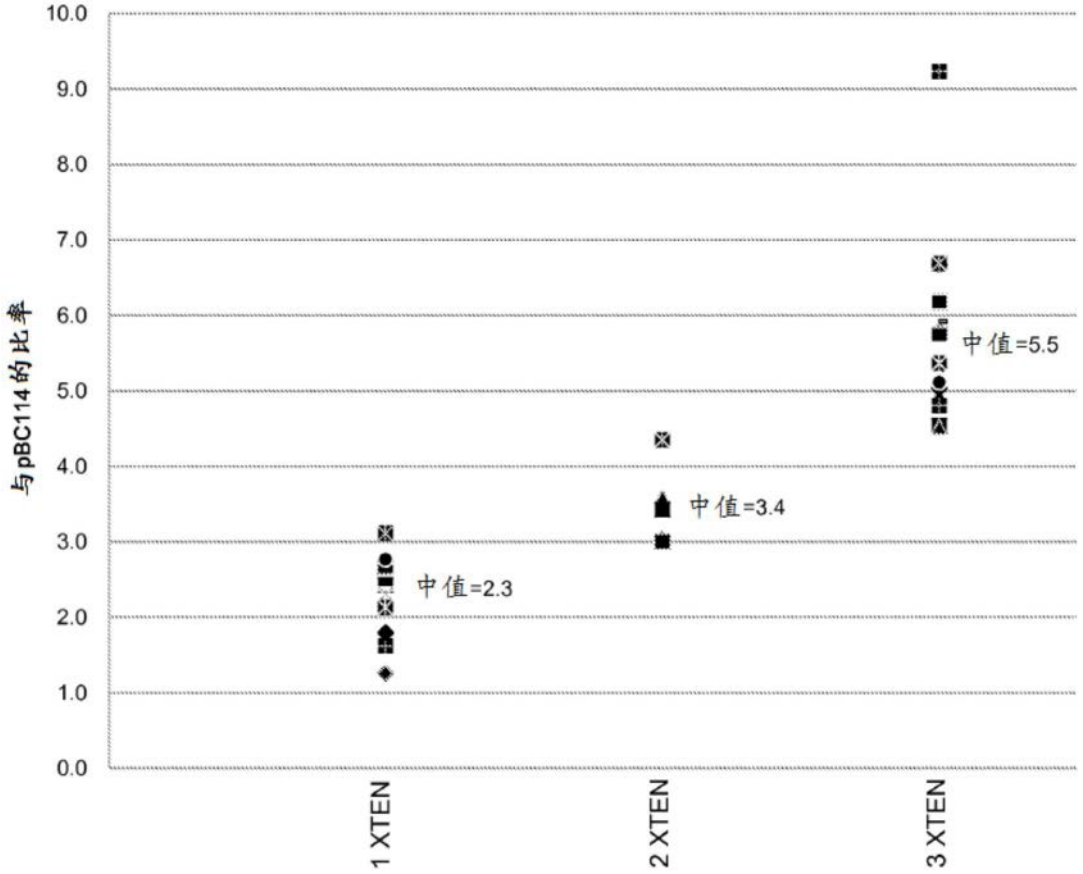

10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
与pBC114的比率
中值=2.3
中值=3.4
中值=5.5
1 XTEN
2 XTEN
3 XTEN

