

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07K 11/00

C07K 14/00

C07K 17/00

A61K 38/00



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01819149.5

[45] 授权公告日 2005 年 6 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1205221C

[22] 申请日 2001.9.19 [21] 申请号 01819149.5

[30] 优先权

[32] 2000. 9. 19 [33] US [31] 60/234,047

[32] 2000. 9. 29 [33] US [31] 60/236,460

[86] 国际申请 PCT/US2001/029431 2001.9.19

[87] 国际公布 WO2002/024723 英 2002.3.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.5.19

[71] 专利权人 埃默里大学

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 J·S·洛拉

审查员 吴永庆

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 徐 迅

权利要求书 3 页 说明书 47 页 附图 5 页

[54] 发明名称 修饰的凝血因子Ⅷ

[57] 摘要

人凝血因子Ⅷ的特定氨基酸基因座与用凝血因子Ⅷ治疗后的血友病患者的抑制性抗体反应。公开了修饰的凝血因子Ⅷ，其中通过在一个或多个特定的基因座位取代改变氨基酸序列。修饰的凝血因子Ⅷ用于血友病，用于避免或预防抑制性抗体的作用。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

- 1.一种修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 在选自 2199、2200、2223、2227、2251 和 2252 的一个或多个位置上含有氨基酸取代。
- 2.如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 缺乏 B 结构域。
3. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代甲硫氨酸 2199 的异亮氨酸。
4. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代苯丙氨酸 2200 的亮氨酸。
5. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代亮氨酸 2252 的苯丙氨酸。
6. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代甲硫氨酸 2199 的异亮氨酸和取代苯丙氨酸 2200 的亮氨酸。
7. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代缬氨酸 2223 的丙氨酸和取代赖氨酸 2227 的谷氨酰胺。
8. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 含有取代甲硫氨酸 2199 的异亮氨酸、取代苯丙氨酸 2200 的亮氨酸、取代缬氨酸 2223 的丙氨酸和取代赖氨酸 2227 的谷氨酰胺。
9. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 具有大于 2,000 单位/毫克的比活力。
10. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 具有大于 3,000 单位/毫克的比活力。
11. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 具有大于 5,000 单位/毫克的比活力。
12. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 具有大于 10,000 单位/毫克的比活力。
- 13.如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII, 其特征在于, 该凝血因子 VIII 是单突变体。

14.如权利要求1所述的修饰的人凝血因子VIII,其特征在于,该凝血因子VIII是双突变体。

15.如权利要求1所述的修饰的人凝血因子VIII,其特征在于,该凝血因子VIII是三突变体。

16.如权利要求1所述的修饰的人凝血因子VIII,其特征在于,该凝血因子VIII是四突变体。

17.如权利要求1所述的修饰的人凝血因子VIII,其特征在于,该凝血因子VIII与人凝血因子VIII相比,对至少一种C2特异性抑制性抗体的抗原性下降。

18.一种修饰凝血因子VIII,从而使其与抑制性抗体的反应性减少,而保留促凝血活性的方法,其特征在于,该方法包括用减少免疫反应性的氨基酸取代2199、2200、2223、2227、2251和2252位至少一个位点的天然存在的氨基酸。

19.如权利要求18所述的方法,其特征在于,至少一个取代的氨基酸在2199位。

20.如权利要求18所述的方法,其特征在于,至少一个取代的氨基酸在2200位。

21.如权利要求18所述的方法,其特征在于,至少一个取代的氨基酸在2223位。

22.如权利要求18所述的方法,其特征在于,至少一个取代的氨基酸在2227位。

23.如权利要求18所述的方法,其特征在于,至少一个取代的氨基酸在2252位。

24.如权利要求18所述的方法,其特征在于,该修饰的凝血因子VIII是单突变体。

25.如权利要求18所述的方法,其特征在于,该修饰的凝血因子VIII是双突变体。

26.如权利要求18所述的方法,其特征在于,该修饰的凝血因子VIII是三突变体。

27.如权利要求18所述的方法,其特征在于,该修饰的凝血因子VIII是四突变体。

28. 一种修饰凝血因子 VIII，从而使其抗原性下降，而保留促凝血活性的方法，其特征在于，该方法包括用减少免疫反应性的氨基酸取代 2199、2200、2223、2227、2251 和 2252 位至少一个位点的天然存在的氨基酸。

29. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，至少一个取代的氨基酸在 2199 位。

30. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，至少一个取代的氨基酸在 2200 位。

31. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，至少一个取代的氨基酸在 2223 位。

32. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，至少一个取代的氨基酸在 2227 位。

33. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，至少一个取代的氨基酸在 2252 位。

34. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，该修饰的凝血因子 VIII 是单突变体。

35. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，该修饰的凝血因子 VIII 是双突变体。

36. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，该修饰的凝血因子 VIII 是三突变体。

37. 如权利要求 28 所述的方法，其特征在于，该修饰的凝血因子 VIII 是四突变体。

38. 如权利要求 1 所述的修饰的人凝血因子 VIII，其特征在于，该修饰的凝血因子含有在 2199 位的亮氨酸取代甲硫氨酸，2200 位的亮氨酸取代苯丙氨酸，2251 位的缬氨酸取代亮氨酸，和 2252 位的苯丙氨酸取代亮氨酸。

修饰的凝血因子 VIII

5 对相关申请的交叉参考

本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求美国临时申请号 60/236, 460, (2000 年 9 月 29 日提交) 和 60/234, 047 (2000 年 9 月 19 日提交) 的优先权, 这些专利都在此引入以供参考, 与本文公开内容一致。

10 联邦研究支持的认可

政府对导致本发明的研究通过国立卫生研究院基金编号 F01-HL46215 给予过部分资助, 因而美国政府对本发明具有权利。

发明领域

15 本发明一般涉及具有氨基酸取代的修饰哺乳动物凝血因子 VIII, 这些取代与其衍生的蛋白质或其它凝血因子 VIII 制备物, 例如人凝血因子 VIII 相比, 减少了免疫原性和/或抗原性。

发明背景

20 血液凝结从血小板粘附到损伤区域受伤血管的伤口壁上开始。然后, 在一系列酶调控的级联反应中, 可溶性纤维蛋白原分子被凝血酶转变成不溶性的纤维束, 而固定血小板形成血栓。在级联反应的每一个步骤中都有一个蛋白前体转化成的蛋白酶, 切割此系列中的下一个蛋白前体。在大多数步骤中需要辅助因子。

凝血因子 VIII 作为无活性前体在血液中循环, 和 von Willebrand 因子非共价紧密结合。凝血因子 VIII 受凝血酶或 Xa 因子蛋白水解而活化, 从而使它与 von Willebrand 因子分离, 并在级联反应中激活其促凝血功能。蛋白凝血因子 VIIIa 的活化形式是一种辅助因子, 该因子能增强凝血因子 IXa 对凝血因子 X 活化催化效率达几个数量级。

具有凝血因子 VIII 缺陷或未用凝血因子 VIII 治疗就具有抗凝血因子 VIII

抗体的人，会患失控性内出血，从而可能导致一系列严重症状，从关节炎直到早逝。严重血友病病人(在美国大约为 10,000)，可用输入人凝血因子 VIII 来治疗，如果以足够多的次数和浓度施用该因子可恢复血液正常凝血能力。凝血因子 VIII 的经典定义，实际上是指存在于正常血浆中的能够纠正血友病 A 型患者的血浆凝血缺陷的物质。

在血友病病人治疗中，抑制凝血因子 VIII 活性的抗体(“抑制剂”或“抑制性抗体”)的产生是一种严重并发症。对凝血因子治疗性输入的反应中，有大约 20 %血友病 A 型患者产生了自身抗体。在以前未治疗过的、患有血友病 A 型的病人中产生了抑制性抗体，该抑制性抗体通常在治疗一年中产生。另外，使凝血因子 VIII 失活的自身抗体偶尔也可在以前凝血因子 VIII 水平正常的人体内产生。凝血因子 VIII(fVIII)的抑制抗体(抑制剂)在 A 型血友病患者中在输入 fVIII 后作为自身抗体，或在非血友病患者中作为自身抗体产生(Hoyer, L. W. 和 D. Scandella, 1994 “凝血因子 VIII 抑制剂：结构和在自身抗体和 A 型血友病患者中和功能”，Semin. Hematol. 31:1-5)。针对 A1-A2-B-ap-A3-C1-C2 fVIII 分子中 A2、ap-A3 和 C2 结构域中的表位的抗体负责大多数抑制剂血浆中的所有抗凝血活性(Prescott, R. 等, 1997“A 型血友病患者中的抑制抗体应答比大多数具有 fVIII 自身抗体的非血友病患者复杂得多”，Blood 89:3663-3671; Barrow, R. T. 等, 2000, “用多取代杂交人/猪凝血因子 VIII 分子使凝血因子 VIII 的抗原性降低制备复杂的抑制性血浆”，Blood 95:557-561)。单链人 fVIII 中的 18-kDa C2 结构域，残基 Ser2173-Tyr2332 含有磷脂膜结合位点，是起到正常 fVIII 促凝血功能必需的。人 C2-特异性抗-fVIII 抗体抑制该作用(Arai, M. 等, 1989, “通过人抗体抑制凝血因子 VIII 的分子基础-与凝血因子 VIII 轻链结合的抗体防止磷脂与凝血因子 VIII 作用”，J. Clin. Invest. 83:1978-1984)。与此一致的是，磷脂保护 fVIII 不被 fVIII 抑制剂灭活(Arai 等, 见上; Barrowcliffe, T. W. 等, 1983, “与磷脂的结合保护凝血因子 VIII 不被人抗体灭活”，J. Lab. Clin. Med. 101:34-43)。C2 结构域还含有部分 von Willebrand 因子(vWf)结合位点(Saeko, E. L. 等, 1994, “凝血因子 C2 结构域与 von Willebrand 因子结合的作用”，J. Biol. Chem. 269:11601-11605; Saenko, E. L. 和 Scandella, D., 1997, “凝血因子 VIII 轻链酸性区域和 C2 结构域合起来形成 von Willebrand 因子的高亲和力结合位点”，J.

Biol. Chem. 272: 18007-18014)。一些抑制剂可通过干涉该作用起作用(Shina, M. 等, 1995, “人抗-C2 结构域抑制剂等位抗体对凝血因子 VIII 与 von Willebrand 因子的共同抑制作用”, Br. J. Haematol. 91:714-721; Saenko, E.L. 等, 1996, “凝血酶切割的凝血因子 VIII 通过单克隆和人抗体从 von Willebrand 因子上缓慢释放是凝血因子 VIII 抑制的新机制”, J. Biol. Chem. 271:27424-27431; Gilles, J.G. 等, 1999, “一些凝血因子 VIII (FVIII) 抑制剂识别仅在 FVIII-vwf 复合物上递呈的 FVIII 表位”, Thromb. Haemost. 82:40-45)。

如果抑制抗体的滴度足够低, 病人可通过增加凝血因子 VIII 的剂量进行治疗。然而, 往往抑制抗体的滴度很高, 以致于不能被(大量输入)凝血因子 VIII 所克服。另一治疗方案是在正常止血时, 用凝血因子 IX 复合制剂(例如, KONYNE®, Proplex®)或重组人凝血因子 VIIIa 来绕过对凝血因子 VIII 的需要。另外, 由于猪凝血因子 VIII 通常比人凝血因子 VIII 与抑制抗体的反应性要小得多, 可使用部分纯化的猪凝血因子 VIII 制剂(HYATE: C®)。许多对人凝血因子 VIII 产生抗体的病人已成功的用猪凝血因子 VIII 治疗, 并长时间耐受了这种治疗。然而, 猪凝血因子 VIII 的施用不是一种完全的解决方法, 因为一些病人在一次或多次输入后, 会对猪凝血因子 VIII 产生抑制抗体。

商品化的人血浆衍生凝血因子 VIII 的几种不同纯度的制品可用于血友病 A 型的治疗。这些制品包括: 从许多献血者的合并血液中提取的部分纯化的凝血因子 VIII, 它经过加热和洗涤剂灭活病毒处理, 但含有显著水平的抗原性蛋白原; 用单克隆抗体纯化的凝血因子 VIII, 具有更低水平的抗原性杂质和病毒污染; 以及重组人凝血因子 VIII, 它的临床试验正在进行。不幸的是, 人凝血因子 VIII 在生理浓度和 pH 时不稳定, 在血液中以极低的浓度存在(0.2µg/ml 血浆), 凝血活性比很低。人们对于病毒或其它血液携带的污染物危险的关注, 限制了从猪血纯化的猪凝血因子 VIII 的使用。

血友病病人需要每天更新凝血因子 VIII 来防止出血和所导致的变形性血友病关节病。然而, 由于分离和纯化的困难、免疫原性、以及必须排除 AIDS 和肝炎感染的危险等, 因子 VIII 的供给一直不足, 并在治疗使用中产生问题。使用重组人凝血因子 VIII 或部分纯化的猪凝血因子 VIII 也不能解决所有这些问题。

和常用的、商品可得的、血浆衍生凝血因子 VIII 有关的问题, 激发了开发

更好的凝血因子 VIII 制品的显著兴趣。需要以下更强的凝血因子 VIII 分子：每个分子能输送更多的凝血活性单位；在所选的 pH 和生理浓度下稳定的凝血因子 VIII 分子；更不易于导致抑制抗体产生的凝血因子 VIII；在已产生抗人凝血因子 VIII 抗体的病人体内能避开免疫检测的凝血因子 VIII 分子。

- 5 Lollar 的美国专利 6,180,371 描述了人凝血因子 VIII 的 A2 结构域的氨基酸取代，它改变得到的凝血因子 VIII 分子的抗原性。371 专利没有公开或提示 C2 结构域中的具体氨基酸取代，这些氨基酸取代与野生型凝血因子 VIII 或相应的重组凝血因子 VIII 相比，减少抗原性或免疫原性。

- 10 Lollar 的美国专利 5,859,204 公开了人凝血因子 VIII 的 484-509 区域内氨基酸特异置换的位点。更具体的，204 专利描述了在相对于人蛋白质位点 485、487、488、489、492、495、501 或 508 具有氨基酸取代的修饰凝血因子 VIII。204 专利未公开或提示 C2 结构域中的具体氨基酸取代，这些氨基酸取代与野生型凝血因子 VIII 或相应的重组凝血因子 VIII 相比，减少抗原性或免疫原性。

- 15 Lollar 等的美国专利 5,888,974 公开了通过分离和重组人和其它非人凝血因子 VIII 亚基或结构域杂交促凝血因子 VIII。

Lollar 等的美国专利 5,744,466 描述了在 A2 结构域具有氨基酸取代的杂交凝血因子 VIII。

- 20 Lollar 等美国专利 5,633,060 描述了杂交凝血因子 VIII，含有非人和人重链和轻链亚基的组合。美国专利 5,583,209 描述了编码 060 专利中杂交凝血因子 VIII 的核酸。

美国专利 5,364,771 描述了含有人 and 猪重和轻链亚基组合的纯化杂交凝血因子 VIII。还公开了用猪 A2 结构域交换人 A2 结构域的人凝血因子 VIII。

- 25 美国专利 6,180,371；5,888,974；5,859,204；5,744,446；5,663,060；5,583,209 和 5,364,771 (都在此引入以供参考) 未公开或提示 C2 结构域中的具体氨基酸取代，这些氨基酸取代与野生型凝血因子 VIII 或相应的重组凝血因子 VIII 相比，减少抗原性或免疫原性。尽管在全世界实验室进行了多年的广泛研究，似乎本文详述的对于凝血因子 VIII C2 结构域的发明在其它地方尚未有描述或提示。

Pratt 等(1999, “1.5Å 分辨率下的人凝血因子 VIII 的 C2 结构域结构”，Nature, 402:439-442)报道了人凝血因子 VIIC2 结构域在 1.5Å 分辨率的晶体结

