



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104926947 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 23

(21) 申请号 201510431485. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 10. 27

*C07K 19/00*(2006. 01)

(30) 优先权数据

*A61K 38/37*(2006. 01)

61/407, 402 2010. 10. 27 US

*A61P 37/02*(2006. 01)

61/467, 894 2011. 03. 25 US

*A61P 7/04*(2006. 01)

61/502, 476 2011. 06. 29 US

*C12P 21/02*(2006. 01)

*C12Q 1/02*(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

201180063117. 9 2011. 10. 27

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

(72) 发明人 卡塔琳娜·诺拉·施泰尼茨

保拉·玛利亚·威廉明娜范黑尔登

比吉特·玛利亚·赖佩特

汉斯-彼得·施瓦茨

哈特穆特·埃利希

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 汤国华

权利要求书2页 说明书70页

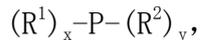
(54) 发明名称

用于免疫耐受性诱导和免疫诊断的 FVIII 肽

(57) 摘要

本发明涉及可用于在患有例如甲型血友病的患者中减少针对 FVIII 的免疫反应或诱导对人类 FVIII 的耐受性的肽。此外,所述肽可出于免疫诊断目的而用于检测 FVIII 特异性 CD4<sup>+</sup>T 细胞,以便在替补疗法期间并且在免疫耐受诱导疗法期间监测患有甲型血友病的患者。

1. 一种肽,其由以下氨基酸序列组成:



其中:

P 为与 SEQ ID NO:68 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列;

$R^1$  为由 5 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;

$R^2$  为由 5 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;并且

x 和 y 不都为 0。

2. 如权利要求 1 所述的肽,其中 P 为与 SEQ ID NO:68 具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

3. 如权利要求 1 所述的肽,其中 P 为与 SEQ ID NO:68 序列一致的氨基酸序列。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的肽,其中 x 为 1 且 y 为 0。

5. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的肽,其中 x 为 0 且 y 为 1。

6. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的肽,其中 x 和 y 都为 1。

7. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的肽,其中所述肽由 26 至 100 个氨基酸组成。

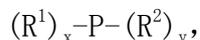
8. 如权利要求 7 所述的肽,其中所述肽由 26 至 50 个氨基酸组成。

9. 如权利要求 7 所述的肽,其中所述肽由 25 至 26 个氨基酸组成。

10. 一种组合物,其包含根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的肽。

11. 如权利要求 10 所述的组合物,其中所述组合物被配制用于药物施用。

12. 如权利要求 10 或 11 所述的组合物,其中所述组合物进一步包含第二多肽,所述第二多肽由以下氨基酸序列组成:



其中:

P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列;

$R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;

$R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;并且

x 和 y 各自独立地为 0 或 1。

13. 如前述权利要求任一项所述的肽或组合物在制备诱导个体 FVIII 免疫耐受性的药物中的应用。

14. 如权利要求 13 所述的应用,其中所述药物用于给药以防止个体发展抗 FVIII 抗体。

15. 如权利要求 13 所述的应用,其中所述药物用于给药以降低个体体内存在的抗 FVIII 抗体的量。

16. 一种制造 FVIII 肽的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 提供包含编码根据权利要求 1 至 9 中任一项所述的 FVIII 肽的多核苷酸的细胞培养物;和

b) 在所述细胞培养物中表达所述肽。

17. 一种鉴定 FVIII 肽特异性 T 细胞的方法,所述方法包括:

a) 使多种  $CD4^+$ T 细胞与同 MHC II 类多聚体复合的肽进行组合,其中所述肽为根据权利

要求 1 至 9 中任一项所述的 FVIII 肽 ;和

b) 鉴定对与 MHC II 类多聚体复合的肽有特异性的所述多种 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的至少一员。

18. 如权利要求 17 所述的方法,其中所述 MHC II 类多聚体为 MHC II 类四聚体。

19. 如权利要求 17 或 18 所述的方法,其中所述肽或 MHC II 类多聚体进一步包含可检测部分。

20. 根据权利要求 17 至 19 中任一项所述的方法,其进一步包括分离所述至少一种对所述肽有特异性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞。

21. 如权利要求 20 所述的方法,其中所述 CD4<sup>+</sup>T 细胞是使用流动式细胞测量术分离。

## 用于免疫耐受性诱导和免疫诊断的 FVIII 肽

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 10 月 27 日、申请号为 201180063117.9 (国际申请号为 PCT/US2011/058165)、名称为“用于免疫耐受性诱导和免疫诊断的 FVIII 肽”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2010 年 10 月 27 日提交的美国临时专利申请序号 61/407,402、2011 年 3 月 25 日提交的美国临时专利申请序号 61/467,894 以及 2011 年 6 月 29 日提交的美国临时专利申请序号 61/502,476 号的优先权,所述临时专利申请的公开内容是以全文引用的方式并入本文中以用于所有目的。