图29

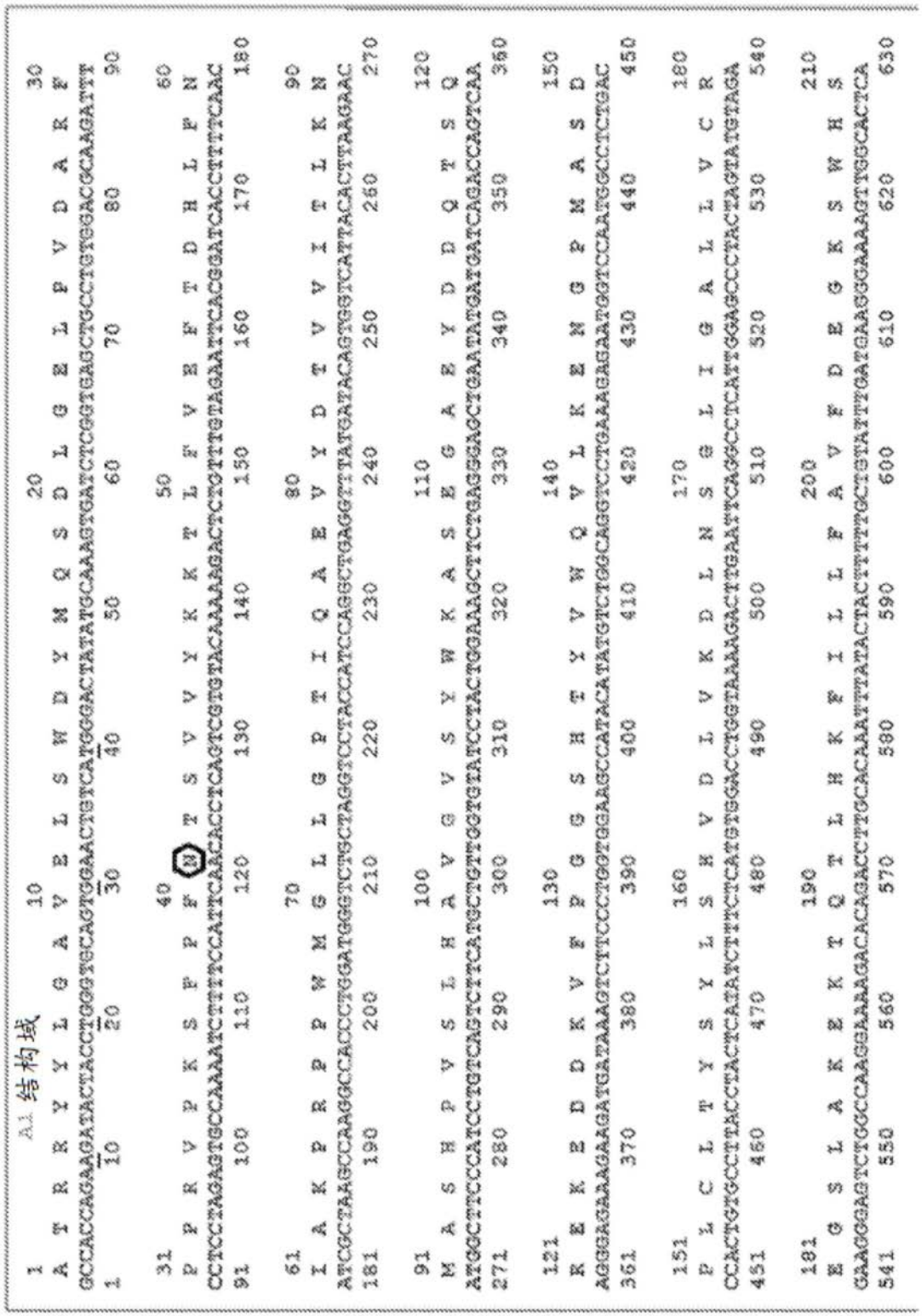


图30A

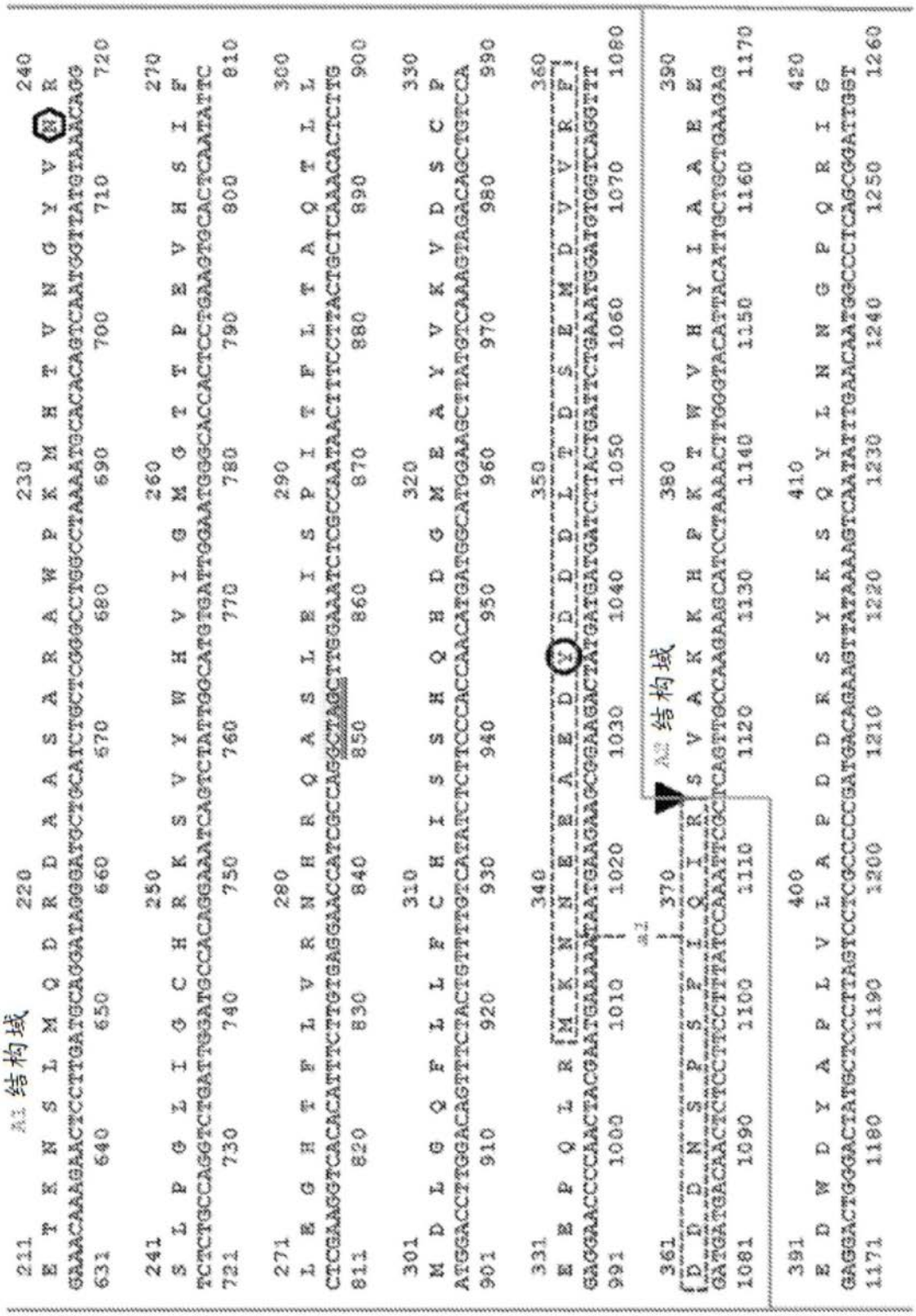


图30B

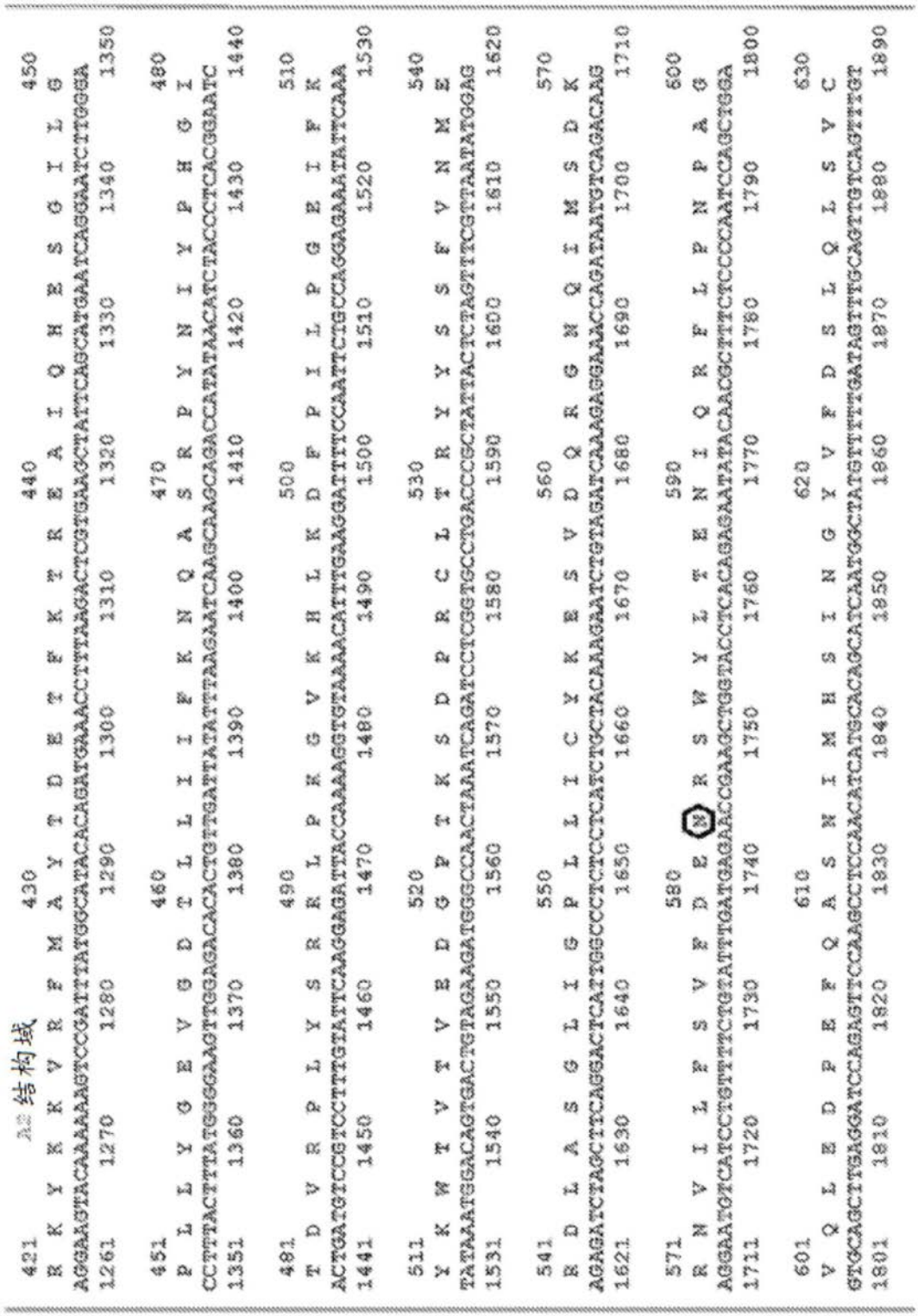


图30C

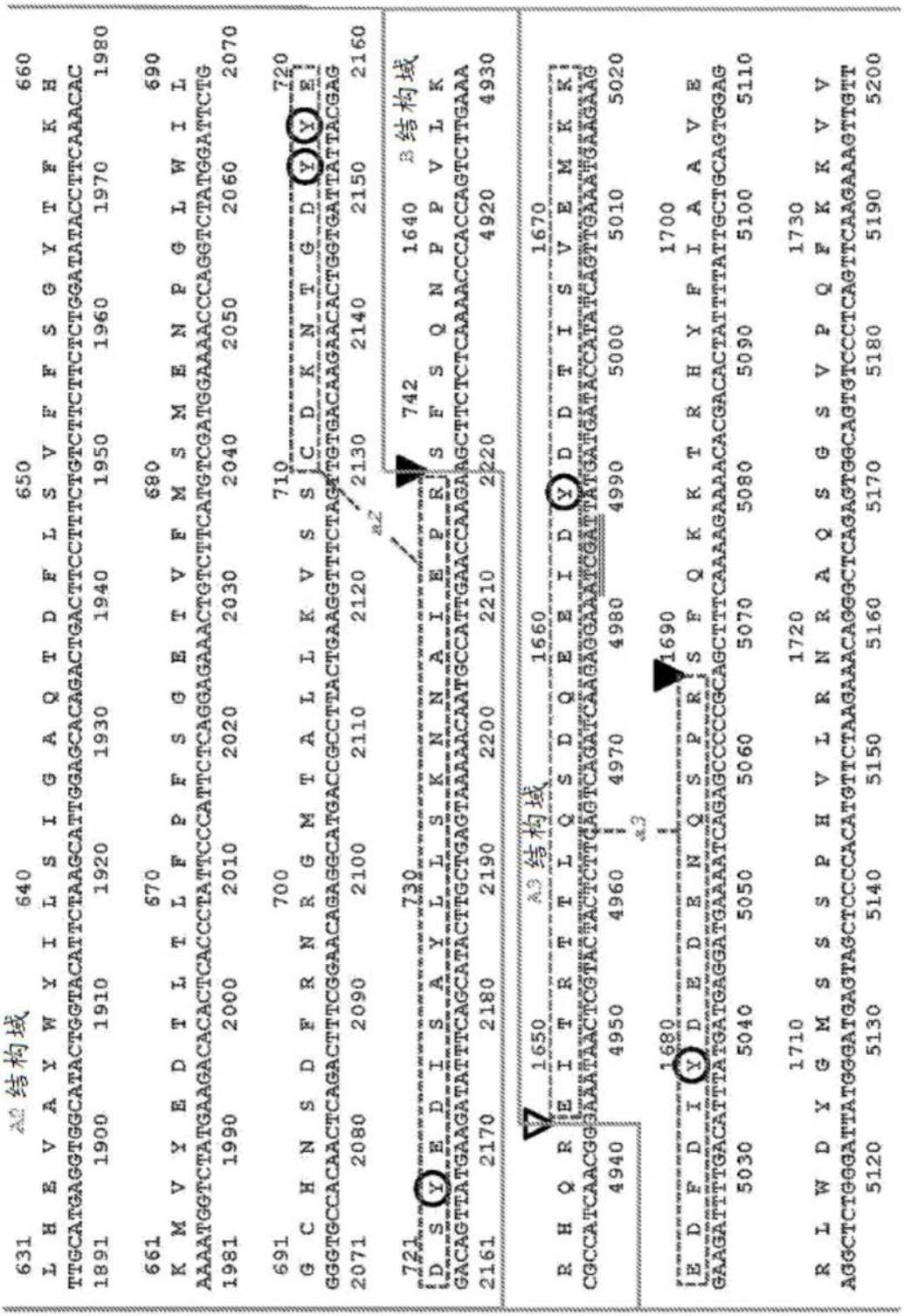

A2 结构域
A3 结构域
631
640
650
660
1891
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
661
670
680
690
1981
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
691
700
710
720
2071
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
721
730
742
1640
2161
2170
2180
2190
2200
2210
2220
4920
4930
1650
1660
1670
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
1680
1690
1700
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
1710
1720
1730
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200