构。Pratt 等报道了该结构部分解释了为什么凝血因子 VIII C2 区域的突变导致出血疾病。实际上, C2 区域中的 21 个残基已有报道是 A 型血友病患者中有害点突变的位点。例如, 已知 V2223 是发生点突变的位点, 与出血疾病有关。因此, 本领域技术人员不会预计 V2223 是取代的合适候选位点, 以提供具有治疗活性的
5 修饰凝血因子 VIII。事实上, Shima 等报道 C2 结合性抑制抗体影响凝血因子 VIII 与磷脂和 von Willebrand 因子的结合。因此, Pratt 等教导, C2 抑制抗体, 即那些与 A 型血友病患者中的出血疾病相关的抑制剂, 干涉 C2 结构域与磷脂及 von Willebrand 因子的结合。该结论与其测定的 M2199、F2200、L2251、L2252、V2223 和 R2220 出现在蛋白-磷脂界面的结果联合起来, 提示这些残基的突变将导致磷脂
10 和/或 von Willebrand 因子结合的改变, 以及出血疾病中的相关增加。这些研究不清楚哪些氨基酸残基和相应的取代将得到改良的凝血因子 VIII 分子。

出人意料的是, 本发明的发明人发现凝血因子 VIII C2 结构域近来得到的 X 光结构中鉴定的 3 疏水位的突变减少了与抑制抗体的结合, 提高了性能和/或减少了免疫原性。

15 因此, 本发明的一个目的是提供一种凝血因子 VIII, 它能在凝血因子 VIII 缺陷或具有抗凝血因子 VIII 抑制抗体的病人体内纠正血友病。

本发明的另一个目的是提供治疗血友病的方法。

本发明还有一个目的是提供在所选 pH 和生理浓度下稳定的凝血因子 VIII。

本发明还有另一个目的是提供比人凝血因子 VIII 具有更强凝血活性的凝血
20 因子 VIII。

发明简述

本发明一般涉及含有重组哺乳动物凝血因子 VIII 的组合物。本发明的组合物含有具有凝血活性的分离纯化的哺乳动物凝血因子 VIII, 其中重组凝血因子 VIII 在 C2 结构域具有氨基酸取代, 该取代与衍生出它们的蛋白质或其它凝血因
25 子 VIII 制备物相比降低了抗原性。还提供了编码本发明新组合物的 DNA 序列以及产生含有凝血因子 VIII 的新组合物的方法。治疗需要用凝血因子 VIII 治疗的病人的方法也在本发明的范围内。

本发明的第一个实施例提供了新组合物, 它含有 C2 结构域有氨基酸取代的哺乳动物重组凝血因子 VIII。该修饰的重组凝血因子 VIII 的 C2 结构域中的氨基

酸取代与衍生出它们的蛋白质或其它可得的凝血因子 VIII 制备物相比，减少了抑制抗体的抗凝血活性。该实施例的新组合物具有凝血活性，并减少与抑制抗体的结合。优选参与 fVIII 与磷脂膜和/或抑制抗体结合的残基的取代。优选与人凝血因子 VIII 同源位置的取代包括但不限于 Met2199、Phe2200、Val2223、Leu2251 和 Leu2252。该实施例的新组合物可以是一突变体、二突变体、三突变体或四突变体。本发明氨基酸取代的例子包括但不限于 Met2199Ile、Phe2200Leu、Leu2252Phe、Met2199Ile/Phe2200Leu、Val2223Ala/Lys2227Glu、Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu，这些都是根据人凝血因子 VIII 编号系统，其中氨基酸号 1 是成熟凝血因子 VIII 氨基末端的丙氨酸。优选重组的猪或人凝血因子 VIII 的取代。

本发明的第二个实施例提供了含有在 C2 结构域具有氨基酸取代的重组凝血因子 VIII 的新杂交凝血因子 VIII 组合物。该实施例的新组合物是通过制备在 C2 结构域具有氨基酸取代的杂交凝血因子 VIII 构建的。凝血因子 VIII 的其它结构域可衍生自各种哺乳动物，例如人、小鼠、猪、大鼠和犬等、该实施例的新组合物具有凝血活性，减少对抑制抗体的结合。可突变，提供该实施例的新组合物的氨基酸位置的例子包括但不限于 Met2199、Phe2200、Val2223、Leu2251 和 Leu2252，它们都是参照人凝血因子 VIII 编号。本实施例中包含的 C2 结构域中的氨基酸取代的例子包括但不限于 Met2199Ile、Phe2200Leu、Leu2252Phe、Met2199Ile/Phe2200Leu、Val2223Ala/Lys2227Glu、Met2199Ile/Phe2200Leu/-Val2223Ala/Lys2227Glu，所有都参照人凝血因子 VIII 编号。

本发明的另一个实施例提供了 DNA 序列，它们含有本发明新组合物的编码序列。本发明的另一个实施例提供了产生本发明新组合物的方法。

本发明还提供了减少凝血因子 VIII 分子的免疫原性的方法，和该方法产生的免疫原性减少的重组凝血因子 VIII。特别是，描述了修饰的重组凝血因子 VIII 分子和产生 C2 结构域具有取代免疫原性降低的分子的方法。

还提供了治疗具有凝血因子 VIII 缺陷的病人的药物组合物和方法，包括施用重组凝血因子 VIII 和其杂交形式。

附图简述

图 1. 与磷脂结合有关的可能 fVIII 残基。显示了人 (Vehar, G. A. 等, 见上,

1984; Toole, J. J. 等, 1984, “编码人抗血友病因子的 cDNA 的分子克隆”, Nature 312:342-347)、猪(Healey, J. F. 等, 1996, “猪凝血因子 VIII 的 cDNA 和衍生氨基酸序列”, Blood 88:4209-4214)、小鼠(Elder, B. 等, 1993, “小鼠凝血因子 VIII cDNA 的序列”, Genomics 16:374-379)和犬(Cameron, C. 等, 1998, “犬凝血因子 VIII cDNA 和 5' 旁侧序列” Thromb. Haemostas, 79:317-322) fVIII 的 C2 结构域序列的排列对比。人 fVIII 中的推测磷脂结合残基(Pratt, K. P. 等, 1999, “人凝血因子 VIII C2 结构域 1.5Å 分辨率的结构”, Nature 402:439-442)和同源残基的排列序列下划线, 用黑体表示。

图 2. 人 fVIII C2 结构域中的突变位点。A. 显示推测涉及磷脂膜结合的疏水残基和 Lys2227, 4 个推定带正电的结合残基之一的带状图(Pratt, K. P. 等, 1999, “1.5Å 分辨率下人凝血因子 VIII 的 C2 结构域的结构”, Nature 402:439-442)。在该研究中对 Met2199、Phe2200、Val2223、Lys2227 和 Leu2252 进行了突变。在人、猪、小鼠和犬 fVIII 中保守的 Leu2251 不突变。B. 旋转的空间填充模型, 如从膜向上看到的。

图 3. 病人多克隆抗-fVIII 抗体的 Bethesda 滴度。在 A 型血友病血浆中稀释重组 fVIII, 如“材料和方法”所述测定抗体 AA、AJ、HR、LK 和 RvR 的 Bethesda 滴度。显示的是用非线性平方回归分析确定的平均值和标准偏差。C2D1 是 Met2199Ile/Phe2200Leu 双突变。C2 D2 是 Val2223Ala/Lys2227Glu 双突变。C2 Q 是 Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu 四突变。HP20 是无 B 结构域的杂交人/猪 fVIII 分子, 含有人 A1、A2、ap-A3 和 C1 结构域以及猪 C2 结构域。突变体和 HB 之间的差异的置信水平在 99.9%水平标为“**”, 在 99%水平标为“*”。NS 是不显著。

图 4. 病人单克隆抗体 B02C11 的 Bethesda 滴度。缩写和注释如图 3 的图例说明所述。

图 5. 小鼠单克隆抗体 NMC VIII-5 的 Bethesda 滴度。缩写和注释如图 3 的图例说明所述。

发明详述

本发明一般涉及含有重组哺乳动物凝血因子 VIII 的组合物。本发明的组合物含有具有凝血活性的分离重组的哺乳动物凝血因子 VIII。惊人的是, 发现凝血

因子 VIII C2 结构域中,在近来得到的 X 光结构中识别的三个疏水足中的突变,与衍生出突变的蛋白质和/或其它凝血因子 VIII 制备物相比,减少了突变物与抑制抗体的结合。因此,本发明的新组合物含有在 C2 结构域具有氨基酸取代的重组凝血因子 VIII,该取代与衍生出取代的蛋白质相比,减少了抗原性。另外,本发明还提供了在 C2 结构域具有氨基酸取代的重组凝血因子 VIII,它与其它凝血因子 VIII 制备物相比,减少了抗原性。本发明相关的实施例提供了治疗需要凝血因子 VIII 治疗的病人的方法,产生本发明新重组凝血因子 VIII 组合物的方法,含有新重组凝血因子 VIII 蛋白质的编码序列的 DNA 序列,和含有新凝血因子 VIII 蛋白质的药物组合物。

10 本发明还提供了活性重组杂交凝血因子 VIII 分子或其片段、编码这些杂交物的核酸序列,制备和分离它们的方法,和确定它们的特征的方法。这些杂交物含有人/动物、动物/动物或其它杂交凝血因子 VIII 分子,还在 C2 结构域具有至少一种特定的氨基酸序列,包括用一个物种的凝血因子 VIII 的一个或多个独特氨基酸取代其它物种的凝血因子 VIII 的相应氨基酸序列(或氨基酸);或在 C2 结构域含有至少一种序列,包括用与凝血因子 VIII 没有已知序列同一性的一个或多个氨基酸取代人、动物或杂交凝血因子 VIII 中的特定氨基酸序列。得到的重组杂交凝血因子 VIII 与人或猪凝血因子 VIII 相比,对凝血因子 VIII 抑制抗体免疫反应性降低或消失。

“对应的”核酸或氨基酸或两者的序列,如本文所用,是存在于凝血因子 VIII 或其片段中任一位点上的序列,和其它动物的凝血因子 VIII 分子一位点的序列有相同结构和/或功能,虽然核酸或氨基酸编号可能不相同。和另一凝血因子 VIII 序列“对应”的 DNA 序列和这样的序列实质上相对应,并能和指定 SEQ ID NO 的序列在严格条件下杂交。和另一凝血因子 VIII 序列“对应”的 DNA 序列还包括导致凝血因子 VIII 或其片段表达的序列,以及除非基因密码子的冗余,能与指定 SEQ ID NO 杂交的序列。

“独特的”氨基酸残基或序列,如本文所用,指在一种动物凝血因子 VIII 分子中,和其它动物的凝血因子 VIII 分子中的同源残基或序列不同的氨基酸序列或残基。

“比活性”,如本文所用,指能纠正人凝血因子 VIII 缺陷血浆的凝血缺陷

的活性。比活性通过标准试验中每毫克总凝血因子 VIII 蛋白的凝血活性单位来衡量，其中将人凝血因子 VIII 缺陷血浆的凝血时间和正常人血浆的作比较。一单位凝血因子 VIII 活性等于一毫升正常人血浆中存在的活性。在该试验中，血块形成的时间越短，被测定的凝血因子 VIII 的活性越大。猪凝血因子 VIII 在人凝血因子试验中具有凝血活性。

“表达”意味着发生的一组过程，通过其利用遗传信息获得产物。编码猪凝血因子 VIII 的氨基酸序列的 DNA 可以在哺乳动物宿主细胞中“表达”，获得修饰的凝血因子 VIII 蛋白。材料、基因结构、宿主细胞和允许给定的 DNA 序列发生表达的条件是本领域熟知的，并可操纵，影响表达的时间和量，以及表达蛋白在胞内或胞外的位置。例如，通过在编码猪凝血因子 VIII 的 DNA 5' 末端加上信号肽(常规上 5' 末端是编码蛋白质的 NH₂ 的末端)DNA，使表达的蛋白从宿主细胞，内部输出到培养基中。提供编码信号肽的 DNA 与编码猪凝血因子 VIII 的 DNA 相联合是有利的，因为表达的凝血因子 VIII 被运出细胞，简化了纯化过程。优选的信号肽是哺乳动物凝血因子 VIII 信号肽。

人凝血因子 VIII cDNA 核苷酸和预计的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID Nos:1 和 2。合成的凝血因子 VIII 大约为 300kDa 的单链蛋白，具有确定“结构域”序列 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH 的内部序列同源性。在凝血因子 VIII 分子中，“结构域”，如本文中所用，是由内部氨基酸序列相同性和凝血酶蛋白水解切割的位点所界定的一段连续氨基酸序列。除非另有指定，当该序列和人氨基酸序列(SEQ ID NO: 2)排比对齐时，凝血因子 VIII 结构域包括以下氨基酸残基：A1, 残基 Ala1-Arg372; A2, 残基 Ser373-Arg740; B, 残基 Ser741-Arg1648; A3, 残基 Ser1690-Ile2032; C1, 残基 Arg2033-Asn2172; C2, 残基 Ser2173-Tyr2332。A3-C1-C2 序列包括残基 Ser1690-Tyr2332。剩余区段，残基 Glu1649-Arg1689, 常被称为凝血因子 VIII 轻链活化肽。凝血因子 VIII 被凝血酶或凝血因子 Xa 水解而活化，它们使凝血因子 VIII 与 von Willebrand 因子分离，形成凝血因子 VIIIa，它具有促凝血功能。凝血因子 VIIIa 的生物功能是增强凝血因子 IXa 对因子 X 活化的催化效率达几个数量级。凝血酶所活化的凝血因子 VIIIa 是一种 160kDa 的 A1/A2/A3-C1-C2 异质性三聚体，即与因子 IXa 和因子 X 在血小板或单核细胞表面形成的一种复合物。本文所用的“部分结构域”是形成某结构域一部分的一段连续氨基酸

序列。

人或动物凝血因子 VIII 的“亚基”，如本文所用，是该蛋白的重链或轻链。凝血因子 VIII 重链含有 3 个结构域，A1，A2，和 B。凝血因子 VIII 轻链也含有 3 个结构域，A3，C1 和 C2。

- 5 术语“表位”、“抗原性位点”和“抗原决定簇”，如本文所用是同义的，定义为被抗体特异性识别的人或动物凝血因子 VIII 或其片段的一部分。它可由任一编号的氨基酸残基组成，而且依赖于该蛋白的一级、二级、或三级结构。

- 术语“免疫原性位点”，如本文所用，定义为人或动物凝血因子 VIII、或其片段中的一个区域，当用常规方法例如免疫试验（例如本文所述的 ELISA 或
10 Bethesda 试验）测定时，它在人或动物中能特异性诱导产生抗凝血因子 VIII、或其片段的抗体。它可由任一编号的氨基酸残基组成，而且它依赖于蛋白的一级、二级、和三级结构。在一些实施例中，杂交或杂交的等价凝血因子 VIII 或其片段在动物或人中不具免疫原性或比人或猪的凝血因子 VIII 免疫原性低。

- “凝血因子 VIII 缺陷”。如本文所用，包括产生有缺陷的凝血因子 VIII，
15 或凝血因子 VIII 产生不足或不产生，或抑制抗体部分或完全抑制了凝血因子 VIII 等引起的凝血活性缺陷。血友病 A 型是一类由 X-连锁基因中的缺陷和其编码的凝血因子 VIII 蛋白的缺失或缺陷造成的凝血因子 VIII 缺陷。

- 本文所用的术语“诊断实验”包括以一些方式，利用抗原-抗体相互作用来检测和/或定量存在于测试样品中的特定抗体量，帮助选择药物治疗。有许多这类
20 试验是本领域技术人员知道的。本文所用的完整或部分的人、猪或修饰的猪因子 VIII DNA 或其片段和其表达的蛋白质，可以取代其它已知实验中的相应试剂，从而可用改变的实验来检测和/或定量抗凝血因子 VIII 的抗体。使用这些试剂、凝血因子 VIII DNA 或其片段或其表达的蛋白质，能够改进检测人或动物凝血因子 VIII 抗体的已知试验。这些实验包括但不限于 ELISA、免疫扩散实验和免疫印迹。
25 进行任一这些实验的合适的方法是本领域技术人员已知的。本文所用的包括蛋白质的至少一种表位的凝血因子 VIII 或其片段可用作诊断试剂。可使用人、猪或修饰的猪凝血因子 VIII 或其片段的其它实验的例子包括 Bethesda 试验和抗凝血试验。