图30D

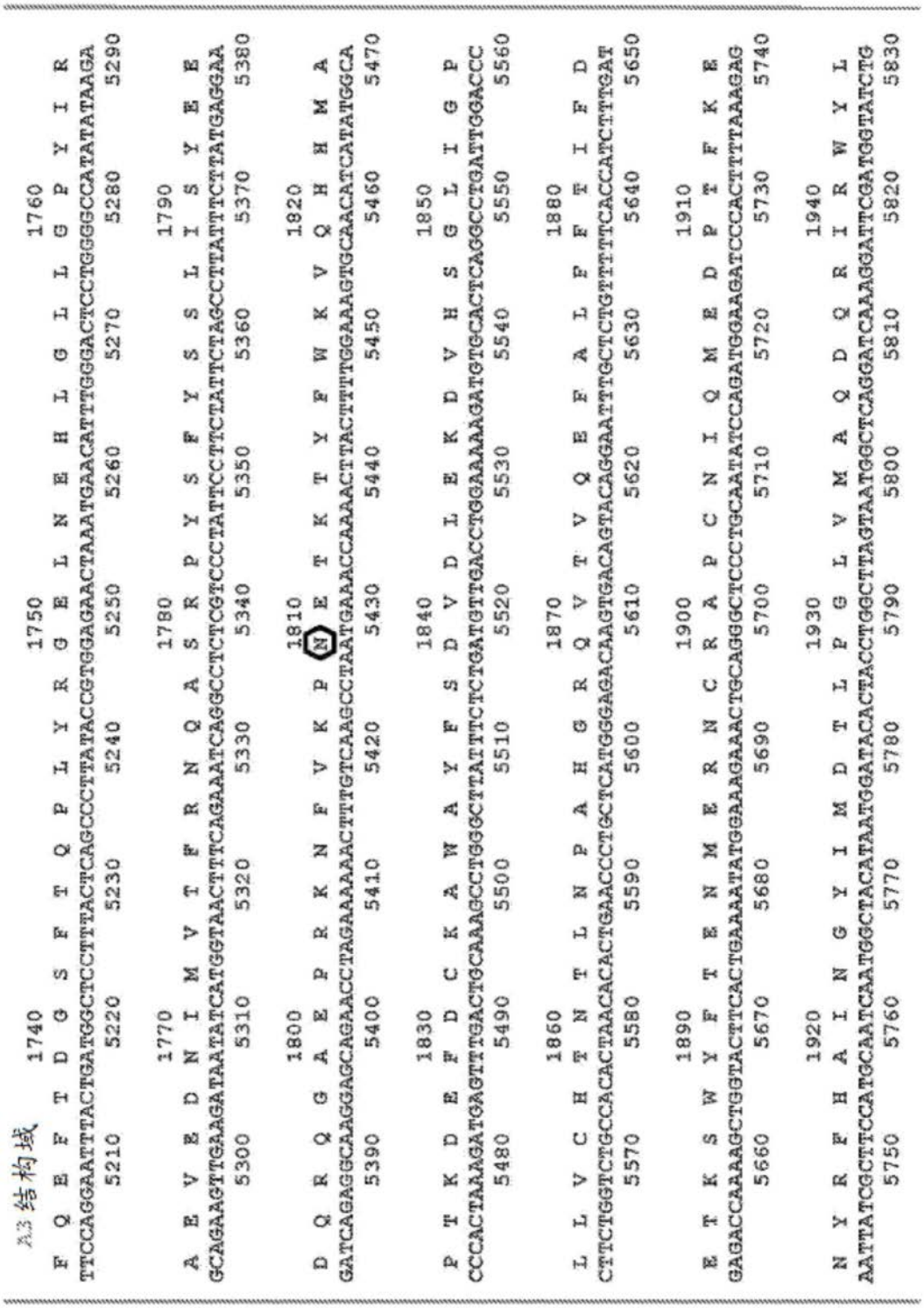


图30E

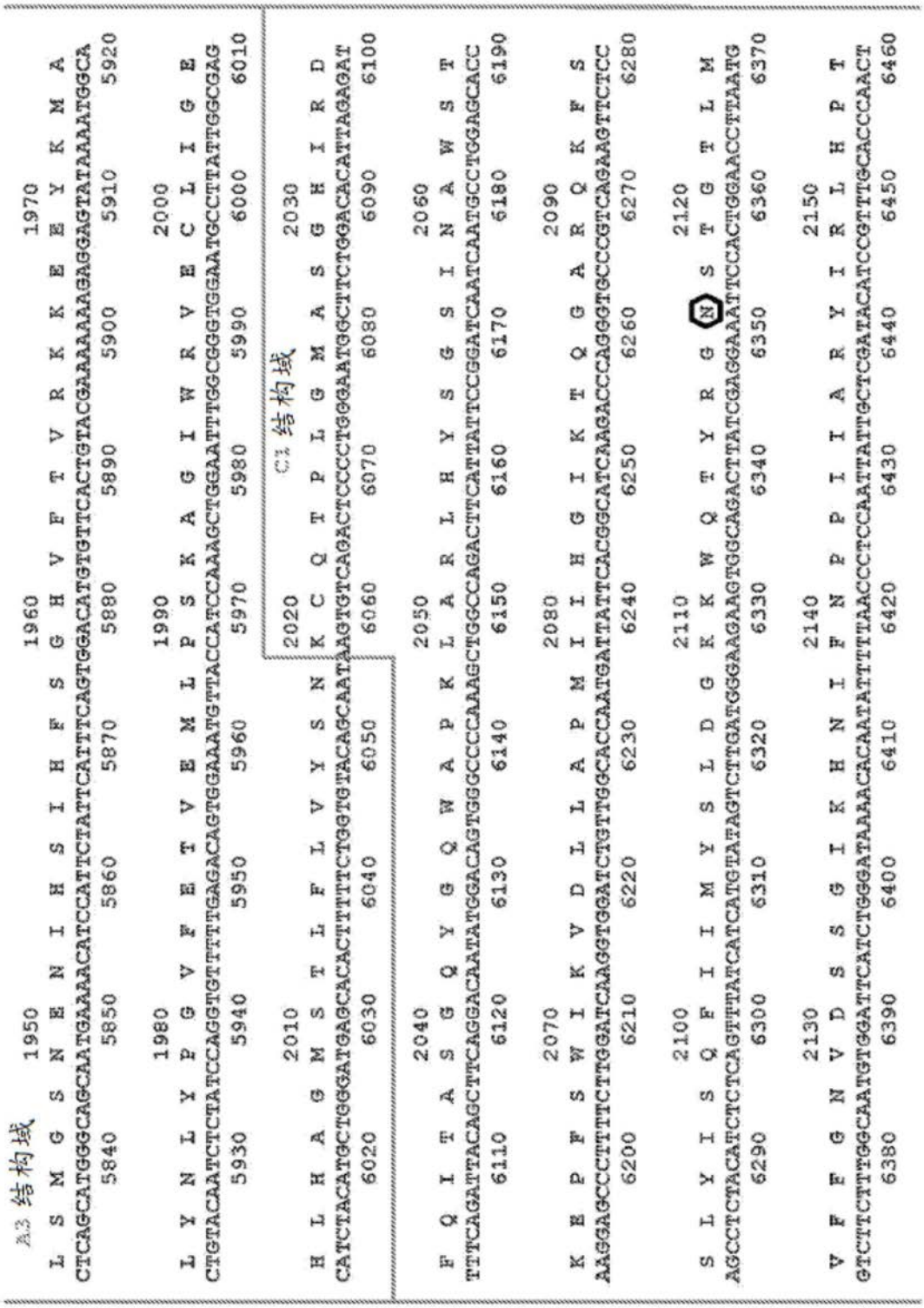


图30F

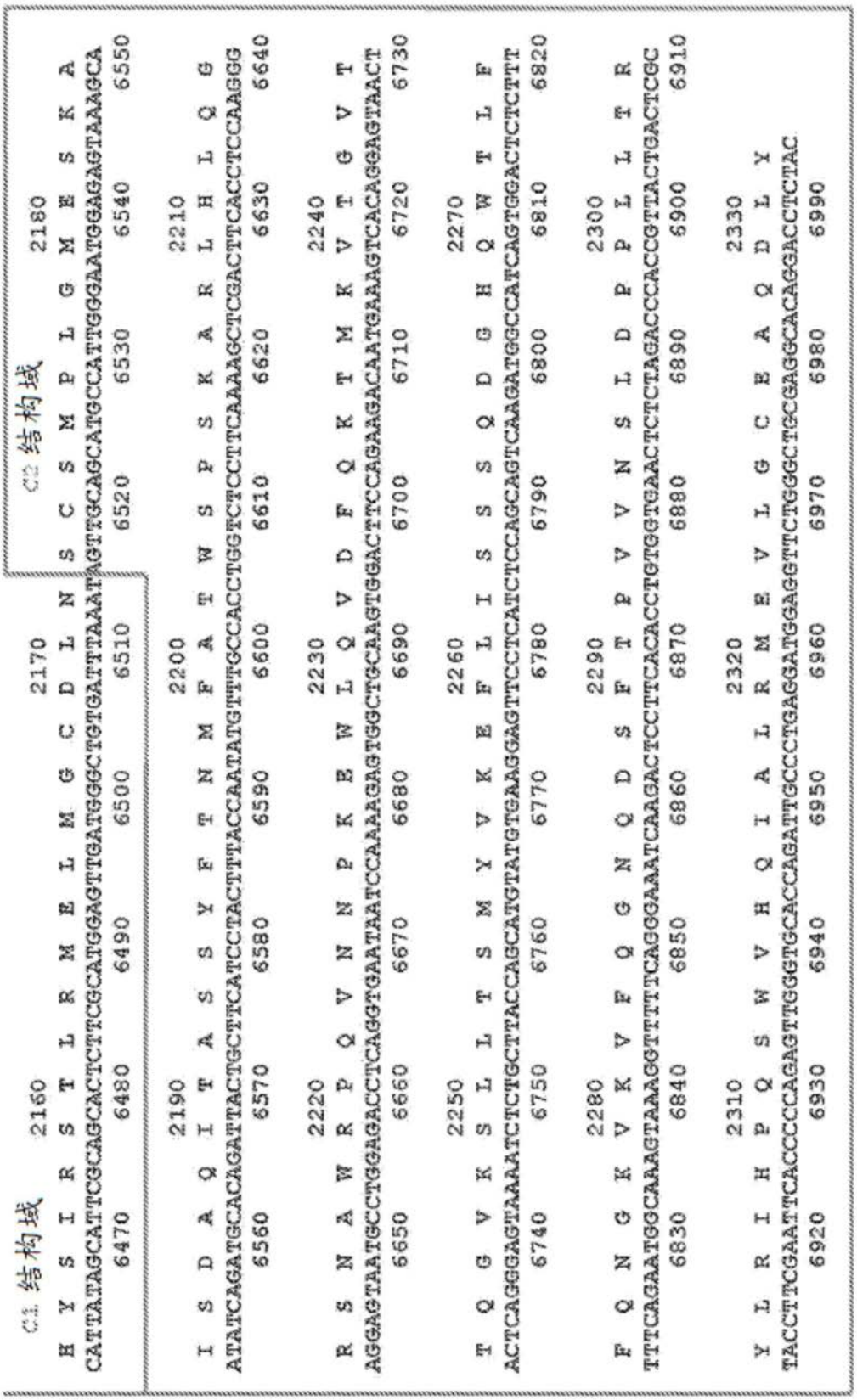


图30G

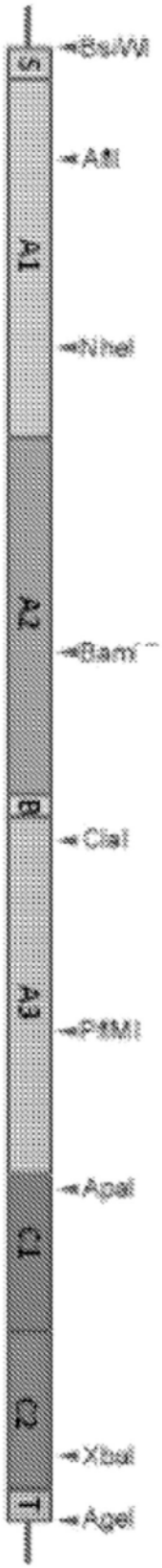

S
A1
A2
B
A3
C1
C2
T
BsiWI
AflII
NheI
BamHI
ClaI
PflMI
AgeI
XbaI
AgeI

图31

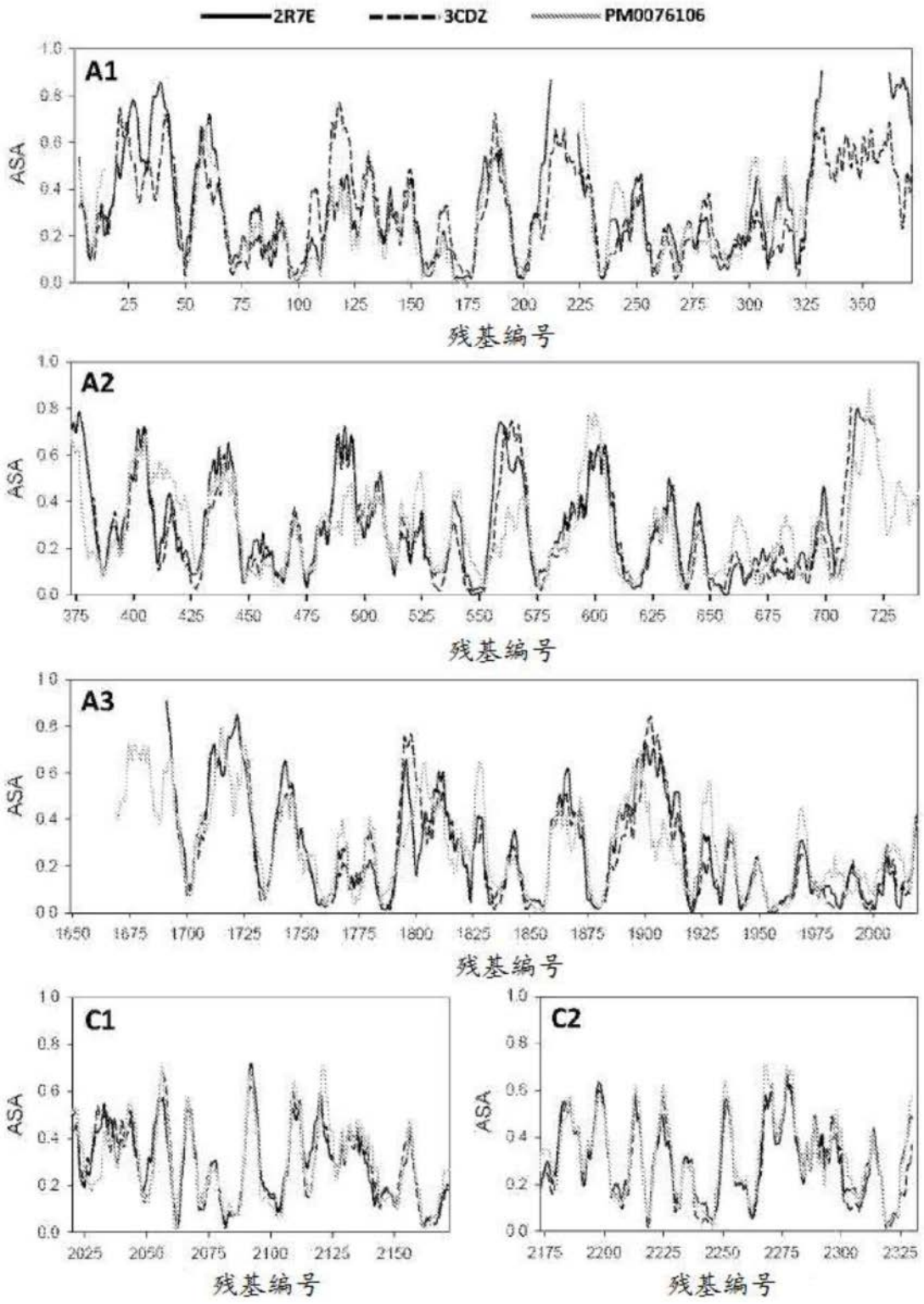


图32

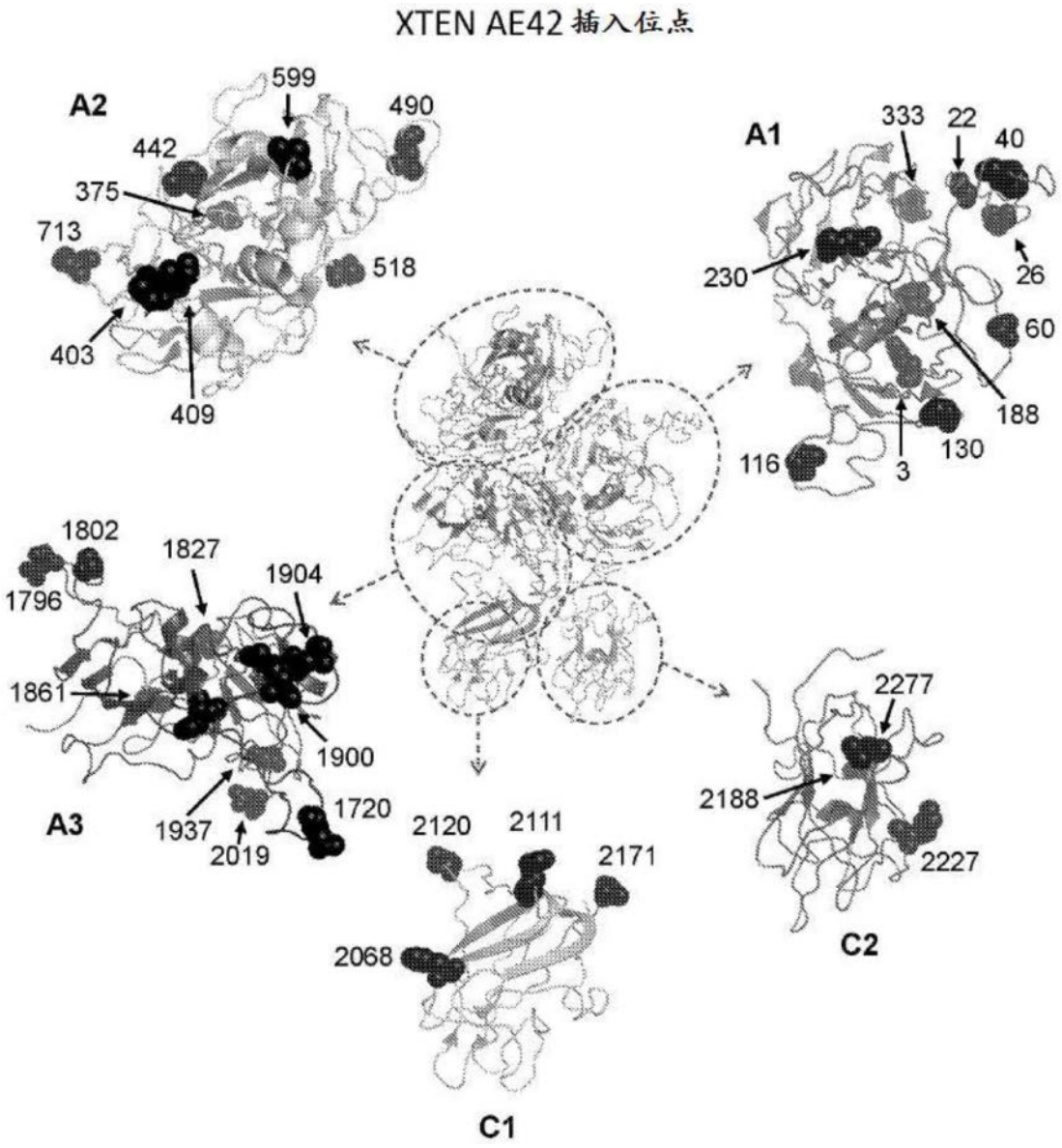

XTEN AE42 插入位点
A2
599
490
442
375
713
518
403
409
A1
333
22
40
230
26
60
188
116
3
130
A3
1802
1827
1796
1904
1861
1900
1720
1937
2019
C1
2120
2111
2171
2068
C2
2277
2188
2227

图33

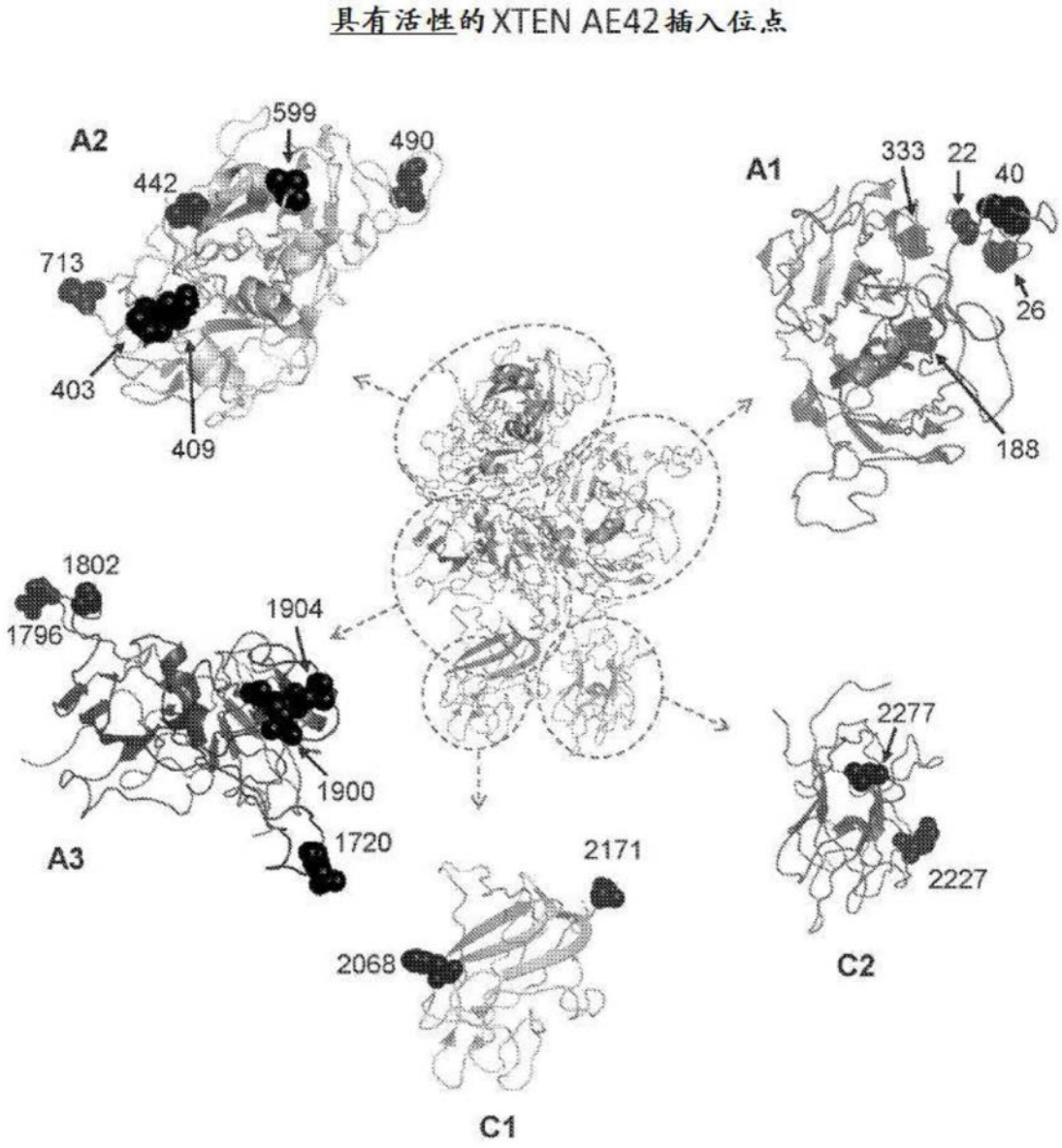

具有活性的XTEN AE42插入位点
A2
599
490
442
713
403
409
A1
333
22
40
26
188
1802
1796
1904
1900
1720
A3
2277
2227
C2
2171
2068
C1

图34

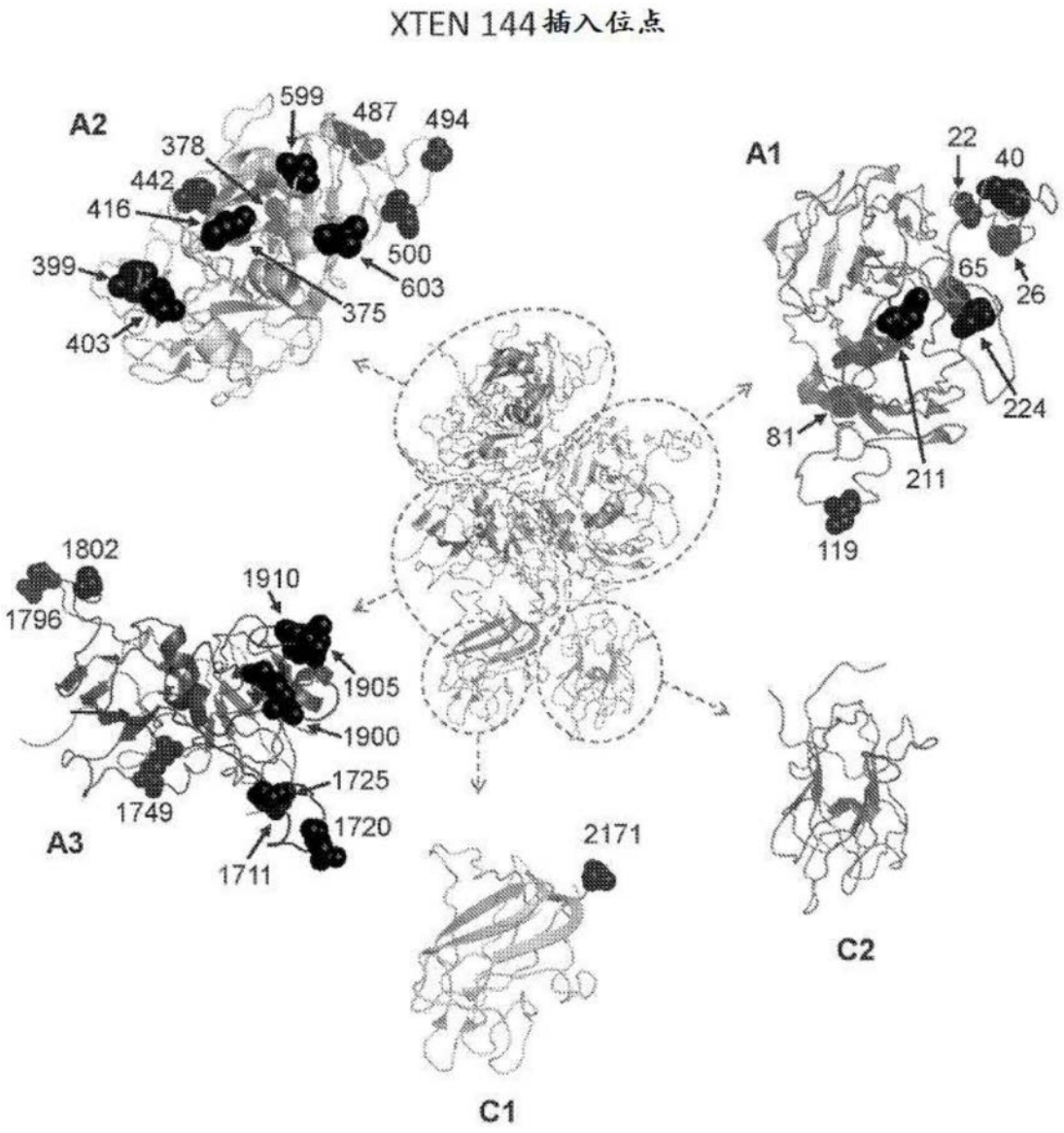

XTEN 144插入位点
A2
599
487
494
378
442
416
399
500
603
375
403
A1
22
40
65
26
224
81
211
119
1802
1796
1910
1905
1900
1725
1720
1749
1711
A3
2171
C1
C2

图35

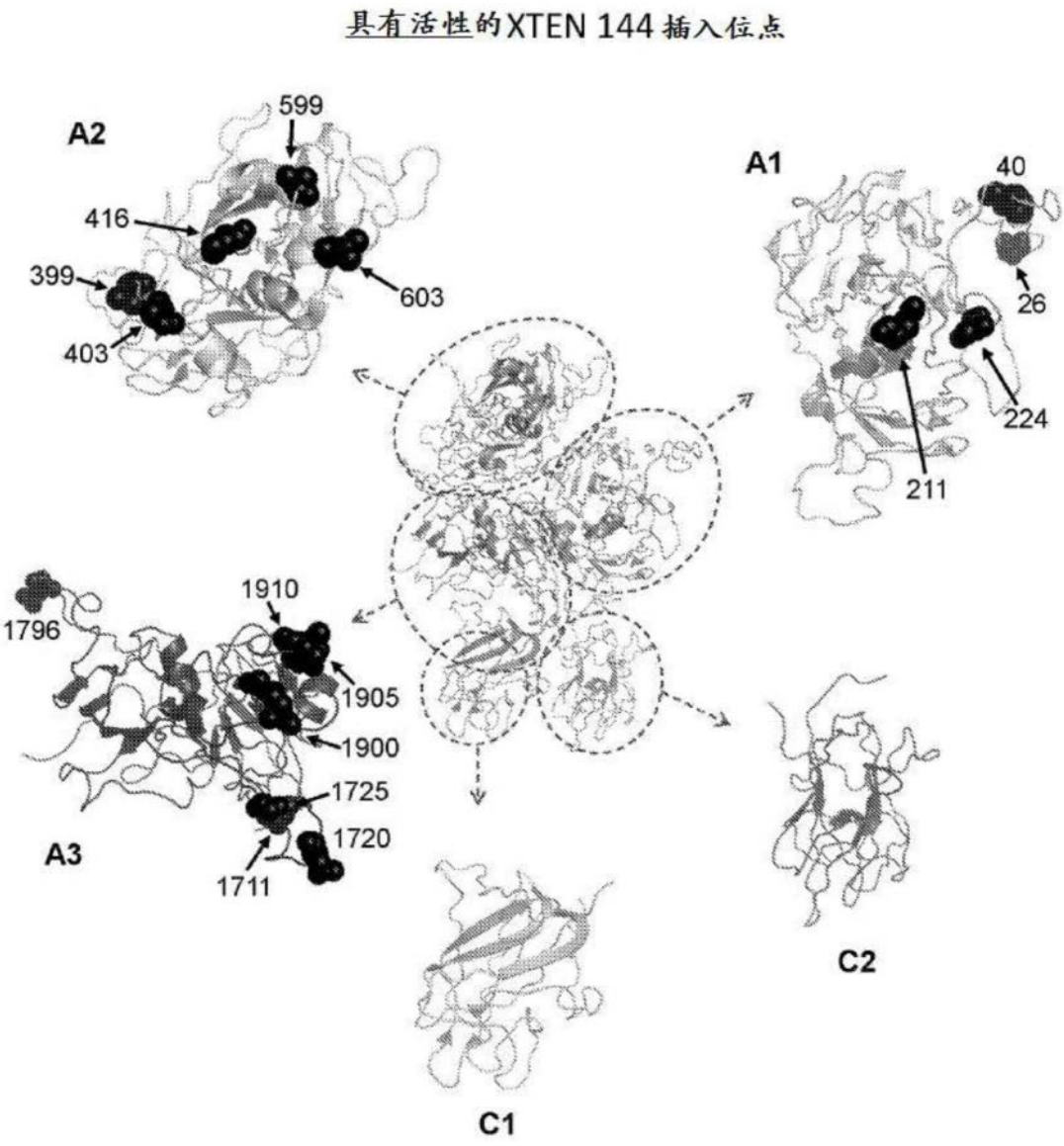

具有活性的XTEN 144 插入位点
A2
599
416
399
603
403
A1
40
26
224
211
1910
1796
1905
1900
1725
1720
A3
1711
C2
C1