 术语“编码蛋白质，例如猪凝血因子 VIII 的 DNA”意味着一种多脱氧核酸，

其核苷酸序列对于宿主细胞来说,根据已知的遗传密码的关系含有蛋白质,例如猪凝血因子 VIII 的氨基酸序列的编码信息。

编码人或动物的凝血因子 VIII 或修饰的凝血因子 VIII 的 DNA 的“表达产物”是通过在合适的宿主细胞中表达所提到的 DNA 获得的产物,包括特征:所提到的 DNA 编码的蛋白质的翻译前后的修饰,包括但不限于糖基化、蛋白酶解切割等。本领域已知可产生这些修饰并可能有某些差别,这取决于宿主细胞类型和其它因素,并可导致产物的分子同工型,保留促凝血活性。见例如 Lind, P. 等, Eur. J. Biochem. 232:1927(1995), 在此引入以供参考。

“表达载体”是一种 DNA 元件,通常是环形结构,具有在理想的宿主细胞中自主复制,或整合到宿主细胞基因组中,并具有一些熟知的特征,允许在正确的位点和以正确取向插入载体序列的编码 DNA 表达。这些特征可以包括但不限于一个或多个指导编码的 DNA 转录起始的启动子序列,和其它的 DNA 元件,例如增强子、聚腺苷酸位点等,全部都是本领域熟知的。术语“表达载体”用于指在其序列中插入了要表达的 DNA 编码序列的载体,和必要的表达控制元件,和一个插入位点,可以起到表达任何插入该位点的编码 DNA 的载体,所有都是本领域熟知的。因此例如,缺乏启动子的载体可以通过插入与编码 DNA 连结的启动子变成表达载体。

凝血因子 VIII 中减少抑制抗体结合的突变的发现

近来,报道了人 fVIII C2 结构域的 1.5Å X 光结构(Pratt, K. P. 等, 1999, “1.5Å 分辨率下的人凝血因子 VIII 的 C2 结构域结构”, Nature, 402:439-442)。该结构的检测揭示了三个接触溶剂的疏水“足”,由 Met2199/Phe2200、Val2223 和 Leu2251/Leu2252 组成。带正电的残基环,包括 Arg2213、Arg2220、Lys2227 和 Lys2249 围绕这些残基。该基序提示膜结合包括疏水足插入膜双层,通过与带负电的磷脂静电作用稳定。

大多数 fVIII 抑制抗体与猪的 fVIII 有弱交叉反应。该观察导致用一系列在人 fVIII C2 结构域中包含猪取代基的构建体,对 C2 表位的主要决定簇作图,确定在残基 Glu2181-Val2243(Healey, J. F. 等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2 结构域中抑制表位的主要决定簇”, Blood 92:3701-3709)。在本发明中,猪、小鼠或犬 fVIII 中与人 fVIII 的 Met2199、Phe2200、Val2223、

Lys2227 和/或 Leu2252 同源的残基用作建立一系列重组 fVIII 分子的基础。观察到与 Met2199、Phe2200 和 Leu2252 处突变有关的抗原性的显著减少,表明这些残基参与 fVIII 与磷脂膜的结合,而且常参与同抑制抗体结合。

- 图 1 显示了人、猪、小鼠和犬 fVIII C2 结构域的排列对比。5 个推测的疏水
5 磷脂结合残基中的 4 个,有一个物种与人 fVIII 不同: Met2199→Ile(猪)、Phe2200
→Leu(犬)、Val2223→Ala(犬)和 Leu2252→Phe(小鼠)。在 4 种推测的碱性残基
中只有一种不同, Lys2227→Glu(猪)。因此,在无 B 结构域的人 fVIII 中制造了
Met2199Ile、Phe2200Leu、Val2223Ala、Leu2252Phe 和 Lys2227Glu 单突变体。
另外,制造了两个双突变体 Met2199Ile/Phe2200Leu(称为 C2 D1)和
10 Val2223Ala/Leu2252Phe(C2 D2), 和四突变
Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Leu2252Phe(C2 Q)。图 2 显示了 fVIII 的 X
光结构中突变残基的位置。Met2199/Phe2200 和 Leu22251/Leu2252 从两个β-发夹
环上突出。Val2223 从邻近的环突出,靠近 Lys2227。

- 突变体在无血清培养的幼仓鼠肾衍生的细胞系中稳定表达,然后部分纯化。
15 根据 ELISA 试验的杂交物的比凝血活力相当于或高于“材料和方法”中所述的 HB
的活力,表明适合抗原性研究。用“材料和方法”中所述的 Bethesda 试验测定突
变体与 C2 特异性 fVIII 抑制抗体的作用。结果与无 B 结构域 fVIII(HB-)和杂交
人/猪 fVIII 分子、HP20(用整个猪 C2 结构域取代的人的分子)比较(Healey, J. F.
等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2 结构域中抑制性表
20 位的主要决定簇”, Blood 92:3701)。

- 大多数 fVIII 抑制抗体是针对 C2 结构域内和外的表位的多克隆 IgG 群
(Prescott, R. 等, 见上, 1997; Fulcher, C. A. 等, 1985, “人凝血因子 VIII 抑
制剂表位定位于两个多肽片段”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7728-7732)。
然而,一些抑制抗体是 C2-特异性的,并且用于评估 C2 结构域中的非人序列取代
25 的作用(Healey, J. F. 等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2
结构域中抑制表位的主要决定簇”, Blood 92:3701)。在这些研究中实验使用来
自 5 个病人 AA、AJ、HR、LK、RvR 的 C2-特异性多克隆抑制抗体(图 3)。均观察到
由于 Met2199、Phe2200、和/或 Leu2252 突变导致的抗原性减少,虽然各抑制剂
所识别的残基不同。惊人的是,常常在 Bethesda 滴度中有显著增加,特别是用

Val2223Ala 突变体。双突变体 Met2199Ile/Phe2200Leu 显示对所有 5 种抗体抗原性都低，与 Met2199Ile 和/或 Phe2200Leu 的抗原性总是被减少的事实一致。反常的是，双突变体 Val2223Ala/Lys2227Glu 显示针对全部 5 种多克隆抗体的抗原性减少，甚至在三种情况下(AA、AJ 和 HR)，对应的各突变显示未变或提高的抗原性。

5 四突变体 Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu 的抗原性相当于或低于一或二突变体。HP20 的抗原性是所有突变体最低的。除了在该研究中不突变的 Met2199、Phe2200、leu2252 外的这些抗原性残基的存在一致。

图 4 和 5 分别显示了抗体 B02C11 (Jacquemin, M. G. 等, 1998, “凝血因子 VIII 灭活的机制和动力学：用衍生自 A 型血友病病人的 IgG4 单克隆抗体和抑制剂的研究”，Blood 92:496-506)和 NMC VII-5(Shima, M., D. 等, 1993, “识别 C2 结构域的凝血因子 VIII 中和性单克隆抗体和人抑制性同种抗体抑制凝血因子 VIII 与 von Willebrand 因子和磷脂酰丝氨酸的结合”，Thromb. Haemost 69:240-246)对 HB 和突变 fVIII 分子的 Bethesda 滴度。B02C11 是一种衍生自 A 型血友病抑制病人转化的 B 细胞的 C2-特异性人 IgG4 κ 单克隆抗体。这是迄今克隆到的唯一——

15 种 C2-特异性人抗体。B02C11 和 NMC VIII-5 都识别 fVIII 的 C2 结构域，并抑制 fVIII 与 vWF 和磷脂的结合。NMC VIII-5 可与人多克隆抑制抗体竞争与 fVIII 的结合。用 B02C11 和 NMC VIII-5 的结果与使用多克隆抗体 HR 获得的结果是相似的(图 3)。在所有三种抗体中，Phe2200 是抗原性的，而 Val2223 和 Lys2227 似乎减少抗原性。

20 Met2199、Phe2200 和/或 Leu2252 的突变与所测试的 7 种抗体大多数中的抗原性低下有关(表 1)，常常是显著的(图 3-5)。这与 Met2199/Phe2200 和 Leu2251/Leu2252 环参与膜结合的假设一致。即使所有 7 种抑制抗体都识别 M2199/Phe2200 环，但 Met2199 和 Phe2200 的突变的效果常常是不同的。例如，Met2199Ile 显示抗原性下降，而 Phe2200Leu 显示对抗体 AJ 的抗原性上升，而对

25 于 B02C11 正相反。因此 AJ 和 B02C11 的氨基酸特异性是不同的，虽然都识别 Met2199/Phe2200 环。

先前，用一系列重组人/猪杂交 fVIII 分子作图显示了 C2 表位的主要决定簇，位于以残基 Glu2181-Val2243 为边界的区段中(Healey, J. F. 等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2 结构域中抑制表位的主要决定簇”，

Blood 92:3701-3709)。Met2199/Phe2200 环包含在该区域中。该分析既不包含也不排除 Leu2251/Leu2252 环, 因为猪 fVIII 也在残基 2251 和 2252 含有亮氨酸。整个猪 C2 结构域取代入人 fVIII, 产生称为 HP20 的分子, 它与本研究中所作的多个更有限的取代的抗原性更低有关(图 3-5)。这表明在 Met2199/Phe2200 和

5 Leu2251/Leu2252 环外还有与 C2 抑制抗体结合有关的残基。

近来, 报道了在不存在磷脂下, 凝血因子 V C2 结构域两种构型的 X 光结构(Macedo-Ribeiro, S. 等, 1999 “人凝血因子 V 膜结合 C2 结构域的晶体结构”, Nature 420:434-439)。作者提出了一种磷脂膜结合模型, 涉及在 26 和 27 位(人凝血因子 V C2 结构域编号)含有色氨酸的环, 与 fVIII 中的 Met2199 和 Phe2200

10 同源。存在大量证据支持该环与磷脂膜结合有关。一种封闭凝血因子 V 与 PS 结合的抑制性单克隆抗体 HV-1 作图与该环结合(Kim, S. W. 等, 2000, “用丙氨酸扫描诱变在人凝血因子 C2 结构域中鉴定功能上重要的氨基酸残基” Biochemistry 39:1951-1958; Ortel, T. L. 等, 1994 “用重组嵌合体在凝血因子 V 的第二 C 型结构域中定位功能上重要的表位”, J. Biol. Chem. 269:15898-15905; Ortel, T. L.

15 等, 1998, “抑制性抗凝血因子 V 抗体与凝血因子 V C2 结构域结合, 与出血性表现有关”, Blood 91:4188-4196)。用丙氨酸取代凝血因子 Va 中相当于 Trp26 和 Trp27 的残基和与 PS 的结合下降, 凝血活性丧失有关(Kim, S. W. 等, 2000, “用丙氨酸扫描诱变在人凝血因子 C2 结构域中鉴定功能上重要的氨基酸残基” Biochemistry 39:1951-1958)。

20 另外, 含有与 fVIII 的 Leu2251 同源的 Leu79 的环和含有残基 Asn41-Asn51 的环也被提出, 由于靠近 Trp26/Trp27 环, 参与磷脂膜结合(Macedo-Ribeiro, S. 等, 1999 “人凝血因子 V 膜结合 C2 结构域的晶体结构”, Nature 420:434-439)。与 Asn41-Asn51 环同源的 fVIII 区段, His2076-Asn2082, 没有被提出是磷脂膜结合位点(Pratt, K. P., 1999, “1.5Å 分辨率下的人凝血因子 VIII 的 C2 结构域结

25 构”, Nature, 402:439-442)。相反, 凝血因子 V 中与 fVIII 的 Val2223 环同源的环未被提出参与磷脂膜结合。在该研究中。将 Val2223Ala 和 Lys2227Glu 突变与抗原性增加联系(表 1)。因此, 这些结果不支持这些残基参与膜结合的假说。然而, 可能它们确实和磷脂结合, 但不常作为抑制性抗体的目标。

两种凝血因子 V C2 结构具有不同的构型, 称为“开放”和“闭合”构型,

与 Trp26 和 Trp27 在磷脂膜结合位点的主要运动有关。有人提出这些状态被认为是分别开关磷脂膜结合状态(Macedo-Ribeiro, S., 见上, 1999)。由于 Val2223 和 Lys2227 残基稳定了 fVIII 中与低亲和性膜和抗体结合有关的“闭合”构型状态, 与其有关的抗原性可能下降。Val2223Ala 和 Lys2227Glu 突变松弛了该状态, 然后导致高亲核性抗体结合。另外, Val2223 和 Lys2227 可简单的干扰涉及与其它 fVIII 残基(例如 Met2199、Phe2200 等)的高亲和力接触的抗原-抗体锁-钥匙相互作用。

与多克隆抑制抗体比较, 人 C2-特异性单克隆抗体 B02C11 是重要的, 因为在多克隆抑制抗体的分析中会有异源性混淆。B02C11 的功能特征与小鼠单克隆抗体 NMC VIII-5 相似。两种抗体都抑制 VIII 与 PS 和 vWF 的结合, 并促进 fVIII-vWF 复合物分离(Jacquemin, M. G. 等, 1998, “凝血因子 VIII 灭活的机制和动力学: 用衍生自 A 型血友病病人的 IgG4 单克隆抗体和抑制剂的研究”, Blood 92:496-506; Shima, M., D. 等, 1993, “识别 C2 结构域的凝血因子 VIII 中和性单克隆抗体和人抑制剂等位抗体抑制凝血因子 VIII 与 von Willebrand 因子和磷脂酰丝氨酸的结合”, Thromb. Haemost 69:240-246)。这些结果标示, Phe2200 而不是 Met2199, 是两种抗体识别的表位的一个重要部分(图 4 和 5)。然而, NMC VIII-5 识别 Leu2252, 而 B02C11 不识别。Val2223 和 Lys2227 都减少与两种抗体的抗原性。因此, B02C11 和 NMC VIII-5 似乎识别重叠而不相同的表位。

从由于接触巴斯德法热消毒的 fVIII 产品, CPS-A, 引起抑制剂“流行病”的 A 型血友病病人获得 RvR 抗体(Sawamoto, Y. 等, “C2 结构域限制先前不用抑制剂治疗的 A 型血友病病人的巴斯德法热消毒产品凝血因子 VIII CPS-P 产生的抑制性抗体的表位特异性”, Thromb. Haemostas, 79:62-68)。在 1990 和 1991, 在荷兰和比利时, 几个先前不用抑制剂治疗的病人在接触该产品后迅速产生了 C2-特异性抗体。RvR 抗体封闭 VIII 与 PS 和 vWF 的结合(Sawamoto, Y. 等, 见上, 1998)。

RvR 表位定位于大多数 C2 抑制抗体识别的 fVIII C2 结构域的 N 末端, Glu2181-Val2243 区(Healey, J. F. 等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2 结构域中抑制表位的主要决定簇”, Blood 92:3701-3709)。该研究中的高分辨率作图表明 RvR 是一种典型的 C2 抑制抗体, 主要识别 Met2199/Phe2200 和 Leu2251/Leu2252 环。因此, 与 CPS-A 有关的免疫原性似乎是由于正常免疫优势

表位的免疫识别，而非产生新表位。

方法的一般描述

美国专利 5,364,771 描述了发现具有凝血活性的杂交人/猪凝血因子 VIII，其中人或猪的凝血因子 VIII 分子元件取代其它物种的凝血因子 VIII 的对应元件。

- 5 美国专利 5,663,060 描述了促凝血杂交人/动物和杂交等价的凝血因子 VIII 分子，其中一种物种的凝血因子 VIII 分子的元件取代其它物种的凝血因子 VIII 分子的对应元件。

- 由于目前的信息表示，B 结构域没有抑制性表位，对凝血因子 VIII 功能没有已知作用，在一些实施例，用任何本文所述的方法制备的活性杂交物或杂交等价凝血因子 VIII 分子或其片段中，B 结构域完全或部分缺失(“B(-)凝血因子 VIII”)。
- 10