图36

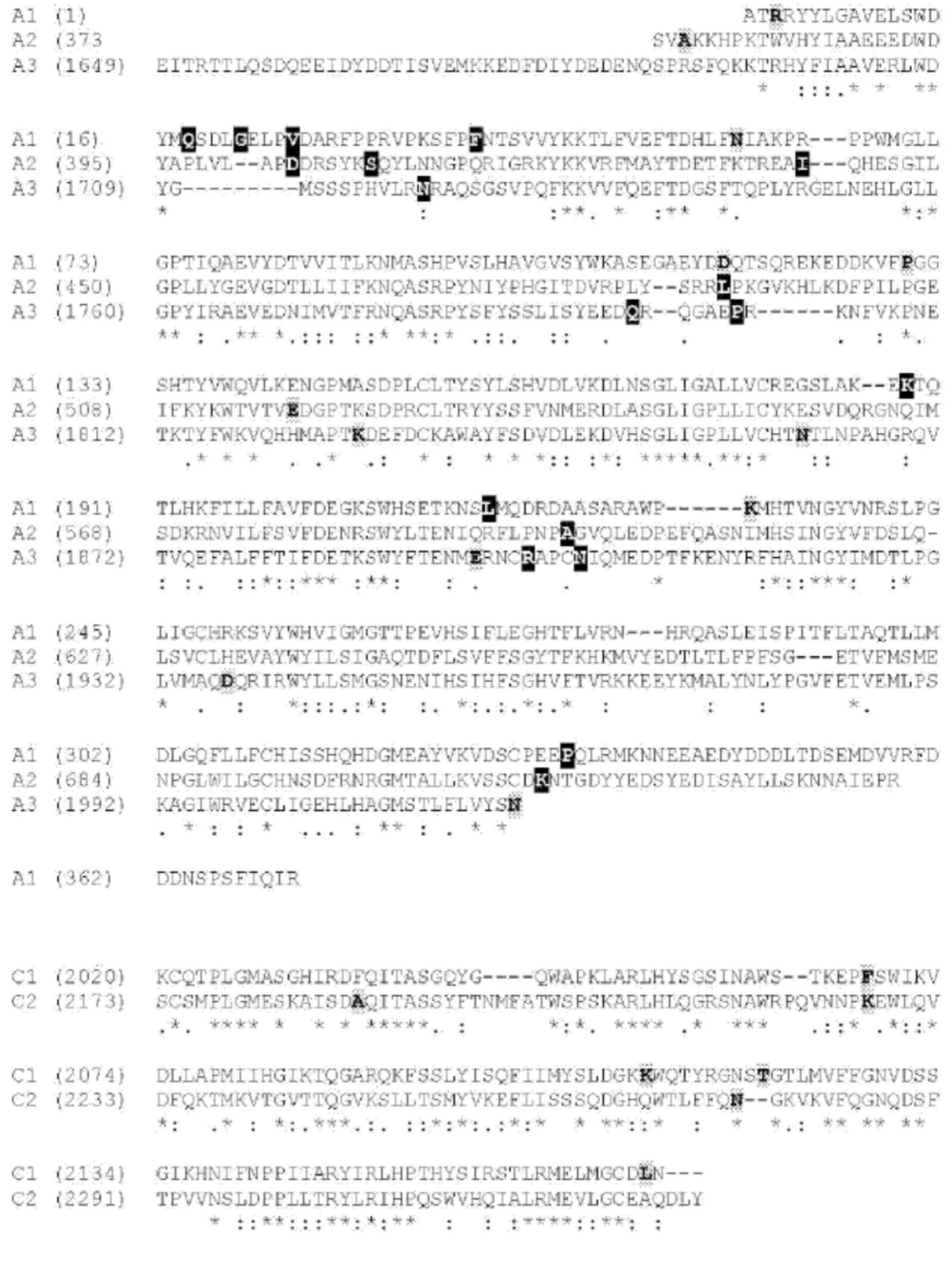


图37

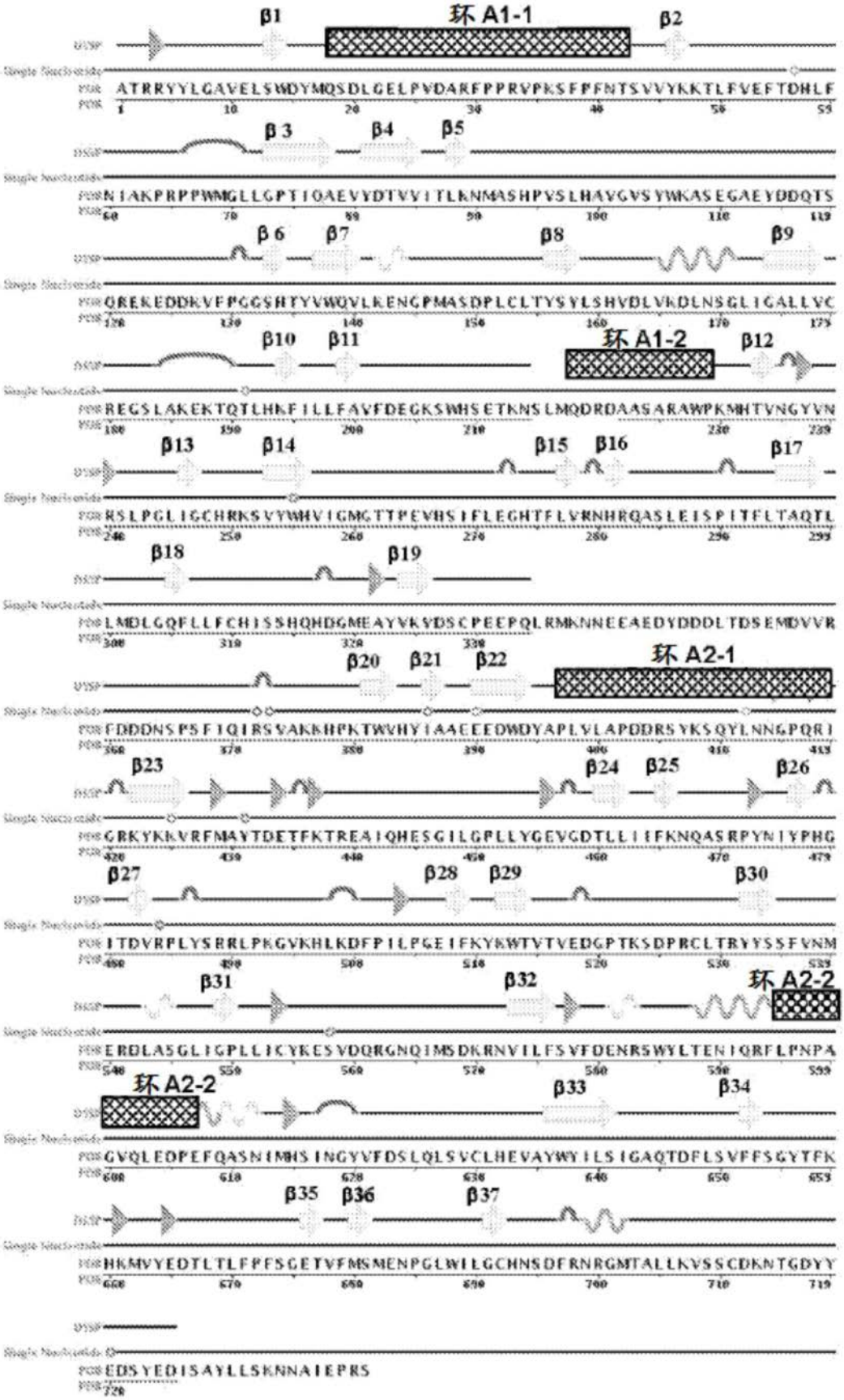

β1
环 A1-1
β2
β3
β4
β5
β6
β7
β8
β9
β10
β11
环 A1-2
β12
β13
β14
β15
β16
β17
β18
β19
β20
β21
β22
环 A2-1
β23
β24
β25
β26
β27
β28
β29
β30
β31
β32
环 A2-2
β33
β34
环 A2-2
β35
β36
β37

图38

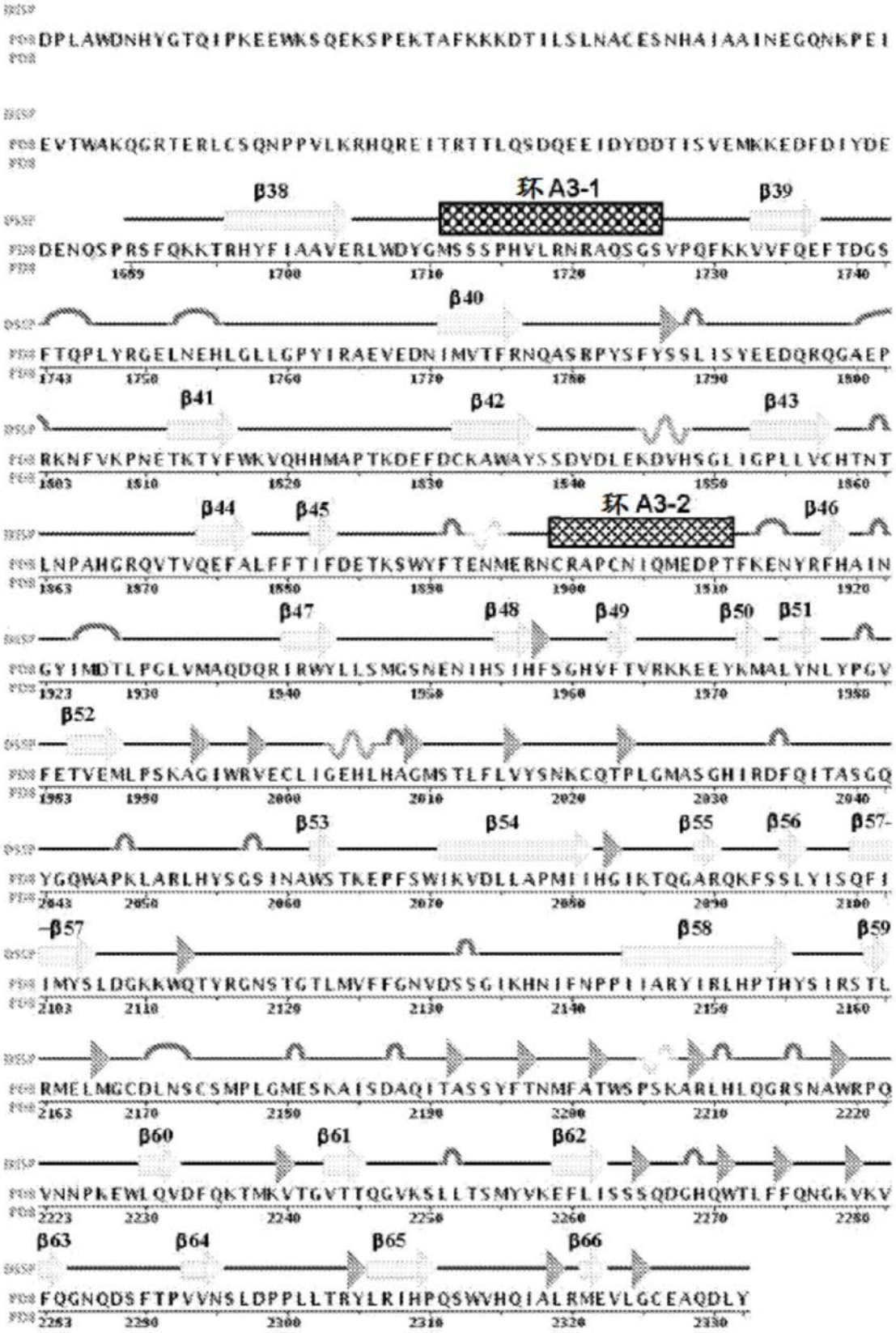

β38
环A3-1
β39
β40
β41
β42
β43
β44
β45
环A3-2
β46
β47
β48
β49
β50
β51
β52
β53
β54
β55
β56
β57
β58
β59
β60
β61
β62
β63
β64
β65
β66