- 如 Toole, J. J. 等 (1984) *Nature* 312:342-347 (Genetics Institute); Gitschier, J. 等 (1984) *Nature* 312:326-330 (Genentech); Wood, W. I. 等 (1984) *Nature* 312:330-337 (Genentech); Vehar, G. A. 等 (1984) *Nature* 312:337-342 (Genentech); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; 美国专利号 4,757,006, 所报道分离人凝血因子 VIII, 并在哺乳动物细胞中表达, 从 cDNA 推导氨基酸序列。美国专利号 4,965,199, (Capon 等) 公开了用于在哺乳动物宿主细胞中产生凝血因子 VIII 并纯化人凝血因子 VIII 的重组 DNA 方法。已报道了在 CHO(中国仓鼠卵巢)细胞和 BHKC(乳仓鼠肾细胞)中人凝血因子 VIII 的表达。修饰人凝血因子 VIII 除去部分或所有的 B 结构域(美国专利号 4,868,112), 并尝试了用人凝血因子 V 的 B 结构域替代凝血因子 VIII 的 B 结构域(美国专利号 5,004,803)。编码人凝血因子 VIII 的 cDNA 序列和预计的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NO: 1 和 2。在 SEQ ID NO:1 中, 编码区始于核苷酸位置 208, 三联体 GCC 是 SEQ ID NO:2 给出的成熟蛋白质的氨基酸号 1(Ala)的密码子。
- 15
- 20

- 25 从血浆中分离并纯化了猪凝血因子 VIII [Fass, D. N. 等 (1982) *Blood* 59:594]。与 N-末端轻链序列部分对应的猪凝血因子 VIII 的部分氨基酸序列, 和血浆铜蓝蛋白及凝血因子 V 具有同源性, 由 Church 等 (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6934 所述。Toole J. J. 等 (1984) *Nature* 312:342-347 描述了猪凝血因子 VIII 的 4 个氨基酸片段的 N-末端的部分测序, 但

关于它们在凝血因子 VIII 分子中的位置未作特征分析。猪凝血因子 VIII 的 B 结构域和部分 A2 结构域的氨基酸序列见 Toole, J. J. 等(1986) *Proc. Natl. Acad. Sci, USA* 83:5939-5942 报道。编码猪凝血因子 VIII 整个 A2 结构域的 cDNA 序列和预测的氨基酸序列, 以及具有所有结构域、所有亚基、和特异性氨基酸序列被取代的杂交人/猪凝血因子 VIII 公开于 1994 年 11 月 15 日公告的美国专利号 5,364,771(题为“杂交的人/猪凝血因子 VIII”)和 1993 年 10 月 14 日出版的 W093/20093 中。编码和成熟的人凝血因子 VIII 的残基 373-740(如 SEQ ID NO: 1 中所示), 相应猪凝血因子 VIII A2 结构域的 cDNA 序列, 以及预测的氨基酸序列分别显示于 SEQ ID NO: 3 和 4 中。最近, 1994 年 5 月 26 日出版的 W0 94/11503 中报道了猪凝血因子 VIII 缺乏开始的 198 个氨基酸的 A1 结构域部分和 A2 结构域的核苷酸和对应的氨基酸序列。Lollar 等最后获得了整个编码猪凝血因子 VIII, 包括完整的 A1 结构域、活化肽、A3、C1 和 C2 结构域的完整核苷酸序列以及编码的氨基酸序列, 如 1999 年 1 月 12 日公开的美国专利 5,859,204 和 1997 年 12 月 31 日出版的 W0 97/49725 所公开的, 两者在此引入以供参考。

从血浆中分离的猪和人凝血因子 VIII 都为二亚基蛋白质。该二亚基, 即重链和轻链, 通过非共价键结合, 该键需要钙或其它二价金属离子。凝血因子 VIII 重链含有 3 个结构域, A1, A2, 和 B, 它们共价连接。凝血因子 VIII 的轻链也含有 3 个结构域, 命名为 A3, C1, 和 C2。B 结构域生物学功能不知道, 故可通过蛋白水解或通过重组 DNA 技术方法从分子中除去, 而不显著改变凝血因子 VIII 的任一可测定参数。人重组凝血因子 VIII 和血浆衍生的凝血因子 VIII 有相似的结构和功能, 虽然除非在哺乳动物细胞中表达, 否则不会糖基化。

人和猪的已活化凝血因子 VIII (“凝血因子 VIIIa”) 由于重链在 A1 和 A2 结构域之间切开, 具有 3 个亚基。这个结构被命名为 A1/A2/A3-C1-C2。人凝血因子 VIIIa 在能稳定猪凝血因子 VIIIa 的条件下不稳定, 可能是由于人凝血因子 VIIIa A2 亚基的较弱联合。人和猪凝血因子 VIIIa 的 A2 亚基的解离(丢失)和凝血因子 VIIIa 分子活性的丧失相关联。Yakhyev, A. 等(1997) *Blood* 90: 增刊 1, 摘要#126, 报道了 A2 结构域与低密度脂蛋白受体相关的蛋白质结合, 提示这种结合介导的细胞摄入 A2 起到下调凝血因子 VIII 活性的作用。

“无 B 结构域的凝血因子 VIII”的表达通过加入 B 结构域增强。报道了加入

这些称为“SQ”的 B 结构域部分报道导致理想的表达[Lind, P. 等(1995)见上]。“SQ”构建物缺乏全部人 B 结构域,除了 B 结构域 N-末端的 5 个氨基酸和 B 结构域 C 末端的 9 个氨基酸。

- 5 可通过标准试验,例如,无血浆凝血因子 VIII 试验,一级凝血试验,和采用纯化的重组人凝血因子 VIII 作为标准的酶联免疫吸附试验,测定已纯化和修饰的凝血因子 VIII 或其片段的免疫反应性和凝血活性。

- 根据熟练技术人员的偏爱和判断,可用其它载体包括质粒和真核病毒载体在真核细胞中表达重组基因构建物(见,例如, Sambrook 等, 16 章)。可用其它载体和表达系统,包括细菌,酵母菌,和昆虫细胞系统,但因为糖基化的不同或缺少,10 不是优选的。

可在各种常用于培养和重组哺乳动物蛋白表达的细胞中表达重组杂交凝血因子 VIII 蛋白。特别是,已发现许多的啮齿类细胞系是表达大型蛋白的特别有用的宿主。优选的细胞系,可得自美国典型培养物保藏中心, Rockville, MD, 包括乳仓鼠肾细胞,和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,它们可用常规程序和培养基培养。

- 15 猪凝血因子 VIII 更强的凝血活性的基础,看来是由于人凝血因子 VIIIa 的 A2 亚基比猪凝血因子 VIIIa 的猪 A2 亚基更快的自发解离。A2 亚基的解离导致活性的丧失[Lollar, P. 等 (1990) *生物化学杂志* 265:1688-1692; Lollar, P. 等 (1992) *生物化学杂志* 267:23652-23657; Fay, P. J. 等 (1992) *生物化学杂志* 267:13246-13250]。

- 20 具有减弱的免疫反应性的凝血因子 VIII:

- 根据已知的凝血因子 VIII 的结构-功能关系,已确定了与抑制凝血因子 VIII 凝血活性的抗体(“抑制剂”或“抑制性抗体”)具有免疫反应性的表位特征。推测抑制性抗体可能是通过破坏与凝血因子 VIII 结构域结构有关的大分子相互反应,或破坏它与 von Willebrand 因子,凝血酶,凝血因子 Xa, 凝血因子 Ixa, 或25 凝血因子 X 结合而产生效果。然而,大多数抗人凝血因子 VIII 抑制性抗体是通过与位于凝血因子 VIII 的 40kDa A2 结构域或 20kDa C2 结构域的表位结合而起作用,导致破坏和这些结构域有关的特异性功能,如 Fulcher 等 (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 82:7728-7732; 和 Scandella 等, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85:6152-6156 所述。除了 A2 和 C2 表位,可能在凝血

因子 VIII 轻链的 A3 或 C1 结构域中有第三个表位, 参见 Scandella 等(1993) *Blood* 82:1767-1775。该假定的第三表位的意义未知, 但看来它在凝血因子 VIII 中占据了表位反应性的一个微小部分。

抗-A2 抗体阻断了凝血因子 X 活化, 如 Lollar 等(1994) *J. Clin. Invest.* 93:2497-2504 所示。Ware 等(1992) *Blood Coagul. Fibrinolysis* 3:703-716 描述了先前用缺失诱变进行的作图研究, 将 A2 表位定位于 40kDa A2 结构域 NH₂-末端 20kDa 区域内。竞争性免疫放射试验表明 A2 抑制性抗体识别一个共有表位或紧密成簇表位, 如 Scandella 等(1992) *Throm. Haemostas* 67:665-671 所述, 以及如美国专利 5,859,204 中所显示的。

10 可在临床试验中, 在人体中测试修饰的凝血因子 VIII 分子减弱的抗原性和/或免疫原性。在一类试验中, 设计成测试凝血因子 VIII 是否与抑制抗体起免疫反应, 对约 25 个具有凝血因子 VIII 缺陷, 并具有抑制治疗性人凝血因子 VIII 的凝血活性的抗体的病人, 施用凝血因子 VIII, 优选通过静脉灌注。动物或修饰的动物凝血因子 VIII 的剂量是 5 到 50 单位/公斤体重, 优选 10-50 单位/公斤, 最优选为 40 单位/公斤体重。在每次给药后约 1 个小时, 在一步凝血试验中测定血样中凝血因子 VIII 的回收。在灌注约 5 小时后再次取样, 测定回收。样品的总回收和凝血因子 VIII 的消失速率可以预测抗体滴度和抑制活性。如果抗体滴度高, 凝血因子 VIII 的回收通常不能测定。将回收结果与用血浆衍生的人凝血因子 VIII、重组人凝血因子 VIII、血浆衍生的猪凝血因子 VIII 和其它常用的凝血因子 VIII 20 的治疗形式或凝血因子 VIII 替代品治疗的病人的回收结果比较。

在鉴定了临床上重要的表位后, 可表达具有与血浆衍生的猪凝血因子 VIII 比较, 当在体外测试时对于广泛调查抑制抗体血浆时, 具有较低或相等的交叉反应性的重组凝血因子 VIII。可以进行表位区域中的其它诱变, 来减少交叉反应性。降低交叉反应性虽然理想, 但不一定能产生可能比现有的血浆衍生的猪凝血因子 25 浓缩物有利的产品, 现有的猪凝血因子浓缩物可能产生副作用, 由于污染了猪蛋白质或污染了感染因子, 例如病毒或朊病毒。而重组的或修饰的猪凝血因子 VIII 分子将不含外源猪蛋白。

诊断试验

凝血因子 VIII cDNA 和/或由它表达的蛋白, 可全部或部分作为诊断试剂用

于检测抗人或动物凝血因子 VIII 的抑制性抗体，或检测基质(包括例如，凝血因子 VIII 缺陷的病人血清和体液样品)中抗修饰的动物凝血因子 VIII 的抑制性抗体。这些抗体试验包括例如 ELISA 试验，免疫印迹法，放射性免疫试验，免疫扩散试验，和凝血因子 VIII 生物活性试验(例如，用凝血试验)。制备这些试剂的技术和使用它们的方法为本领域熟练技术人员公知。例如，检测病人血清样品中抑制性抗体的免疫试验可包括使测试样品和足量的要测试的凝血因子 VIII 反应，要测试凝血因子 VIII 是抗原性的，可以与样品中的抑制抗体形成可检测的复合物。

核酸和氨基酸探针可根据修饰的凝血因子 VIII cDNA 或蛋白分子或其片段的序列来制备。在一些实施例，这些探针可用商业可得的染料或酶，荧光，化学发光，或放射性标记物标记。氨基酸探针可用于，例如，筛选受到怀疑的血清或其它体液中存在的抗人，动物，或人/动物杂交凝血因子 VIII 的抑制抗体。可定量测定病人中的抑制抗体水平，和健康对照比较，并可用来，例如，确定凝血因子 VIII 缺陷的病人是否能用动物或修饰的动物凝血因子 VIII 治疗。cDNA 探针可用于，例如，筛选 DNA 文库的研究目的。

15 重组凝血因子 VIII 的制备

可使用真核蛋白表达系统制备重组凝血因子 VIII。一般用含有缺陷的基因和要表达的重组 DNA 的载体，转化所需基因有缺陷的真核细胞系。可用电穿孔或病毒传递等技术实现转化。用于产生蛋白的细胞系应与感兴趣的蛋白质相容，能连续表达感兴趣的蛋白质，并且能在有利于感兴趣蛋白质纯化的培养基上生长，以及本领域技术人员已知的因素。这些技术的例子公开于欧洲专利申请 0 302 968 A2 和美国专利号 5, 149, 637，都在此引入以供参考。

重组凝血因子 VIII 的检定

可在至少两类临床试验中，在人体中测试重组凝血因子 VIII 分子是否抗原性和/或免疫原性降低。在一类试验中，设计为测试重组的或重组的杂交凝血因子 VIII 是否与抑制抗体具有免疫反应性，对有凝血因子 VIII 缺陷，并有抗凝血因子 VIII 抗体(其抑制了治疗性人或猪凝血因子 VIII 的凝血活性)的 25 个病人施用凝血因子 VIII，优选通过静脉灌注。重组或重组的杂交凝血因子 VIII 的剂量是 5 到 50 单位/公斤体重，优选 10-50 单位/公斤，最优选为 40 单位/公斤体重。在每次给药后约 1 个小时，在一步凝血试验中测定血样中凝血因子 VIII 的回收。在灌

- 注约 5 小时后再次取样，测定回收。样品的总回收和凝血因子 VIII 的消失速率可以预测抗体滴度和抑制活性。如果抗体滴度高，凝血因子 VIII 的回收通常不能测定。将回收结果与用血浆衍生的人凝血因子 VIII、重组人凝血因子 VIII、血浆衍生的猪凝血因子 VIII 和其它常用的凝血因子的治疗形式或凝血因子替代品治疗的病人的回收结果比较。

- 在第二类临床试验中，如上一段所述，对约 100 个先前未治疗的、没有产生凝血因子 VIII 抗体的血友病病人施用重组或重组杂交凝血因子 VIII，设计用于测定重组或重组杂交凝血因子 VIII 是否具有免疫原性，即病人是否会产生抑制性抗体。每 2 周进行一次治疗，共进行 6 个月到 1 年。在该时间段的 1-3 月间隔，
- 10 采血并进行 Bethesda 试验或其它抗体试验，以确定抑制性抗体的存在。在每次灌注以后，如上所述也可进行回收试验。将结果与接受血浆衍生的人凝血因子 VIII、重组人凝血因子 VIII、猪凝血因子 VIII 或其它常用的凝血因子 VIII 的治疗形式或凝血因子 VIII 取代物的血友病患者比较。

药物组合物

- 15 含有重组或重组杂交凝血因子 VIII 的药物组合物，单用或和合适的医药学上稳定的化合物，传递载体，以及/或运输载体合用，参照已知方法，如 Reminton's 药物科学，(E. W. Martin 著)所述制备。

在一优选例中，用于静脉注射的优选运输或传递载体是生理盐水或磷酸盐缓冲液。

- 20 在另一优选例中，合适的稳定化合物，传递载体，和运输载体，包括但不限于其它人或动物蛋白质例如清蛋白。

- 磷脂载体和脂质体悬液也优选为药物学上可接受的运输或传递载体。这些载体可按照本领域技术人员已知的方法制备，而且可以含有例如磷脂酰丝氨酸/-磷脂酰胆碱或其它磷脂或去污剂组合物，因为凝血因子 VIII 和带负电的磷脂膜结合，它们一起向表面传递负电荷。脂质体可通过将合适的脂质，(例如硬脂酸磷脂酰乙醇胺，硬脂酸磷脂酰胆碱，花生酸磷脂酰胆碱，和胆固醇)溶于无机溶剂，然后蒸发，在容器表面留下一薄层干燥脂来制备。然后在容器中加入杂交凝血因子 VIII 的水溶液。用手旋摇容器，以从容器壁上释放脂材料，分散脂聚集物，从而形成脂质体悬液。
- 25