图39

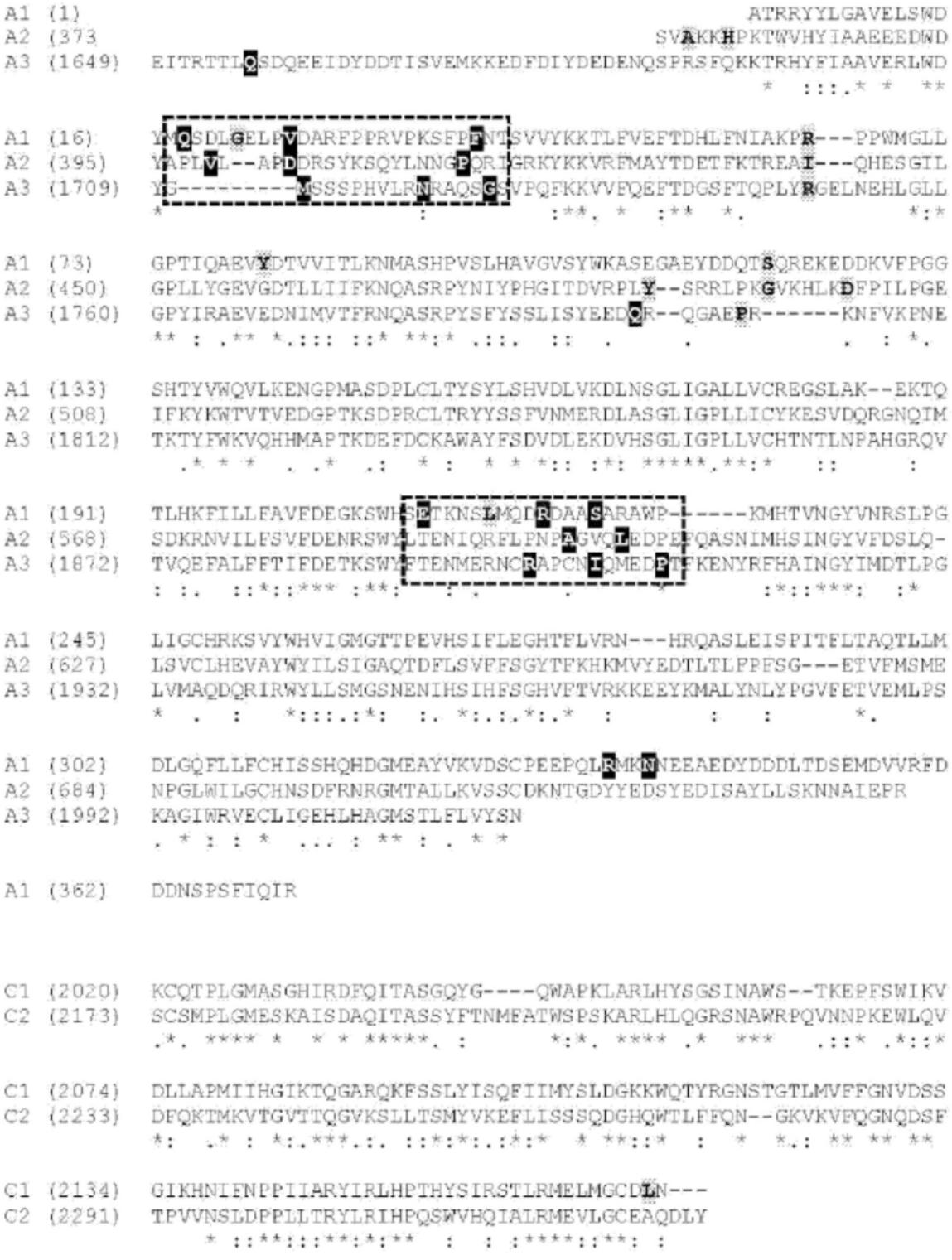


图40

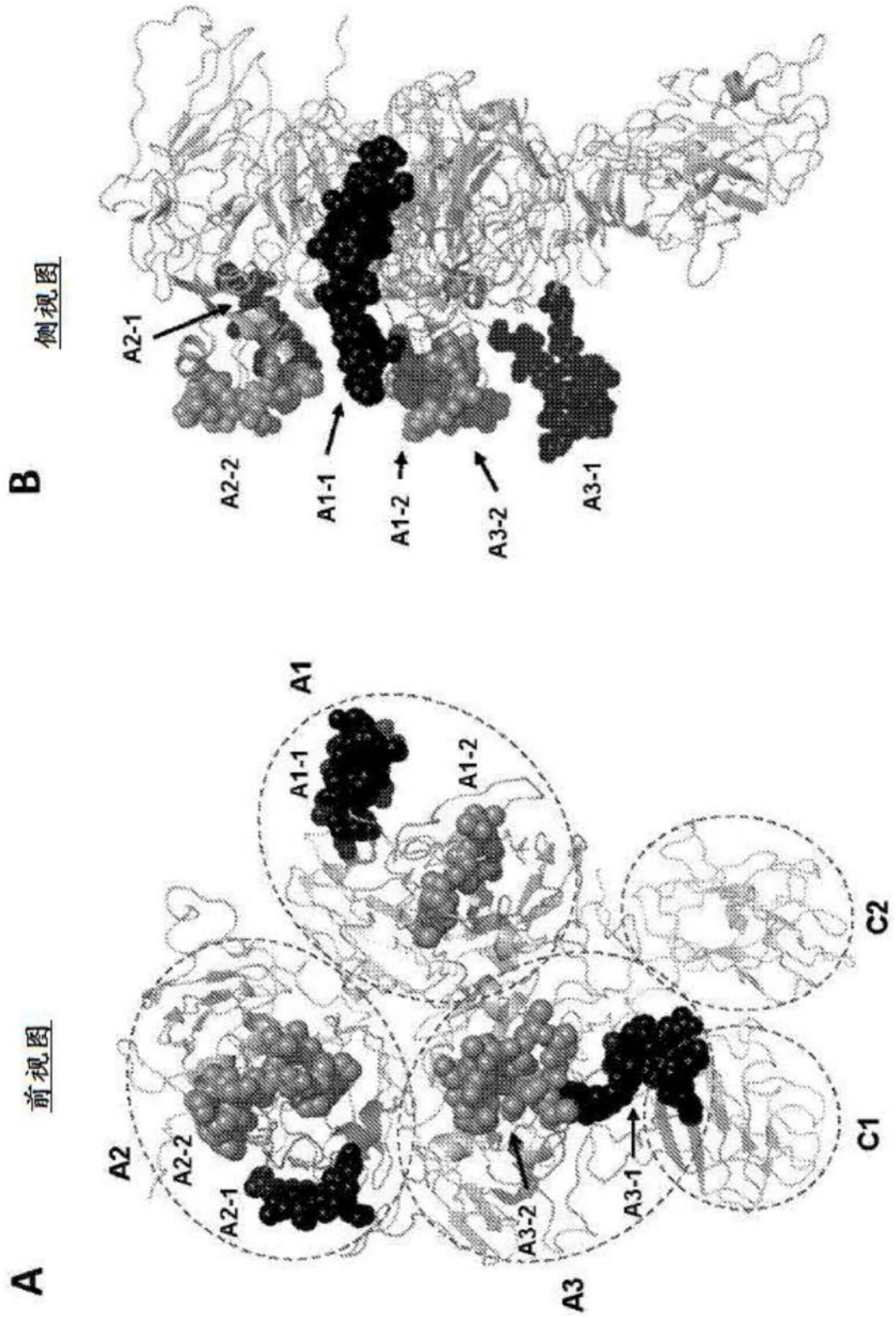

A
前视图
A2
A2-2
A2-1
A1
A1-1
A1-2
A3-2
A3-1
A3
C1
C2
B
侧视图
A2-1
A2-2
A1-1
A1-2
A3-2
A3-1