重组或重组杂交凝血因子 VIII 可和其它合适的稳定化合物, 传递载体, 以及/或运输载体合用, 包括维他命 K 依赖性凝结因子, 组织凝血因子, 和 von Willebrand 因子(vWF)或 vWF 的片段(其含有凝血因子 VIII 结合位点), 以及多糖例如蔗糖。

- 5 重组或重组杂交凝血因子 VIII 可用基因治疗法传递, 可用人凝血因子 VIII 传递的相同方法, 使用的传递工具有例如逆转录病毒载体。该方法包括将凝血因子 VIII cDNA 掺入人细胞, 细胞被直接移植入凝血因子 VIII 缺陷病人, 或置于可植入装置中(可让凝血因子 VIII 渗透通过, 但细胞不能通过), 然后移植。优选方法是逆转录病毒介导的基因转移。在该方法中, 一外源基因(例如凝血因子 VIII cDNA)被克隆入修饰的逆转录病毒的基因组中。该基因用病毒机制插入宿主细胞的基因组中, 在其中通过细胞表达。逆转录病毒载体经过修饰, 因而不会产生病毒, 防止了宿主受病毒感染。该类型治疗的一般原理为本领域技术人员公知, 在文献中已有综述[例如, Kohn, D. B. 等(1989) *Transfusion* 29:812-820]。
- 10

- 重组或重组杂交凝血因子 VIII 可与 vWf 结合储藏, 以增加该杂交分子的半衰期和储藏寿命。另外, 冻干凝血因子 VIII 可改进存在 vWF 时活性分子的产量。可采用商品供应商储藏人和动物凝血因子 VIII 的现有方法来储藏杂交凝血因子 VIII。这些方法包括: (1)以部分纯化状态冻干凝血因子 VIII(作为凝血因子 VIII “浓缩液”, 无须进一步纯化注射); (2)用 Zimmerman 方法免疫亲和纯化凝血因子 VIII 并在存在稳定凝血因子 VIII 的清蛋白时冻干; (3)在存在清蛋白时冻干重组凝血因子 VIII。
- 15
- 20

另外, 杂交凝血因子 VIII 于 4℃时在 0.6M NaCl, 20mM MES, 和 5mM CaCl₂, pH6.0 中无限稳定, 而且可冰冻储藏于这些缓冲液中, 融化时活性损失最小。

治疗方法

- 重组或重组杂交凝血因子 VIII 可用于治疗有或无抑制性抗体的血友病病人, 以及由于产生抑制性抗体而患获得性凝血因子 VIII 缺陷的病人由于凝血因子 VIII 缺陷引起的失控性出血(例如, 关节内, 颅内, 或胃肠出血)。这些活性材料优选静脉内施用。
- 25

另外, 重组或重组杂交凝血因子 VIII 可通过移植基因工程改造的细胞来产生杂交物或通过植入含这种细胞的装置(如上所述)施用。

在一优选例中，重组或重组杂交凝血因子 VIII 的药物学组合单独或和稳定剂，传递载体，以及/或运载体合用，静脉注射入病人体内，按照注射人或动物凝血因子 VIII 所用的相同程序。

必须给予需要治疗的病人的重组或重组杂交凝血因子 VIII 组合物的治疗剂量视凝血因子 VIII 缺陷的严重程度而变化。通常，剂量水平在频率，持续时间，以及单位上，与每个病人出血症状的严重程度和持续时间保持一致。因此，杂交凝血因子 VIII 包含于药物学上可接受的载体，传递载体，或稳定剂中，以足够量传递给病人，如标准凝血试验测定的那样，给予治疗有效量的杂交物停止了出血。

凝血因子 VIII 在经典上定义为存在于正常血浆中的能纠正患血友病 A 个体的血浆中凝血缺陷的物质。纯化或部分纯化形式的凝血因子 VIII 体外凝血活性是用于计算给病人注射的凝血因子 VIII 剂量，和病人血浆恢复了活性和纠正了内出血缺陷的可靠指标。在新凝血因子 VIII 分子体外标准试验和它们在狗注射模型中或在病人中的表现之间尚没有报道过差异，这是按照 Lusher, J. M. 等 328 *New Engl. J. Med.* 328:453-459; Pittman, D. D. 等 (1992) *Blood* 79:389-397; 以及 Brinkhous 等, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82:8752-8755 的报道。

通常，通过施用重组或重组杂交凝血因子 VIII 使病人达到的理想血浆凝血因子 VIII 水平在正常的 30-100% 范围内。在施用重组或重组杂交凝血因子 VIII 的优选模式中，组合物静脉给药的优选剂量范围 5 到 50 单位/公斤体重，更优选范围 10-50 单位/公斤体重，最优选剂量为 20-40 单位/公斤体重；间隔频率范围是 8 到 24 小时(患严重血友病病人)；治疗持续天数是从 1 到 10 天，或直到出血症状被解决。见，例如，Roberts, H. R., 和 M. R. Jones, “血友病和相关病症-凝血酶原(凝血因子 II, 凝血因子 V, 和凝血因子 VII 到 XII) 的先天缺陷，” Ch. 153, 1453-1474, 1460, 于 *hematology* Williams, W. J., 等编。(1990)。具有抑制抗体的病人可能需要更多的重组或重组杂交凝血因子 VIII，或因为它比人凝血因子 VIII 更高的比活性或减弱的抗体反应性或免疫原性，病人可能需要较少的重组或重组杂交凝血因子 VIII。如在用人或血浆衍生的猪凝血因子 VIII 治疗中，重组或重组杂交凝血因子 VIII 量用一级凝血因子 VIII 凝血试验来确定，而且在所选定实例中，体外恢复情况可通过测定注射后病人血浆中的凝血因子 VIII 来确定。可以理解，对于任一特定的个体，具体的剂量方案应按照个体需要和施用或

监控组合物者的职业医师的判断，根据时间而调整，而且本文上述的浓度范围仅是举例说明，并不限制权利要求所述的组合物的范围或实施。

治疗可按需要采用一次静脉施用组合物，或定期或一段时间持续施用。另外，重组或重组杂交凝血因子 VIII 可用脂质体在不同的时间间隔以一剂或数剂皮下或口腔内施用。

重组或重组杂交凝血因子 VIII 也可用来治疗产生抗人凝血因子 VIII 抗体的血友病病人因凝血因子 VIII 缺陷而引起的失控性出血。在这种情况下，不需要比单独用人或动物凝血因子 VIII 更高的凝血活性。假如活性不被病人血浆中的抗体中和，凝血活性比人凝血因子 VIII 差的(亦即小于 3,000 单位/毫克)将会有用。

10 重组或重组杂交凝血因子 VIII 分子和其分离，定性，制备，和使用的方法总的如上所述，参考下列非限制性实施例将会更好被理解。

实施例

材料-柠檬酸化的 A 型血友病血浆和合并的正常人血浆(FACT)购自 George King Biomedical, Inc. (Overland Park, KS)。肝素-Sepharose 购自 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO)。胎牛血清、遗传霉素、青霉素、链霉素、DMEM/F12 培养基和 AIM-V 培养基购自 Life Technologies Inc. (Gaithersburg, MD)。Pfu DNA 聚合酶和质粒 pBlueScript II KS 购自 Stratagene (La Jolla, CA)。小鼠抗人 fVIII 单克隆抗体 ESH4 和 ESH8 购自 American Diagnostica (Greenwich, CT)。小鼠 fVIII C2 特异性抑制性单克隆抗体 NMC VIII-5 获自 Dr. Midori Shima, Nara Medical College, Japan。人 fVIII C2-特异性 IgG4 κ 单克隆抗体, B02C11 是血友病患者转化的 B 细胞系克隆得到的，如前所述制备 (Jacquemin, M. G. 等, 1998, “凝血因子 VIII 灭活的机制和动力学：用衍生自 A 型血友病病人的 IgG4 单克隆抗体和抑制剂的研究”，Blood 92:496-506)。来自 5 个抑制性病人的柠檬酸化人血浆 AA、AJ、HR、LK 和 RvR 获自 Dr. Dorothea Scandella。它们不经进一步纯化(HR、RvR 和 AJ)或作为 IgG 制备物(LK 和 AA)使用。抑制剂 IgG 如上所述制备 (Scandella, D. L. 等, 1992, “含有 A2 结构域的可溶性重组凝血因子 VIII 片段与一些免疫印迹不能检测的人抗凝血因子 VIII 抗体结合”，Thromb. Haemostas. 67:665-671)。HR、LK、AA 和 RvR 抗体中的抑制剂用抗体中和实验 (Prescott, R. 等, 1997, “抑制性抗体应答在 A 型血友病病人中，比具有 fVIII 自身抗体的大多数非血友病病

人中更复杂”，Blood 89:3663-3671)判断对 C2 结构域的特异性。用一组重组杂
交人/猪 fVIII 分子鉴定 AJ 是 C2 特异性的(Barrow, R. T. 等, 2000, “用多取代杂
交人/猪凝血因子 VIII 分子使凝血因子 VIII 的抗原性降低为复杂的免疫血浆”，
Blood 95:557-561)。无清蛋白的重组全长 fVIII 来自 Hyland-Immuno Division of
5 Baxtor Healthcare(Deerfield, IL)。合成的寡核苷酸购自 Life Technologies
Inc. (Gaithersburg, MD)。限制性酶购自 New England Biolabs(Beverly, MA)或
Promega(madison, WI)。衍生自幼仓鼠肾细胞的细胞系获自 Dr. R. T. A.
Macgillivray(Funk, W. D. 等, 1990, “在培养的细胞中人血清转铁蛋白的氨基末
端半个分子的表达和重组蛋白特征确定”，Biochemistry 29:1654-1660)。如前
10 所述(Healey, J. F. 等, 1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2
结构域中抑制表位的主要决定簇”，Blood 92:3701-3709)制备含有在终止密码子
3' 两个碱基处的 NotI 位点和氨苄青霉素和遗传霉素抗性基因的无 B 结构域 fVIII
表达载体，称为 HB-/ReNeo。HSQ/ReNeo，一种含有 14 个氨基酸区段，
SerPheSerGlnAsnProProValLeuLysArgHisGlnArg，取代人 fVIII 中的 B 结构域的
15 人无 B 结构域的 fVIII 分子(Lind, P. 等, 1995, “B 结构域缺失的重组凝血因子 VIII
分子的新形式。构建和生物化学特征确定”，Eur. J. Biochem. 232:19-27)是通
过用 HB-/ReNeo 作为模板，基本如前对于相应的猪分子所述(Healey, J. F. 等,
1998, “残基 Glu2181-Val2243 含有人凝血因子 VIII C2 结构域中抑制表位的主
要决定簇”，Blood 92:3701-3709)，重叠剪切延伸(SOE)诱变(Horton, R. M. 等，
20 1993, “重叠延伸的基因剪切”，Methods Enzymol. 217: 270-279)构建的。如前
所述制备了 HP20，一个含有人 A1、A2、ap-A3 和 C1 结构域和猪 C2 结构域的无 B
结构域的杂交人/猪 fVIII 分子(Healey, J. F. 见上, 1998)。

用 Qiagen 质粒 Max 试剂盒(Qiagen Inc., Valencia, CA)纯化质粒 DNA。用
PfuDNA 聚合酶，使用杂交 OmniGene 热循环仪进行 PCR 反应。凝胶纯化 PCR 产物，
25 用乙醇沉淀，并用 T4-DNA 连接酶(快速 DNA 连接试剂盒，Boehringer Mannheim,
Indianapolis, IN)连接入质粒 DNA。用含有插入物的质粒转化大肠杆菌 Epicurean
XL1-Blue 细胞。用 Applied Biosystems(Foster City, CA)373a 自动化 DNA 测序
仪和 PRISM 染料终止子试剂盒通过双脱氧测序确定 PCR 产生的新颖 fVIII DNA 序
列。

实施例 1: fVIII 突变体 cDNA 的构建

通过 SOE 诱变, 在 HSQ 密码子中制造突变, 产生下列蛋白质: Met2199Ile(人到猪), ATG 到 ATC; Phe2200Leu(人到犬), TTT 到 TTG; Val2223Ala(人到犬), GTG 到 GCC; Lys2227Glu(人到猪), AAA 到 GAG; Leu2252Phe(人到小鼠), CTT 到 TTC;

5 Met2199Ile/Phe2200Leu, ATG 到 ATC 和 TTT 到 TTG; Val2223Ala/Lys2227Glu, GTG 到 GCC 和 AAA 到 GAG; Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu, ATG 到 ATC, TTT 到 TTT, GTG 到 GCC, 和 AAA 到 GAG。

HSQ/ReNeo 在 PCR 反应中用作模板。第一次 PCR 反应使用人 C1 引物, SEQ ID NO:3, 5'-GTG GAT TCA TCT GGG ATA AAA CAC-3', 称作 H3763+, 对应于 HSQ

10 序列中的核苷酸 3763-3786, 作为有义引物。下列引物作为反义引物: Met2199Ile, SEQ ID NO:4, 5'-AGG AGA CCA GGT GGC AAA GAT ATT GGT AAA GTA GGA TGA-3', Phe2200Leu, SEQ ID NO:5, 5'-TGA AGG AGA CCA GGT GGC CAA CAT ATT GGT AAA GTA GGA-3', Val2223Ala, SEQ ID NO:6, 5'-CCA CTC TTT TGG ATT ATT GGC CTG AGG TCT CCA GGC ATT-3', Lys2227Glu, SEQ ID NO:7,

15 5'-GTC CAC TTG CAG CCA CTC CTC TGG ATT ATT CAC CTG AGG-3', Leu2252Phe, SEQ ID NO:8, 5'-CTT CAC ATA CAT GCT GGT GAA CAG AGA TTT TAC TCC CTG-3', Met2199Ile/Phe2200Leu, SEQ ID NO:9, 5'-AGG AGA CCA GGT GGC CAA GAT ATT GGT AAA GTA GGA TGA-3', 和 Val2223Ala/Lys2227Glu, SEQ ID NO:10, 5'-CAC TTG CAG CCA CTC CTC TGG ATT ATT GGC CTG AGG

20 TCT CCA GGC-3'。

第二次 PCR 反应用 ReNeo 引物, SEQ ID NO:11, 5'-AGT TTT TCT ACA ACA GAG GAA GTG-3', 称作 RE1110-, 它在 C2 结构域的 3', 作为反义引物。下列引物用作有义引物: Met2199Ile, SEQ ID NO:12, 5'-TCA TCC TAC TTT ACC AAT ATC TTT GCC ACC TGG TCT CCT -3', Phe2200Leu, SEQ ID NO:13, 5'-TCC TAC

25 TTT ACC AAT ATG TTG GCC ACC TGG TCT CCT TCA-3', Val2223Ala, SEQ ID NO:14, 5'-AAT GCC TGG AGA CCT CAG GCC AAT AAT CCA AAA GAG TGG-3', Lys2227Glu, SEQ ID NO:15, 5'-CCT CAG GTG AAT AAT CCA GAG GAG TGG CTG CAA GTG GAC-3', Leu2252Phe, SEQ ID NO:16, 5'-CAG GGA GTA AAA TCT CTG TTC ACC AGC ATG TAT GTG AAG-3', Met2199Ile/Phe2200Leu, SEQ ID

NO:17, 5'-TCA TCC TAC TTT ACC AAT ATC TTG GCC ACC TGG TCT CCT-3',
和 Val2223Ala/Lys2227Glu, SEQ ID NO:18, 5'-GCC TGG AGA CCT CAG GCC AAT
AAT CCA GAG GAG TGG CTG CAA GTG -3'.