图41

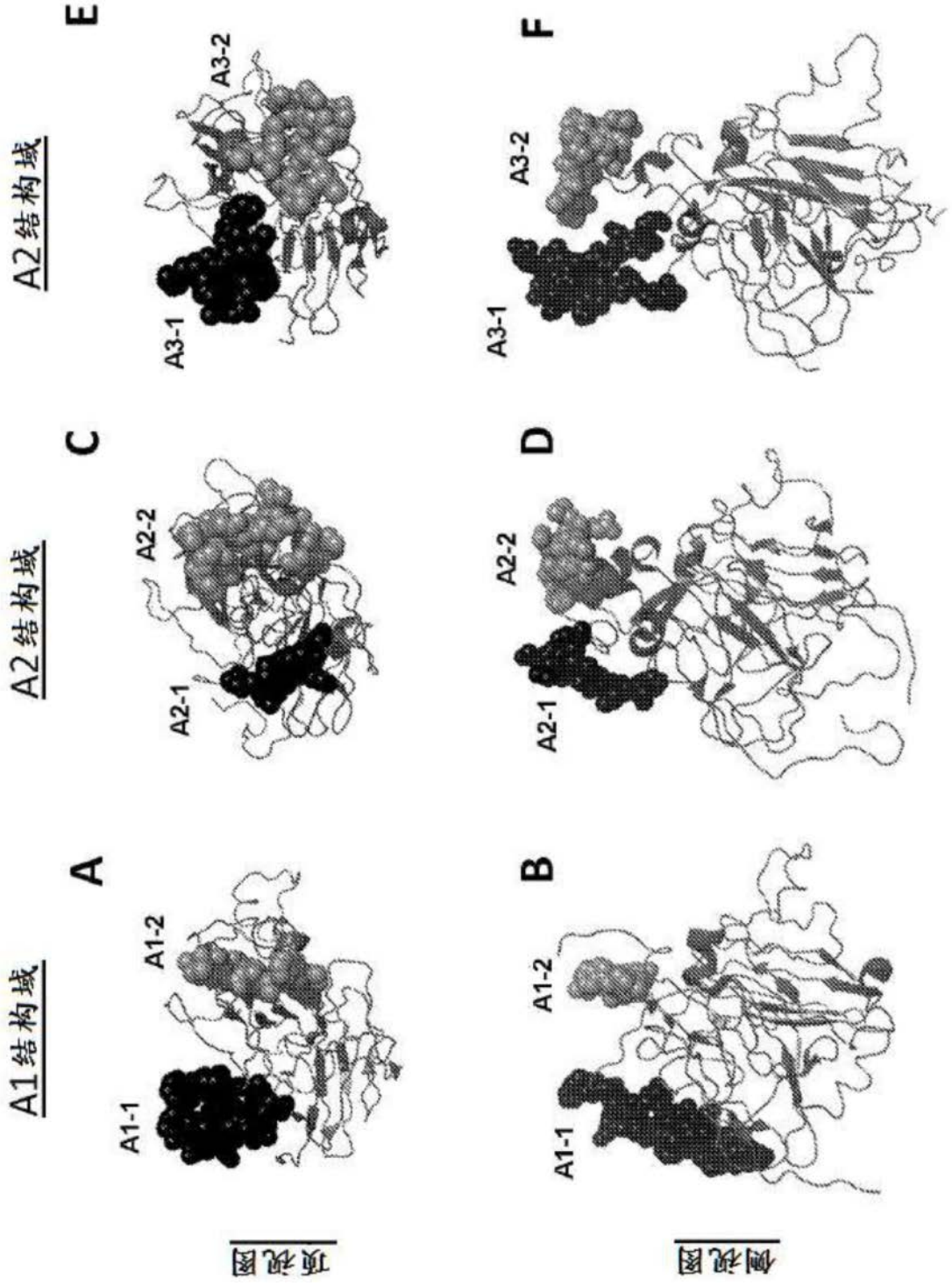


图42

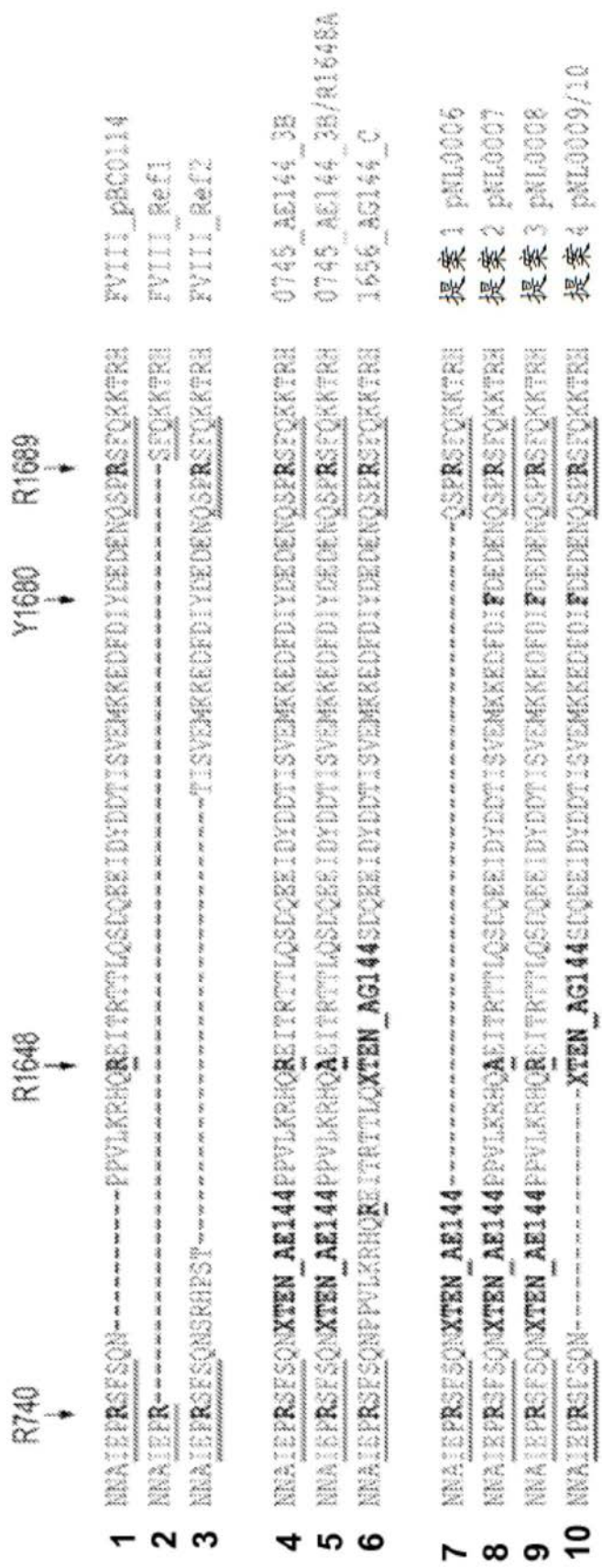

R740
R1648
Y1680
R1689
1 MNAIEPRSFSQN----------PPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDVTVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH FVIII_pBC0114
2 MNAIEPR----------SFQKTRH FVIII_Ref1
3 MNAIEPRSFSQNSRHPSY----------TISVEMKREDFDIYDDENQSPRSTQKTRH FVIII_Ref2
4 MNAIEPRSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTTSVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 0745_AG144_3B
5 MNAIEPRSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDVTVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 0745_AG144_3B/R1648A
6 MNAIEPRSFSQNPPVLKRHQREITRTTLQXTEN_AG144SDQEEIDYDDTTSVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 1656_AG144_C
7 MNAIEPRSFSQNXTEN_AE144----------QSPRSTQKTRH 挨拶1 pML0006
8 MNAIEPRSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQAEITRTTLQSDQEEIDYDDTTSVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 挨拶2 pML0007
9 MNAIEPRSFSQNXTEN_AE144PPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDVTVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 挨拶3 pML0008
10 MNAIEPRSFSQN----------XTEN_AG144SDQEEIDYDDVTVEMKREDFDIYDENENQSPRSTQKTRH 挨拶4 pML0009/10

图43

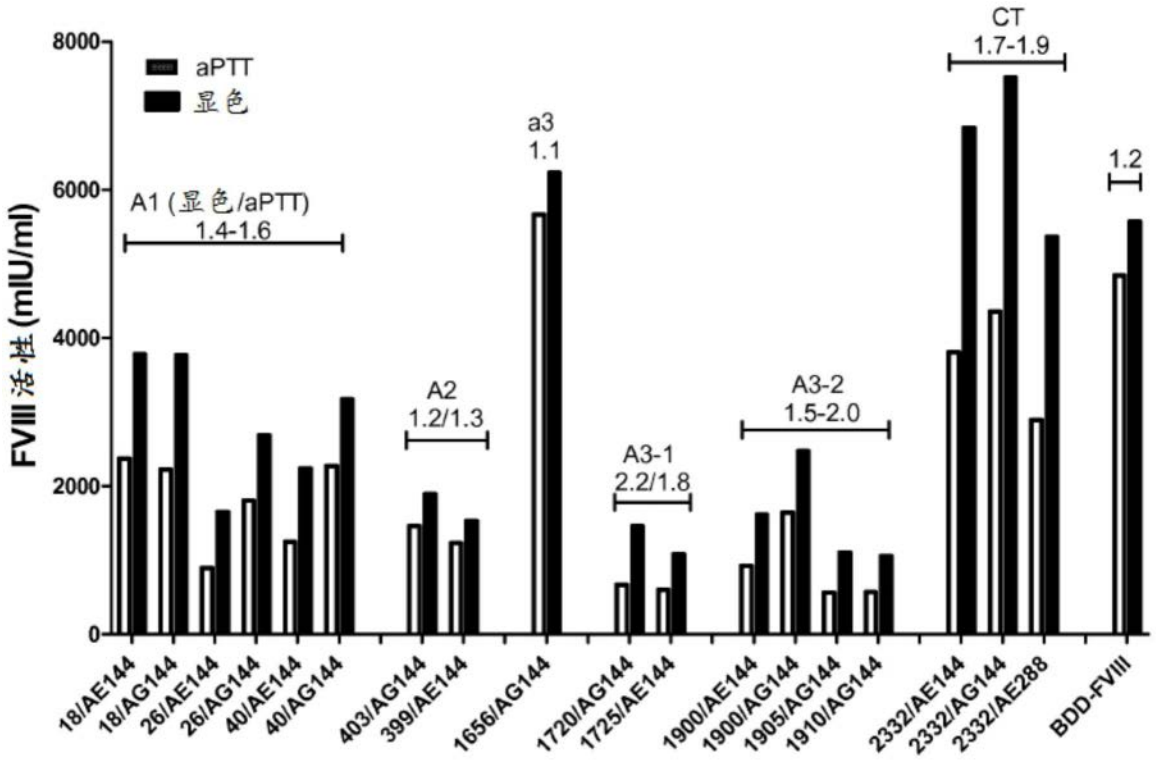

8000
6000
4000
2000
0
FVIII 活性 (mIU/ml)
aPTT
显色
A1 (显色/aPTT)
1.4-1.6
A2
1.2/1.3
a3
1.1
A3-1
2.2/1.8
A3-2
1.5-2.0
CT
1.7-1.9
1.2
18/AE144
18/AG144
26/AE144
26/AG144
40/AE144
40/AG144
403/AG144
399/AE144
1656/AG144
1720/AG144
1725/AE144
1900/AE144
1900/AG144
1905/AG144
1910/AG144
2332/AE144
2332/AG144
2332/AE288
BDD-FVIII

图44

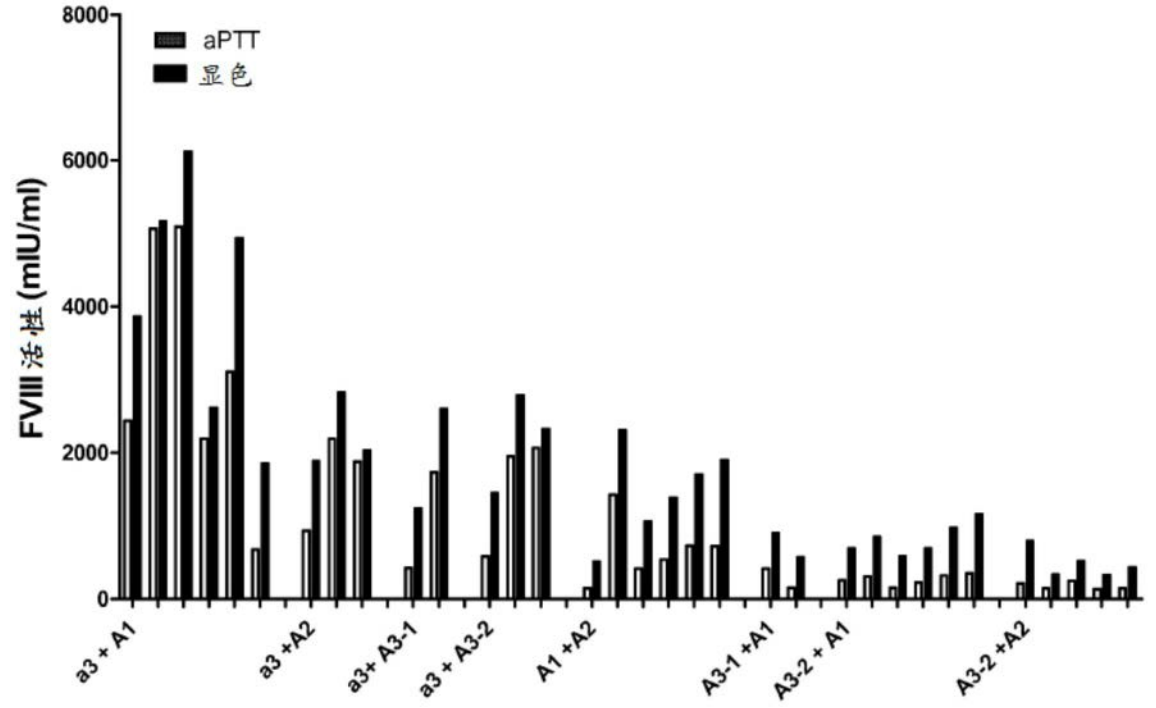

8000
6000
4000
2000
0
FVIII 活性 (mIU/ml)
aPTT
显色
a3 + A1
a3 +A2
a3+ A3-1
a3 + A3-2
A1 +A2
A3-1 +A1
A3-2 + A1
A3-2 +A2

图45

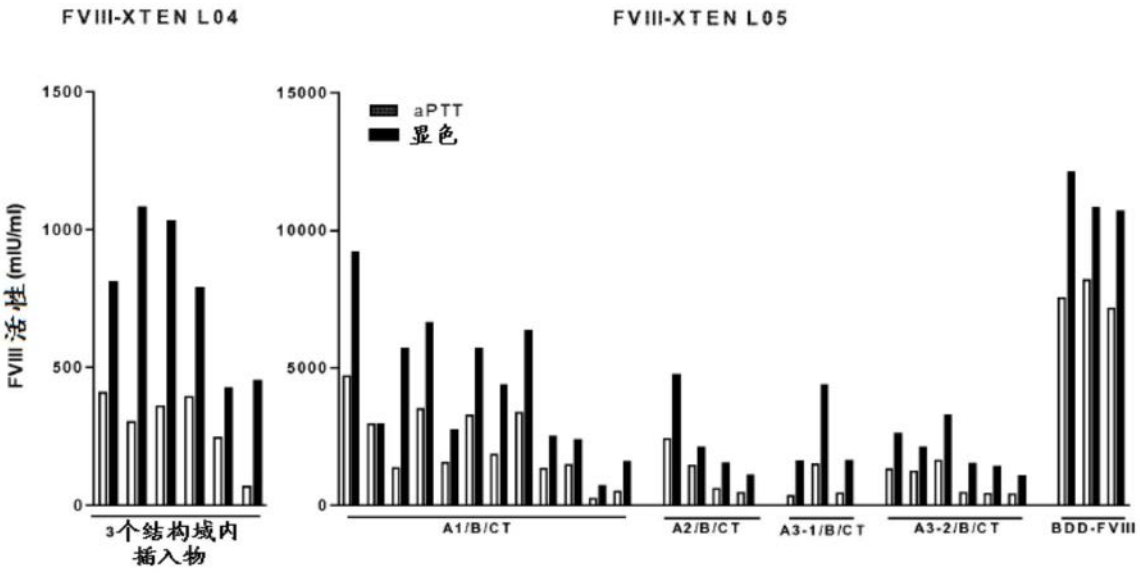

FVIII-XTEN L04
FVIII-XTEN L05
FVIII 活性 (mIU/ml)
1500
1000
500
0
15000
10000
5000
aPTT
显色
3个结构域内
插入物
A1/B/CT
A2/B/CT
A3-1/B/CT
A3-2/B/CT
BDD-FVIII

图46

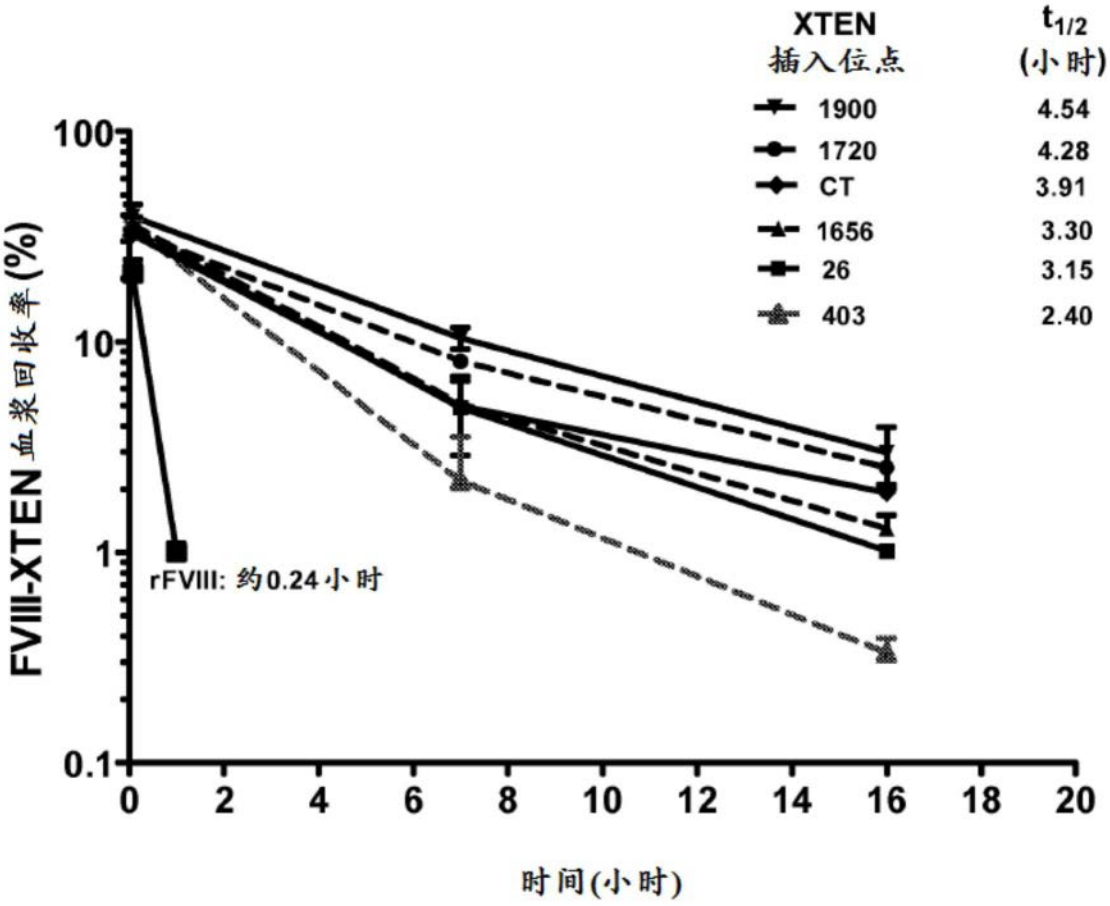

XTEN
插入位点
t1/2
(小时)
1900 4.54
1720 4.28
CT 3.91
1656 3.30
26 3.15
403 2.40
FVIII-XTEN 血浆回收率 (%)
100
10
1
0.1
rFVIII: 约0.24 小时
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
时间(小时)