SOE 反应用 PCR 反应获得的片段作为模板, H3763+和 RE1110 作为引物。用 *Swa*
5 *I* 和 *Not I* 产生 SOE 产物和 HSQ/ReNeo 连接片段。

如下构建了 Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu cDNA。将
Met2199Ile/Phe2200Leu 移入 pBluescript II KS- 中, 用 Bsu 36I 消化。
Val2223Ala/Lys2227Glu 也用 Bsu 36I 消化, 连接合适的片段。将得到的
Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu cDNA 通过用 *SwaI* 和 *NotI* 消化
10 引入 ReNeo。

实施例 2: 重组 fVIII 分子的表达

将转染的细胞系维持在含有 10%胎牛血清、50U/ml 青霉素和 50μg/ml 链霉素的
Dulbecco 改良 Eagles 培养基 F12 中。胎牛血清在使用前 56℃热灭活 1 小时。
ReNeo 中的突变 cDNA 稳定转染入 BHK 细胞, 筛选遗传霉素抗性, 换到无血清、AIM-V
15 培养基中用于表达, 用肝素-琼脂糖层析, 如前所述(Healey, J. F. 等, 见上, 1998)
部分纯化。

实施例 3: FVIII 和 fvIII 抑制抗体试验

用一阶段凝血试验(Bowie, E. J. W. 和 C. A. Owen, 1984, “出血疾病的临床和
实验室诊断”, Disorders of Hemostasis, O. D. Ratnoff 和 C. D. Forbes 编, Grune
20 & Stratton, Inc. Orlando, FL43-72)测定重组 fVIII 蛋白质的活性。一单位 fVIII
定义为 1 毫升正常柠檬酸化的人血浆中的活性。通过改良 Bethesda 试验
(Kasper, C. K. 等, 1975, “凝血因子 VIII 抑制抗体的更均一测量”, Thromb. Diath.
Haemorrh. 34:869-872)如下测定 FVIII 抑制抗体滴度。重组 fVIII 以每毫升最终
浓度 0.8-1.2 加到 A 型血友病血浆中, 和不同浓度的抑制抗体 37℃保温 2 小时。
25 为了确定定义 Bethesda 单位的 50%抑制点, 制备抑制抗体的稀释物, 产生跨越至
少 35-65%范围的剩余活性。在一些情况下, 进行重复稀释, 其中使用平均数。进
行平均 10 次稀释, 以确定各 Bethesda 滴度。剩余活性百分数对抑制抗体稀释度
倒数的对数值的半对数图似乎在所有情况下都是线性的。用 Marquardt 算法
(SigmaPlot 5.0, SPSS, Inc.)通过非线性递归拟合数据, 根据等式:

%剩余活性= $m(\log x - \log x_{50}) + 50$

其中拟合参数 x_{50} 是产生 50%抑制的稀释度倒数，拟合参数 m 是半对数线的斜率，独立变量 x 是抑制剂样品的稀释度倒数。62 个 Bethesda 试验的估计的标准误差(回归线数据点的平均偏差)是 10.0 ± 4.0 (平均 $\pm 1SD$)，表明该试验固有的精

5 确度较低。

Bethesda 滴度等于 x_{50}^{-1} 。通过将 Bethesda 滴度与 x_{50} 变化的系数相乘，计算 Bethesda 滴度的标准偏差(SD)的估计值。用 Student 的 t 试验比较 fVIII 突变物和 HB-的 Bethesda 滴度。用 ESH4 作为捕获抗体，生物素化 ESH8 作为检测抗体，如前所述(Lubin, I. M. 等, 1994“凝血因子 VIII 中主要抑制剂表位的消除”, J. Biol.

10 Chem. 269:8639-8641)通过夹层 ELISA 确定部分纯化的制备物中分 VIII 的质量浓度。用全长的重组 fVIII 作为标准，对于 fVIII 的全长和无 B 结构域形式之间质量差异矫正值。偏差的平均系数是 9.0%。用 ELISA 所确定的浓度除凝血活性计算 fVIII 分子的比活力。获得了下列值(单位/毫克): HB-, 7800; Met2199Ile, 12800; Phe2200Leu, 10200; Val2223Ala, 19600; Lys2227Glu, 36, 200; Leu2252Phe, 10100;

15 Met2199Ile/Phe2200Leu , 10000 ; Val2223Ala/Lys2227Glu , 33200 ; Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu, 14200。一些突变体的表现比活力高于 HB-。这可能是由于突变体与 HB-比较，结合捕获或检测抗体的能力减少的相对少一些，导致 fVIII 质量的低估和比活力高估。

表 1 FVIII C2 突变体与人 FVIII 相对 C2 特异性抑制性抗体的抗原性

突变体	抗原性*		
	较低	相等	较高
Met2199Ile	4/7	0/7	3/7
Phe2200Leu	4/7	2/7	1/7
Val2223Ala	0/7	2/7	5/7
Lys2227Glu	2/7	1/7	4/7
Leu2252Phe	4/7	3/7	0/7
Met2199Ile/Phe2200Leu	6/7	1/7	0/7
Val2223Ala/Lys2227Glu	4/7	1/7	2/7
Met2199Ile/Phe2200Leu/Val2223Ala/Lys2227Glu	7/7	0/7	0/7
HP20	7/7	0/7	0/7

20 *99%置信水平时有显著差异。

<110> 埃默里大学(Emory University)

<120> 修饰的凝血因子 VIII

<130> 75-00 WO

<140> PCT/US01/29431

<141> 2001-09-19

<150> US 60/234,047

<151> 2000-09-19

<150> US 60/236,460

<151> 2000-09-29

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 9009

<212> DNA

<213> 智人(Homo sapiens)

<220>

<221> CDS

<222> (208)..(7203)

<400> 1

```

cagtgggtaa gttccttaaa tgctctgcaa agaaattggg acttttcatt aaatcagaaa 60
ttttactttt ttcccctcct gggagctaaa gatatttttag agaagaatta accttttgct 120
tctccagttg aacatttgta gcaataagtc atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt 180
ctgtgccttt tgcgattctg ctttagt gcc acc aga aga tac tac ctg ggt gca 234
                                Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala
                                1           5
gtg gaa ctg tca tgg gac tat atg caa agt gat ctc ggt gag ctg cct 282
Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro
 10           15           20           25
gtg gac gca aga ttt cct cct aga gtg cca aaa tct ttt cca ttc aac 330
Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn
 30           35           40
acc tca gtc gtg tac aaa aag act ctg ttt gta gaa ttc acg gtt cac 378
Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His
 45           50           55
ctt ttc aac atc gct aag cca agg cca ccc tgg atg ggt ctg cta ggt 426
Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly
 60           65           70
cct acc atc cag gct gag gtt tat gat aca gtg gtc att aca ctt aag 474
Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys
 75           80           85

```

```

aac atg gct tcc cat cct gtc agt ctt cat gct gtt ggt gta tcc tac 522
Asn Met Ala Ser His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr
90          95          100          105
tgg aaa gct tct gag gga gct gaa tat gat gat cag acc agt caa agg 570
Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg
110          115          120
gag aaa gaa gat gat aaa gtc ttc cct ggt gga agc cat aca tat gtc 618
Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val
125          130          135
tgg cag gtc ctg aaa gag aat ggt cca atg gcc tct gac cca ctg tgc 666
Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys
140          145          150
ctt acc tac tca tat ctt tct cat gtg gac ctg gta aaa gac ttg aat 714
Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn
155          160          165
tca ggc ctc att gga gcc cta cta gta tgt aga gaa ggg agt ctg gcc 762
Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala
170          175          180          185
aag gaa aag aca cag acc ttg cac aaa ttt ata cta ctt ttt gct gta 810
Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val
190          195          200
ttt gat gaa ggg aaa agt tgg cac tca gaa aca aag aac tcc ttg atg 858
Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met
205          210          215
cag gat agg gat gct gca tct gct cgg gcc tgg cct aaa atg cac aca 906
Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr
220          225          230
gtc aat ggt tat gta aac agg tct ctg cca ggt ctg att gga tgc cac 954
Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His
235          240          245
agg aaa tca gtc tat tgg cat gtg att gga atg ggc acc act cct gaa 1002
Arg Lys Ser Val Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu
250          255          260          265
gtg cac tca ata ttc ctc gaa ggt cac aca ttt ctt gtg agg aac cat 1050
Val His Ser Ile Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His
270          275          280
cgc cag gcg tcc ttg gaa atc tcg cca ata act ttc ctt act gct caa 1098
Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln
285          290          295
aca ctc ttg atg gac ctt gga cag ttt cta ctg ttt tgt cat atc tct 1146
Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser
300          305          310
tcc cac caa cat gat ggc atg gaa gct tat gtc aaa gta gac agc tgt 1194
Ser His Gln His Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys
315          320          325
cca gag gaa ccc caa cta cga atg aaa aat aat gaa gaa gcg gaa gac 1242
Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp
330          335          340          345
tat gat gat gat ctt act gat tct gaa atg gat gtg gtc agg ttt gat 1290
Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp
350          355          360
gat gac aac tct cct tcc ttt atc caa att cgc tca gtt gcc aag aag 1338

```

Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	
		365					370					375				
cat	cct	aaa	act	tgg	gta	cat	tac	att	gct	gct	gaa	gag	gag	gac	tgg	1386
His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	
		380					385				390					
gac	tat	gct	ccc	tta	gtc	ctc	gcc	ccc	gat	gac	aga	agt	tat	aaa	agt	1434
Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	
		395				400				405						
caa	tat	ttg	aac	aat	ggc	cct	cag	cgg	att	ggc	agg	aag	tac	aaa	aaa	1482
Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	
410					415				420					425		
gtc	cga	ttt	atg	gca	tac	aca	gat	gaa	acc	ttt	aag	act	cgt	gaa	gct	1530
Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	
			430					435					440			
att	cag	cat	gaa	tca	gga	atc	ttg	gga	cct	tta	ctt	tat	ggg	gaa	gtt	1578
Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	
			445					450					455			
gga	gac	aca	ctg	ttg	att	ata	ttt	aag	aat	caa	gca	agc	aga	cca	tat	1626
Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	
			460				465				470					
aac	atc	tac	cct	cac	gga	atc	act	gat	gtc	cgt	cct	ttg	tat	tca	agg	1674
Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	
			475			480				485						
aga	tta	cca	aaa	ggc	gta	aaa	cat	ttg	aag	gat	ttt	cca	att	ctg	cca	1722
Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	
490					495				500					505		
gga	gaa	ata	ttc	aaa	tat	aaa	tgg	aca	gtg	act	gta	gaa	gat	ggg	cca	1770
Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	
			510					515						520		
act	aaa	tca	gat	cct	cgg	tgc	ctg	acc	cgc	tat	tac	tct	agt	ttc	gtt	1818
Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	
			525					530					535			
aat	atg	gag	aga	gat	cta	gct	tca	gga	ctc	att	ggc	cct	ctc	ctc	atc	1866
Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	
			540				545				550					
tgc	tac	aaa	gaa	tct	gta	gat	caa	aga	gga	aac	cag	ata	atg	tca	gac	1914
Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	
			555			560				565						
aag	agg	aat	gtc	atc	ctg	ttt	tct	gta	ttt	gat	gag	aac	cga	agc	tgg	1962
Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	
570				575					580					585		
tac	ctc	aca	gag	aat	ata	caa	cgc	ttt	ctc	ccc	aat	cca	gct	gga	gtg	2010
Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	
			590					595					600			
cag	ctt	gag	gat	cca	gag	ttc	caa	gcc	tcc	aac	atc	atg	cac	agc	atc	2058
Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	
			605				610					615				
aat	ggc	tat	gtt	ttt	gat	agt	ttg	cag	ttg	tca	gtt	tgt	ttg	cat	gag	2106
Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	
			620			625					630					
gtg	gca	tac	tgg	tac	att	cta	agc	att	gga	gca	cag	act	gac	ttc	ctt	2154

Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	
635						640					645					
tct	gtc	ttc	ttc	tct	gga	tat	acc	ttc	aaa	cac	aaa	atg	gtc	tat	gaa	2202
Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	
650					655					660					665	
gac	aca	ctc	acc	cta	ttc	cca	ttc	tca	gga	gaa	act	gtc	ttc	atg	tcg	2250
Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	
				670					675					680		
atg	gaa	aac	cca	ggg	cta	tgg	att	ctg	ggg	tgc	cac	aac	tca	gac	ttt	2298
Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	
			685					690					695			
cgg	aac	aga	ggc	atg	acc	gcc	tta	ctg	aag	gtt	tct	agt	tgt	gac	aag	2346
Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys		
		700					705				710					
aac	act	ggg	gat	tat	tac	gag	gac	agt	tat	gaa	gat	att	tca	gca	tac	2394
Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	
		715				720					725					
ttg	ctg	agt	aaa	aac	aat	gcc	att	gaa	cca	aga	agc	ttc	tcc	cag	aat	2442
Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	
730					735				740					745		
tca	aga	cac	cct	agc	act	agg	caa	aag	caa	ttt	aat	gcc	acc	aca	att	2490
Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	
			750						755					760		
cca	gaa	aat	gac	ata	gag	aag	act	gac	cct	tgg	ttt	gca	cac	aga	aca	2538
Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	
			765					770				775				
cct	atg	cct	aaa	ata	caa	aat	gtc	tcc	tct	agt	gat	ttg	ttg	atg	ctc	2586
Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	
		780					785					790				
ttg	cga	cag	agt	cct	act	cca	cat	ggg	cta	tcc	tta	tct	gat	ctc	caa	2634
Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	
		795				800					805					
gaa	gcc	aaa	tat	gag	act	ttt	tct	gat	gat	cca	tca	cct	gga	gca	ata	2682
Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	
810					815					820				825		
gac	agt	aat	aac	agc	ctg	tct	gaa	atg	aca	cac	ttc	agg	cca	cag	ctc	2730
Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	
				830					835					840		
cat	cac	agt	ggg	gac	atg	gta	ttt	acc	cct	gag	tca	ggc	ctc	caa	tta	2778
His	His	Ser	Gly	Asp	Met	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	
			845					850					855			
aga	tta	aat	gag	aaa	ctg	ggg	aca	act	gca	gca	aca	gag	ttg	aag	aaa	2826
Arg	Leu	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	
		860					865					870				
ctt	gat	ttc	aaa	gtt	tct	agt	aca	tca	aat	aat	ctg	att	tca	aca	att	2874
Leu	Asp	Phe	Lys	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	
		875				880					885					
cca	tca	gac	aat	ttg	gca	gca	ggg	act	gat	aat	aca	agt	tcc	tta	gga	2922
Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	
890					895					900					905	
ccc	cca	agt	atg	cca	gtt	cat	tat	gat	agt	caa	tta	gat	acc	act	cta	2970
Pro	Pro	Ser	Met	Pro	Val	His	Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	