图47

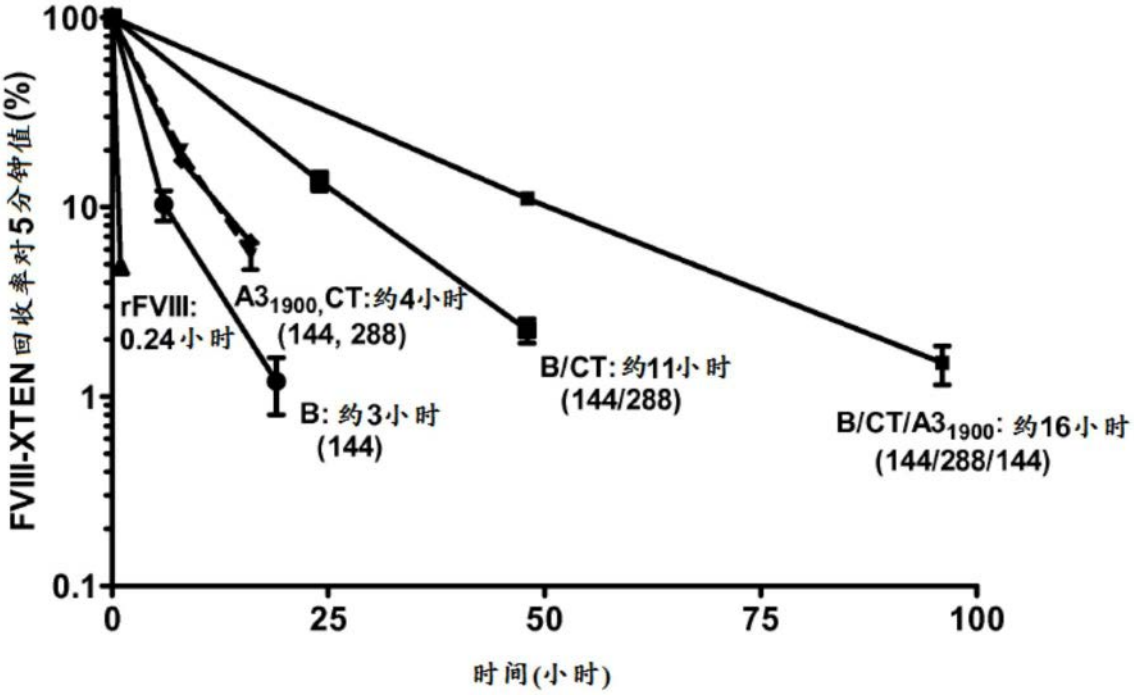

100
10
1
0.1
FVIII-XTEN回收率对5分钟值(%)
0
25
50
75
100
时间(小时)
rFVIII:
0.24小时
A3$_{1900}$,CT:约4小时
(144, 288)
B:约3小时
(144)
B/CT:约11小时
(144/288)
B/CT/A3$_{1900}$:约16小时
(144/288/144)

图48

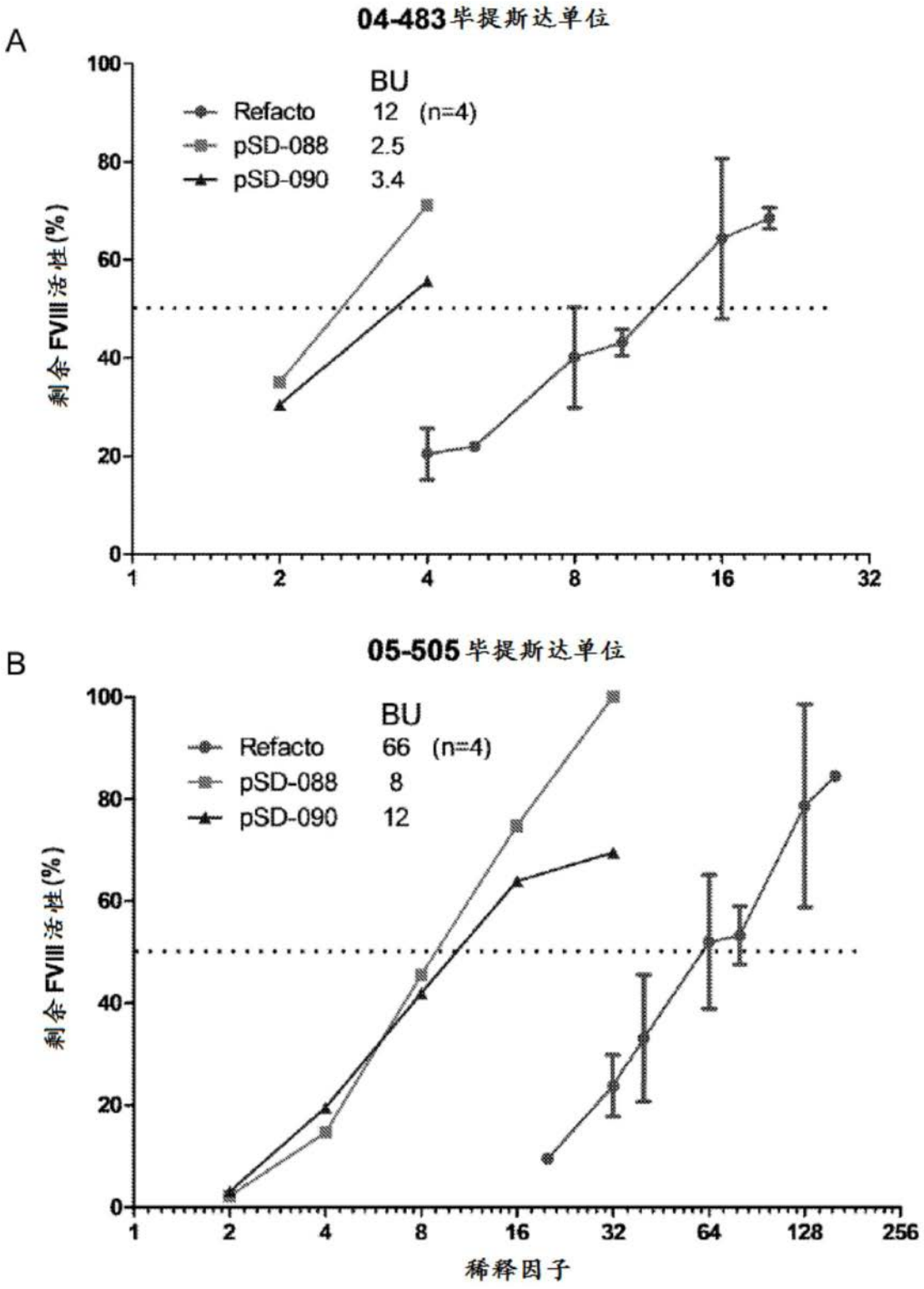

A
04-483毕提斯达单位
BU
Refacto 12 (n=4)
pSD-088 2.5
pSD-090 3.4
剩余FVIII活性(%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
B
05-505毕提斯达单位
BU
Refacto 66 (n=4)
pSD-088 8
pSD-090 12
剩余FVIII活性(%)
100
80
60
40
20
0
1
2
4
8
16
32
64
128
256
稀释因子

图49

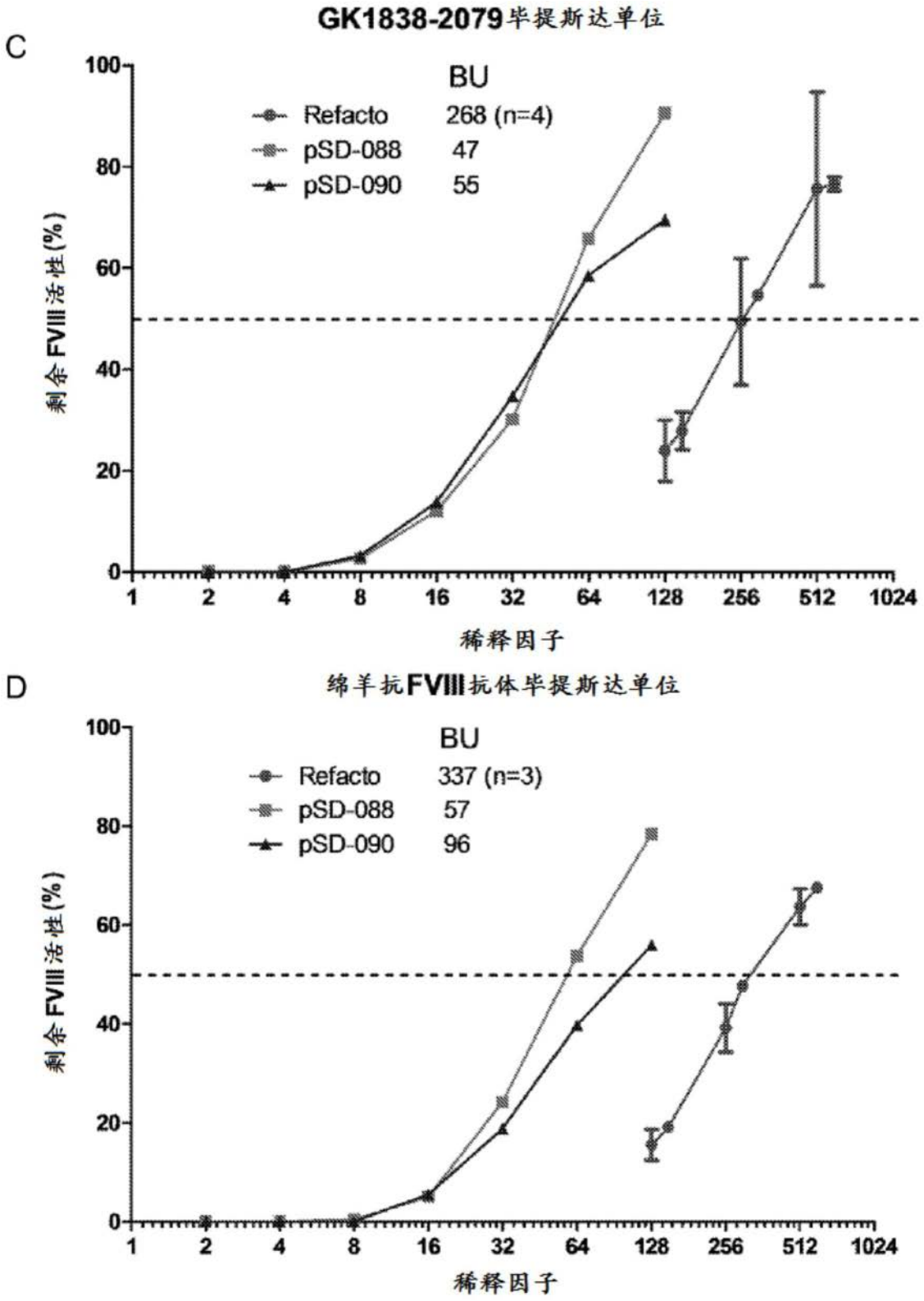

C
GK1838-2079毕提斯达单位
BU
Refacto 268 (n=4)
pSD-088 47
pSD-090 55
剩余FVIII活性(%)
稀释因子
D
绵羊抗FVIII抗体毕提斯达单位
BU
Refacto 337 (n=3)
pSD-088 57
pSD-090 96
剩余FVIII活性(%)
稀释因子

图49(续)