	910	915	920	
ttt ggc aaa aag tca tct ccc ctt act gag tct ggt gga cct ctg agc				3018
Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser				
925	930	935		
ttg agt gaa gaa aat aat gat tca aag ttg tta gaa tca ggt tta atg				3066
Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met				
940	945	950		
aat agc caa gaa agt tca tgg gga aaa aat gta tcg tca aca gag agt				3114
Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser				
955	960	965		
ggt agg tta ttt aaa ggg aaa aga gct cat gga cct gct ttg ttg act				3162
Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr				
970	975	980	985	
aaa gat aat gcc tta ttc aaa gtt agc atc tct ttg tta aag aca aac				3210
Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn				
990	995	1000		
aaa act tcc aat aat tca gca act aat aga aag act cac att gat ggc				3258
Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly				
1005	1010	1015		
cca tca tta tta att gag aat agt cca tca gtc tgg caa aat ata tta				3306
Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu				
1020	1025	1030		
gaa agt gac act gag ttt aaa aaa gtg aca cct ttg att cat gac aga				3354
Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg				
1035	1040	1045		
atg ctt atg gac aaa aat gct aca gct ttg agg cta aat cat atg tca				3402
Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser				
1050	1055	1060	1065	
aat aaa act act tca tca aaa aac atg gaa atg gtc caa cag aaa aaa				3450
Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys				
1070	1075	1080		
gag ggc ccc att cca cca gat gca caa aat cca gat atg tcg ttc ttt				3498
Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe				
1085	1090	1095		
aag atg cta ttc ttg cca gaa tca gca agg tgg ata caa agg act cat				3546
Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His				
1100	1105	1110		
gga aag aac tct ctg aac tct ggg caa ggc ccc agt cca aag caa tta				3594
Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu				
1115	1120	1125		
gta tcc tta gga cca gaa aaa tct gtg gaa ggt cag aat ttc ttg tct				3642
Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser				
1130	1135	1140	1145	
gag aaa aac aaa gtg gta gta gga aag ggt gaa ttt aca aag gac gta				3690
Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val				
1150	1155	1160		
gga ctc aaa gag atg gtt ttt cca agc agc aga aac cta ttt ctt act				3738
Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr				
1165	1170	1175		
aac ttg gat aat tta cat gaa aat aat aca cac aat caa gaa aaa aaa				3786
Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys				
1180	1185	1190		

```

att cag gaa gaa ata gaa aag aag gaa aca tta atc caa gag aat gta 3834
Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val
1195 1200 1205
ggt ttg cct cag ata cat aca gtg act ggc act aag aat ttc atg aag 3882
Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys
1210 1215 1220 1225
aac ctt ttc tta ctg agc act agg caa aat gta gaa ggt tca tat gag 3930
Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Glu
1230 1235 1240
ggg gca tat gct cca gta ctt caa gat ttt agg tca tta aat gat tca 3978
Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser
1245 1250 1255
aca aat aga aca aag aaa cac aca gct cat ttc tca aaa aaa ggg gag 4026
Thr Asn Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu
1260 1265 1270
gaa gaa aac ttg gaa ggc ttg gga aat caa acc aag caa att gta gag 4074
Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu
1275 1280 1285
aaa tat gca tgc acc aca agg ata tct cct aat aca agc cag cag aat 4122
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn
1290 1295 1300 1305
ttt gtc acg caa cgt agt aag aga gct ttg aaa caa ttc aga ctc cca 4170
Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro
1310 1315 1320
cta gaa gaa aca gaa ctt gaa aaa agg ata att gtg gat gac acc tca 4218
Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser
1325 1330 1335
acc cag tgg tcc aaa aac atg aaa cat ttg acc ccg agc acc ctc aca 4266
Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr
1340 1345 1350
cag ata gac tac aat gag aag gag aaa ggg gcc att act cag tct ccc 4314
Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro
1355 1360 1365
tta tca gat tgc ctt acg agg agt cat agc atc cct caa gca aat aga 4362
Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg
1370 1375 1380 1385
tct cca tta ccc att gca aag gta tca tca ttt cca tct att aga cct 4410
Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro
1390 1395 1400
ata tat ctg acc agg gtc cta ttc caa gac aac tct tct cat ctt cca 4458
Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro
1405 1410 1415
gca gca tct tat aga aag aaa gat tct ggg gtc caa gaa agc agt cat 4506
Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His
1420 1425 1430
ttc tta caa gga gcc aaa aaa aat aac ctt tct tta gcc att cta acc 4554
Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr
1435 1440 1445
ttg gag atg act ggt gat caa aga gag gtt ggc tcc ctg ggg aca agt 4602
Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser
1450 1455 1460 1465
gcc aca aat tca gtc aca tac aag aaa gtt gag aac act gtt ctc ccg 4650

```

Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro	
1470 1475 1480	
aaa cca gac ttg ccc aaa aca tct ggc aaa gtt gaa ttg ctt cca aaa	4698
Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys	
1485 1490 1495	
gtt cac att tat cag aag gac cta ttc cct acg gaa act agc aat ggg	4746
Val His Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly	
1500 1505 1510	
tct cct ggc cat ctg gat ctc gtg gaa ggg agc ctt ctt cag gga aca	4794
Ser Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr	
1515 1520 1525	
gag gga gcg att aag tgg aat gaa gca aac aga cct gga aaa gtt ccc	4842
Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro	
1530 1535 1540 1545	
ttt ctg aga gta gca aca gaa agc tct gca aag act ccc tcc aag cta	4890
Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu	
1550 1555 1560	
ttg gat cct ctt gct tgg gat aac cac tat ggt act cag ata cca aaa	4938
Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys	
1565 1570 1575	
gaa gag tgg aaa tcc caa gag aag tca cca gaa aaa aca gct ttt aag	4986
Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys	
1580 1585 1590	
aaa aag gat acc att ttg tcc ctg aac gct tgt gaa agc aat cat gca	5034
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala	
1595 1600 1605	
ata gca gca ata aat gag gga caa aat aag ccc gaa ata gaa gtc acc	5082
Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr	
1610 1615 1620 1625	
tgg gca aag caa ggt agg act gaa agg ctg tgc tct caa aac cca cca	5130
Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro	
1630 1635 1640	
gtc ttg aaa cgc cat caa cgg gaa ata act cgt act act ctt cag tca	5178
Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser	
1645 1650 1655	
gat caa gag gaa att gac tat gat gat acc ata tca gtt gaa atg aag	5226
Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys	
1660 1665 1670	
aag gaa gat ttt gac att tat gat gag gat gaa aat cag agc ccc cgc	5274
Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg	
1675 1680 1685	
agc ttt caa aag aaa aca cga cac tat ttt att gct gca gtg gag agg	5322
Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg	
1690 1695 1700 1705	
ctc tgg gat tat ggg atg agt agc tcc cca cat gtt cta aga aac agg	5370
Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg	
1710 1715 1720	
gct cag agt ggc agt gtc cct cag ttc aag aaa gtt gtt ttc cag gaa	5418
Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu	
1725 1730 1735	
ttt act gat ggc tcc ttt act cag ccc tta tac cgt gga gaa cta aat	5466
Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn	

1740	1745	1750	
gaa cat ttg gga ctc ctg ggg cca tat ata aga gca gaa gtt gaa gat			5514
Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp			
1755	1760	1765	
aat atc atg gta act ttc aga aat cag gcc tct cgt ccc tat tcc ttc			5562
Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe			
1770	1775	1780	1785
tat tct agc ctt att tct tat gag gaa gat cag agg caa gga gca gaa			5610
Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu			
1790	1795	1800	
cct aga aaa aac ttt gtc aag cct aat gaa acc aaa act tac ttt tgg			5658
Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp			
1805	1810	1815	
aaa gtg caa cat cat atg gca ccc act aaa gat gag ttt gac tgc aaa			5706
Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys			
1820	1825	1830	
gcc tgg gct tat ttc tct gat gtt gac ctg gaa aaa gat gtg cac tca			5754
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser			
1835	1840	1845	
ggc ctg att gga ccc ctt ctg gtc tgc cac act aac aca ctg aac cct			5802
Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro			
1850	1855	1860	1865
gct cat ggg aga caa gtg aca gta cag gaa ttt gct ctg ttt ttc acc			5850
Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr			
1870	1875	1880	
atc ttt gat gag acc aaa agc tgg tac ttc act gaa aat atg gaa aga			5898
Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg			
1885	1890	1895	
aac tgc agg gct ccc tgc aat atc cag atg gaa gat ccc act ttt aaa			5946
Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys			
1900	1905	1910	
gag aat tat cgc ttc cat gca atc aat ggc tac ata atg gat aca cta			5994
Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu			
1915	1920	1925	
cct ggc tta gta atg gct cag gat caa agg att cga tgg tat ctg ctc			6042
Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu			
1930	1935	1940	1945
agc atg ggc agc aat gaa aac atc cat tct att cat ttc agt gga cat			6090
Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His			
1950	1955	1960	
gtg ttc act gta cga aaa aaa gag gag tat aaa atg gca ctg tac aat			6138
Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn			
1965	1970	1975	
ctc tat cca ggt gtt ttt gag aca gtg gaa atg tta cca tcc aaa gct			6186
Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala			
1980	1985	1990	
gga att tgg cgg gtg gaa tgc ctt att ggc gag cat cta cat gct ggg			6234
Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly			
1995	2000	2005	
atg agc aca ctt ttt ctg gtg tac agc aat aag tgt cag act ccc ctg			6282
Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu			
2010	2015	2020	2025

gga atg gct tct gga cac att aga gat ttt cag att aca gct tca gga	6330
Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly	
2030 2035 2040	
caa tat gga cag tgg gcc cca aag ctg gcc aga ctt cat tat tcc gga	6378
Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly	
2045 2050 2055	
tca atc aat gcc tgg agc acc aag gag ccc ttt tct tgg atc aag gtg	6426
Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val	
2060 2065 2070	
gat ctg ttg gca cca atg att att cac ggc atc aag acc cag ggt gcc	6474
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala	
2075 2080 2085	
cgt cag aag ttc tcc agc ctc tac atc tct cag ttt atc atc atg tat	6522
Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr	
2090 2095 2100 2105	
agt ctt gat ggg aag aag tgg cag act tat cga gga aat tcc act gga	6570
Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly	
2110 2115 2120	
acc tta atg gtc ttc ttt ggc aat gtg gat tca tct ggg ata aaa cac	6618
Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His	
2125 2130 2135	
aat att ttt aac cct cca att att gct cga tac atc cgt ttg cac cca	6666
Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro	
2140 2145 2150	
act cat tat agc att cgc agc act ctt cgc atg gag ttg atg ggc tgt	6714
Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys	
2155 2160 2165	
gat tta aat agt tgc agc atg cca ttg gga atg gag agt aaa gca ata	6762
Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile	
2170 2175 2180 2185	
tca gat gca cag att act gct tca tcc tac ttt acc aat atg ttt gcc	6810
Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala	
2190 2195 2200	
acc tgg tct cct tca aaa gct cga ctt cac ctc caa ggg agg agt aat	6858
Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn	
2205 2210 2215	
gcc tgg aga cct cag gtg aat aat cca aaa gag tgg ctg caa gtg gac	6906
Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp	
2220 2225 2230	
ttc cag aag aca atg aaa gtc aca gga gta act act cag gga gta aaa	6954
Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys	
2235 2240 2245	
tct ctg ctt acc agc atg tat gtg aag gag ttc ctc atc tcc agc agt	7002
Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser	
2250 2255 2260 2265	
caa gat ggc cat cag tgg act ctc ttt ttt cag aat ggc aaa gta aag	7050
Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys	
2270 2275 2280	
gtt ttt cag gga aat caa gac tcc ttc aca cct gtg gtg aac tct cta	7098
Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu	
2285 2290 2295	
gac cca ccg tta ctg act cgc tac ctt cga att cac ccc cag agt tgg	7146

```

Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
      2300                      2305                      2310
gtg cac cag att gcc ctg agg atg gag gtt ctg ggc tgc gag gca cag 7194
Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln
      2315                      2320                      2325
gac ctc tac tgagggtggc cactgcagca cctgccactg ccgtcacctc 7243
Asp Leu Tyr
2330
tccctectca gctccagggc agtgtccctc cctggcttgc cttctacett tgtgctaaat 7303
cctagcagac actgccttga agcctcctga attaactatc atcagtcctg catttctttg 7363
gtggggggcc aggaggggtg atccaattta acttaactct tacctatttt ctgcagctgc 7423
tcccagatta ctcccttcct ccaatataac taggcacaaa gaagtgagga gaaacctgca 7483
tgaaagcatt ctcccttgaa aagttaggcc tctcagagtc accacttcct ctgtttgtaga 7543
aaaaactatg gatgaaactt tgaaaaagat atttatgatg ttaacatttc aggttaagcc 7603
tcatacgttt aaaataaaac tctcagttgt ttattatcct gatcaagcat ggaacaaagc 7663
atgtttcagg atcagatcaa tacaatcttg gagtcaaaag gcaaatcatt tggacaatct 7723
gcaaaatgga gagaatacaa taactactac agtaaagtct gtttctgctt ccttacacat 7783
agatataatt atgttattta gtcattatga ggggcacatt cttatctcca aaactagcat 7843
tcttaaactg agaattatag atgggggttca agaatcccta agtcccctga aattatataa 7903
ggcattctgt ataaatgcaa atgtgcattt ttctgacgag tgtccataga tataaagcca 7963
ttggtcttaa ttctgaccaa taaaaaata agtcaggagg atgcaattgt tgaaagcttt 8023
gaaataaaat aacatgtctt cttgaaattt gtgatggcca agaaagaaaa tgatgatgac 8083
attaggcttc taaaggacat acatttaata ttctgttgga aatatgagga aaatccatgg 8143
ttatctgaga taggagatac aaactttgta attctaataa tgcactcagt ttactctctc 8203
cctctactaa tttcttgctg aaaataacac aacaaaaatg taacagggga aattatatac 8263
cgtgactgaa aactagagtc ctacttacat agttgaata tcaaggaggt cagaagaaaa 8323
ttggactggg gaaaacagaa aaaacactcc agtctgccat atcaccacac aataggatcc 8383
cccttcttgc cctccacccc cataagattg tgaagggttt actgctcett ccatctgcct 8443
gcaccccttc actatgacta cacagaactc tcctgatagt aaagggggct ggaggcaagg 8503
ataagttata gaggcatttg aggaagcatc caaagactgc aaccagggc aaatggaaaa 8563
caggagatcc taatatgaaa gaaaaatgga tcccaatctg agaaaaggca aaagaatggc 8623
tacttttttc tatgctggag tattttctaa taatcctgct tgaccettat ctgacctett 8683
tggaactat aacatagctg tcacagtata gtcacaatcc acaaatgatg caggtgcaaa 8743
tggtttatag cctgtgaag ttcttaaagt ttagaggcta acttacagaa atgaataagt 8803
tgttttgttt tatagcccgg tagaggagtt aaccccaaag gtgatatggt ttattttcct 8863
gttatgttta acttgataat cttatttttg cattcttttc ccattgacta tatacatctc 8923
tatttctcaa atgttcatgg aactagctct ttatttttcc tgctggtttc ttcagtaatg 8983
agttaaataa aacattgaca cataca 9009

```

<210> 2

<211> 2332

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 2

```

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
  1                      5                      10                      15
Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
      20                      25                      30
Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
      35                      40                      45
Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Val His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

```

50	55	60
Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val		
65	70	75
Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val		
	85	90
Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala		
100	105	110
Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val		
115	120	125
Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn		
130	135	140
Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser		
145	150	155
His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu		
	165	170
Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu		
180	185	190
His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp		
195	200	205
His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser		
210	215	220
Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg		
225	230	235
Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His		
	245	250
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu		
260	265	270
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile		
275	280	285
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly		
290	295	300
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met		
305	310	315
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg		
	325	330
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp		
340	345	350
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe		
355	360	365
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His		
370	375	380
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu		
385	390	395
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro		
	405	410
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr		
420	425	430
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile		
435	440	445
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile		
450	455	460
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile		

```

465          470          475          480
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
          485          490          495
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
          500          505          510
Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
          515          520          525
Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
          530          535          540
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
545          550          555          560
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
          565          570          575
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
          580          585          590
Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
          595          600          605
Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
          610          615          620
Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
625          630          635          640
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
          645          650          655
Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
          660          665          670
Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
          675          680          685
Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
          690          695          700
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
705          710          715          720
Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
          725          730          735
Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
          740          745          750
Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
          755          760          765
Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
          770          775          780
Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
785          790          795          800
His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
          805          810          815
Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
          820          825          830
Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
          835          840          845
Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
          850          855          860
Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
865          870          875          880
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala

```

```

      885              890              895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
      900              905              910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
      915              920              925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
      930              935              940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
945              950              955              960
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
      965              970              975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
      980              985              990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
      995              1000              1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn
      1010              1015              1020
Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys
1025              1030              1035              1040
Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp Lys Asn Ala
      1045              1050              1055
Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys
      1060              1065              1070
Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp
      1075              1080              1085
Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu
      1090              1095              1100
Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser
1105              1110              1115              1120
Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys
      1125              1130              1135
Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val
      1140              1145              1150
Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe
      1155              1160              1165
Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
      1170              1175              1180
Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys
1185              1190              1195              1200
Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
      1205              1210              1215
Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr
      1220              1225              1230
Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Glu Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
      1235              1240              1245
Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His
      1250              1255              1260
Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu
1265              1270              1275              1280
Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg
      1285              1290              1295
Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys

```

1300 1305 1310
 Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu
 1315 1320 1325
 Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met
 1330 1335 1340
 Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys
 1345 1350 1355 1360
 Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg
 1365 1370 1375
 Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys
 1380 1385 1390
 Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu
 1395 1400 1405
 Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
 1410 1415 1420
 Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys
 1425 1430 1435 1440
 Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln
 1445 1450 1455
 Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr
 1460 1465 1470
 Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr
 1475 1480 1485
 Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp
 1490 1495 1500
 Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu
 1505 1510 1515 1520
 Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn
 1525 1530 1535
 Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu
 1540 1545 1550
 Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp
 1555 1560 1565
 Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu
 1570 1575 1580
 Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser
 1585 1590 1595 1600
 Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly
 1605 1610 1615
 Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr
 1620 1625 1630
 Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 1635 1640 1645
 Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
 1650 1655 1660
 Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr
 1665 1670 1675 1680
 Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg
 1685 1690 1695
 His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser
 1700 1705 1710
 Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro

1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr		
1730	1735	1740
Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly		
1745	1750	1755
Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg		1760
1765	1770	1775
Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr		
1780	1785	1790
Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys		
1795	1800	1805
Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala		
1810	1815	1820
Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp		
1825	1830	1835
Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu		1840
1845	1850	1855
Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr		
1860	1865	1870
Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser		
1875	1880	1885
Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn		
1890	1895	1900
Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala		
1905	1910	1915
Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln		1920
1925	1930	1935
Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn		
1940	1945	1950
Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys		
1955	1960	1965
Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu		
1970	1975	1980
Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys		
1985	1990	1995
Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val		2000
2005	2010	2015
Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile		
2020	2025	2030
Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro		
2035	2040	2045
Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr		
2050	2055	2060
Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile		
2065	2070	2075
Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu		2080
2085	2090	2095
Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp		
2100	2105	2110
Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly		
2115	2120	2125
Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile		

2130	2135	2140
Ile Ala Arg Tyr Ile	Arg Leu His Pro Thr	His Tyr Ser Ile Arg Ser
2145	2150	2155
Thr Leu Arg Met Glu	Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser Met
2165	2170	2175
Pro Leu Gly Met Glu	Ser Lys Ala Ile Ser	Asp Ala Gln Ile Thr Ala
2180	2185	2190
Ser Ser Tyr Phe Thr	Asn Met Phe Ala Thr	Trp Ser Pro Ser Lys Ala
2195	2200	2205
Arg Leu His Leu Gln	Gly Arg Ser Asn Ala	Trp Arg Pro Gln Val Asn
2210	2215	2220
Asn Pro Lys Glu Trp	Leu Gln Val Asp Phe	Gln Lys Thr Met Lys Val
2225	2230	2235
Thr Gly Val Thr Thr	Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr Ser Met Tyr
2245	2250	2255
Val Lys Glu Phe Leu	Ile Ser Ser Ser Gln	Asp Gly His Gln Trp Thr
2260	2265	2270
Leu Phe Phe Gln Asn	Gly Lys Val Lys Val	Phe Gln Gly Asn Gln Asp
2275	2280	2285
Ser Phe Thr Pro Val	Val Asn Ser Leu Asp	Pro Pro Leu Leu Thr Arg
2290	2295	2300
Tyr Leu Arg Ile His	Pro Gln Ser Trp Val	His Gln Ile Ala Leu Arg
2305	2310	2315
Met Glu Val Leu Gly	Cys Glu Ala Gln Asp	Leu Tyr
2325	2330	

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 3
 gtggattcat ctgggataaa acac 24

<210> 4
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 4
 aggagaccag gtggcaaaga tatttgtaaa gtaggatga 39

<210> 5
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸引物

<400> 5

tgaaggagac caggtggcca acatattggt aaagtagga 39

<210> 6

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸引物

<400> 6

ccactctttt ggattattgg cctgaggtct ccaggcatt 39

<210> 7

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸引物

<400> 7

gtccacttgc agccactcct ctggattatt cacctgagg 39

<210> 8

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸引物

<400> 8

cttcacatac atgctggtga acagagattt tactccctg 39

<210> 9

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：寡核苷酸引物

<400> 9

aggagaccag gtggccaaga tatttgtaaa gtaggatga 39

<210> 10

<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 10
cacttgcagc cactcctctg gattattggc ctgaggctctc caggc 45

<210> 11
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 11
agtttttcta caacagagga a 21

<210> 12
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 12
tcatectact ttaccaatat ctttgccacc tggctctcct 39

<210> 13
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 13
tcctacttta ccaatatggt ggccacctgg tctccttca 39

<210> 14
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 14

aatgcctgga gacctcaggc caataatcca aaagagtgg 39

<210> 15

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 15

cctcaggtga ataatccaga ggagtggctg caagtggac 39

<210> 16

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 16

cagggagtaa aatctctgtt caccagcatg tatgtgaag 39

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 17

tcctcctact ttaccaatat ctggccacc tggctcct 39

<210> 18

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 寡核苷酸引物

<400> 18

gcctggagac ctcaggccaa taatccagag gagggtgctgc aagtg 45

	2173	2181	2191
HF8	SCSMPLGM	ESKAISDAQI	TASSYFTNME
PF8	SCSMPLGM	QNKAISDSQI	TASSHLSNIE
MF8	SCSIPLGM	ESKVISDTQI	TASSYFTNME
CF8	SCSMPLGM	ESKAISDAQI	TASSYLSSML
	2201	2211	2221
HF8	ATWSPSKARL	HLQGRSNAWR	PQVNNFKEWL
PF8	ATWSPSQARL	HLQGRTNAWR	PRVSSAEWL
MF8	ATWSPSQARL	HLQGRTNAWR	PQVNDPKQWL
CF8	ATWSPSQARL	HLQGRTNAWR	PQANNEKEWL
	2231	2241	2251
HF8	QVDFQKIMKV	TGVTTQGVKS	LLTSMYVKEF
PF8	QVDLQKTVKV	TGITTTQGVKS	LLSSMYVKEF
MF8	QVDLQKIMKV	TGIITQGVKS	LETSMEVKEF
CF8	QVDFRKIMKV	TGITTTQGVKS	LLISMYVKEF
	2261	2271	2281
HF8	LISSSQDGHQ	WTLFFQNGKV	KVFQGNQDSE
PF8	LVSSSQDGRR	WTLFLQDGHT	KVFQGNQDSS
MF8	LISSSQDGEH	WTQILYNGKV	KVFQGNQDSS
CF8	LISSSQDGEN	WTLFLQNGKV	KVFQGNROSS
	2291	2301	2311
HF8	TPVUNSLDPP	LLTRYLRIHP	QSWVHQIALR
PF8	TPVUNALDPP	LETAYLRIHP	TSWAQHIALR
MF8	TPMUNSLDPP	LLTRYLRIHP	QIWEHQIALR
CF8	TPVRNRLEPP	LVARYVRLHP	QSWAHHIALR
	2321	2331	
HF8	MEVLGCEAQD	LY	
PF8	LEVLGCEAQD	LY	
MF8	LEILGCEAQQ	QY	
CF8	LEVLGCDTQQ	PA	

图

1



图 2A



图 2B

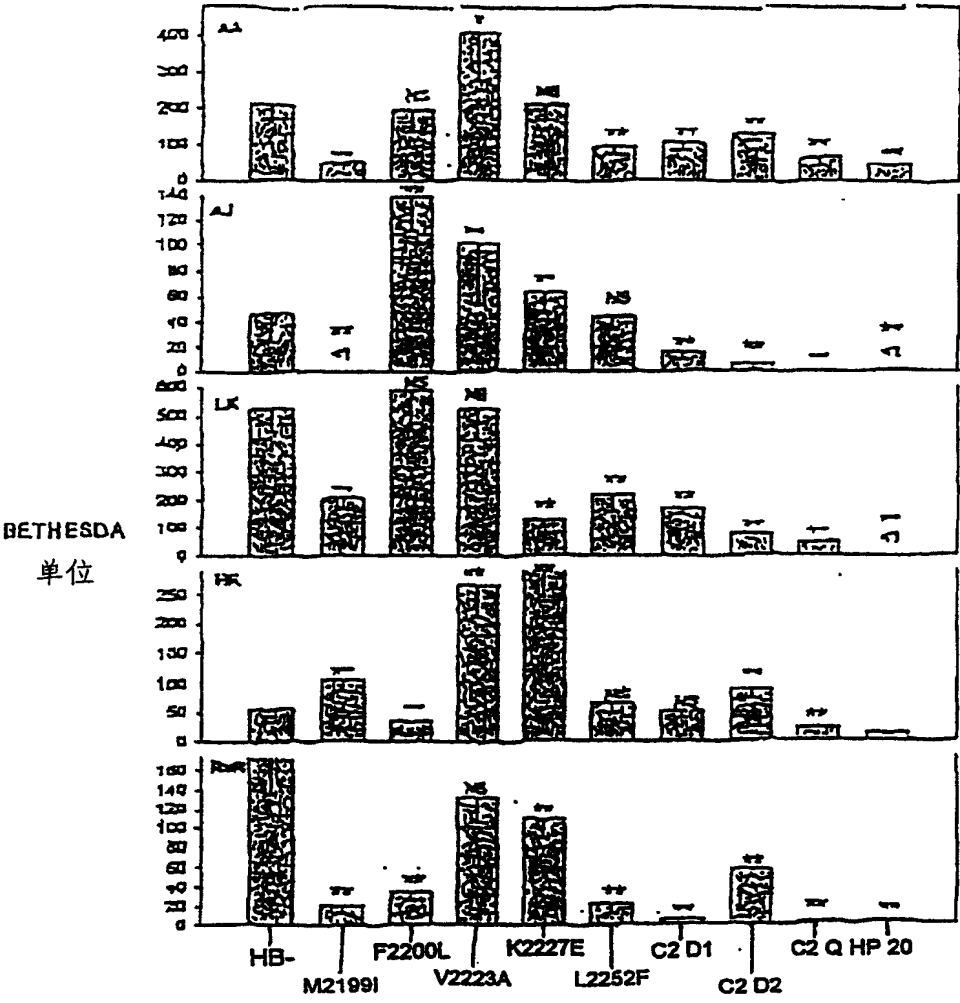


图 3

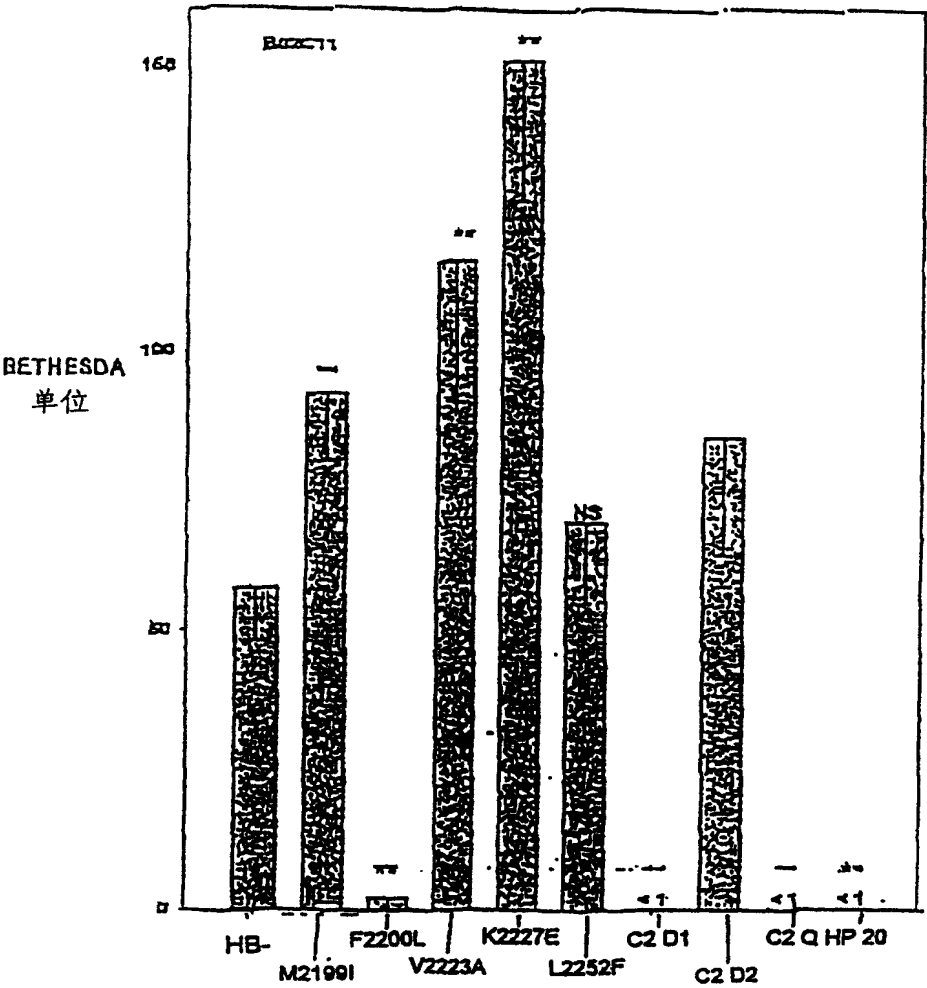


图 4

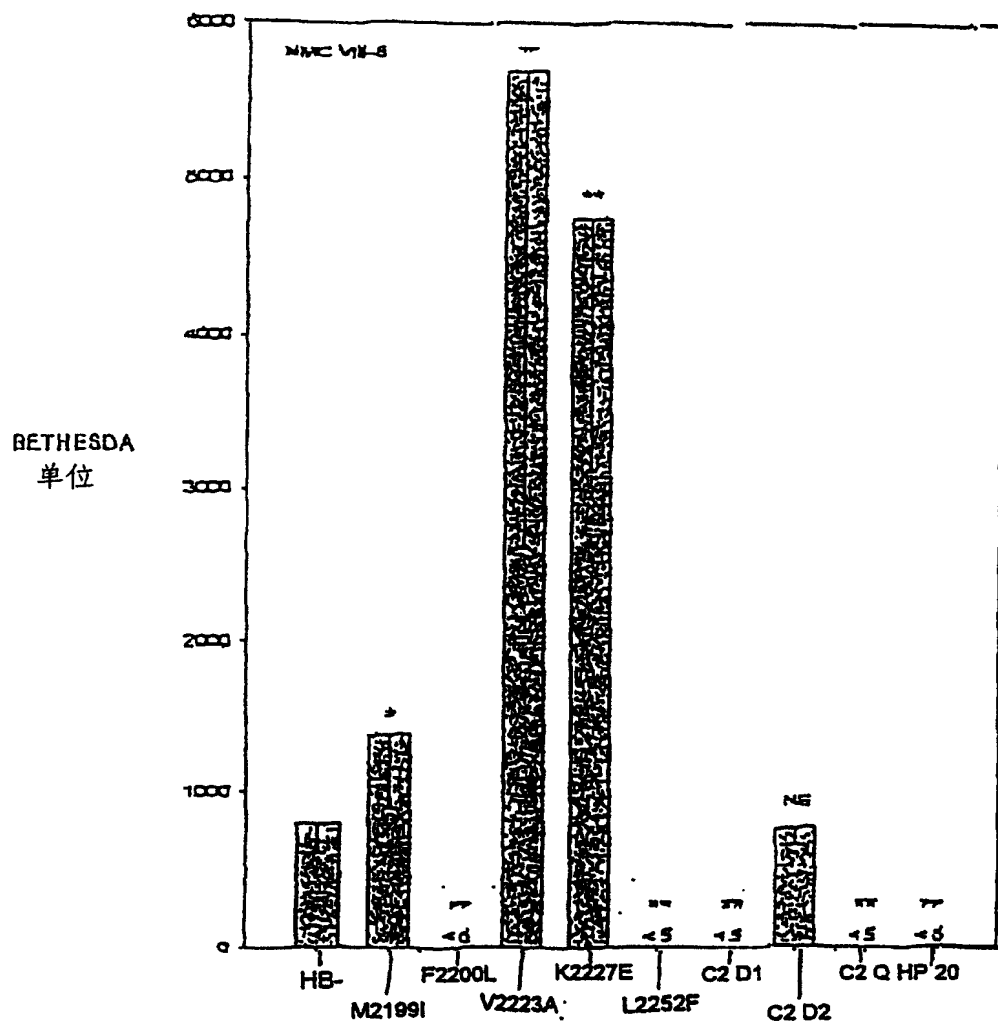


图 5