[0004] 关于在联邦赞助的研究或开发下作出的对发明的权利的声明

[0005] 不适用

[0006] 参考在压缩光盘上提交的“序列列表”、表格或计算机程序列表附件

[0007] 不适用

[0008] 发明背景

[0009] 因子 VIII (FVIII) 为一种在血浆中发现的在引起血液凝固的级联反应中充当辅因子的蛋白质。甲型血友病由功能性 FVIII 蛋白的减少或缺乏造成并且为影响每 5000 至 10000 个男性中约 1 人的最常见的出血病症之一。血友病的临床症状为频繁的肌肉和关节出血,且外伤甚至会引起危及生命的状况。目前,血友病的有效治疗包括使用重组或由血浆得到的 FVIII 产品的静脉内施加替补缺少的 FVIII 蛋白。所述制剂一般响应于出血事件施用(按需疗法(on-demand therapy))或按频繁、定期的时间间隔施用以防止不受控制的出血(预防)。不幸的是,中和抗 FVIII 抗体(FVIII 抑制剂)的出现为在使用 FVIII 产品的替补疗法期间的主要并发症。约 25% 接受治疗的患者对 FVIII 蛋白发展此免疫性,由此使得进一步控制出血极其困难。

[0010] 尚未完全阐明针对 FVIII 蛋白的这种免疫反应的原因,但患者免疫系统的特异性会影响其对于疗法的反应。通常,免疫系统对某些抗原(例如“自体”抗原)发展耐受性。此特征至关重要,因为否则的话,如果自体抗原被识别为外来抗原,那么导致自体免疫疾病。具体来说,甲型血友病患者在其 FVIII 基因中具有遗传缺陷,这导致免疫系统不将所施用的 FVIII 蛋白识别为“自体”抗原。因此,当在凝血因子替补疗法期间施用 FVIII 蛋白时,患者的免疫系统将 FVIII 蛋白识别为外来抗原或改变的自体蛋白并且因此发展抗 FVIII 抗体。

[0011] FVIII 抑制剂(即抗 FVIII 抗体)由来源于 FVIII 特异性 B 细胞的浆细胞产生。B 细胞需要活化 CD4<sup>+</sup>T 细胞的帮助以增殖并分化成产生抗 FVIII 抗体的浆细胞。例如,FVIII 蛋白由 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞以不同方式识别。抗 FVIII 抗体的诱导为 T 辅助细胞依赖型。B 细胞经由其特异性 B 细胞受体识别整个蛋白表位。另一方面,T 细胞识别呈与抗原呈现细胞表面上所呈现的 MHC II 类分子复合的加工的肽形式的蛋白质。各 CD4<sup>+</sup>T 细胞克隆仅识别一种特异性肽-MHC 复合物。为将肽呈现给 T 细胞,MHC II 类分子具有开放的结合槽(binding groove),其允许各种长度的肽适配装入并呈现在细胞表面上。此

外, MHC II 类蛋白含有四个结合袋 (binding pocket), 不同单倍体的结合袋不同 (Jones 等, Nature Rev. Immunol. 6:271-282(2006))。仅特异性氨基酸被适配装入这些结合袋中, 并且结合肽的最小尺寸为九个氨基酸。值得注意的是, 不同 MHC II 类单倍体可以呈现不同肽。因此, 患者的 MHC II 类单倍体可能影响发展抗 FVIII 抗体的危险性。实际上, 数项研究已经显示人类 MHC II 类单倍体 HLA-DRB1\*1501 与抗 FVIII 抗体发展的危险性增大存在相关性 (Pavlova 等, J. Thromb. Haemost. 7:2006-2015(2009); Oldenburg 等, Thromb. Haemost. 77:238-242(1997); Hay 等, Thromb. Haemost. 77:234-237(1997))。

[0012] 已经探索某些方法来解决与通过施用 FVIII 蛋白来治疗血友病有关的挑战。例如, WO 03/087161 公开了修饰的 FVIII 蛋白, 其中所述 FVIII 蛋白的免疫特征通过减少或移除所述蛋白质上存在的潜在 T 细胞表位的数目来改变。鉴定沿着 FVIII 蛋白的包括 T 细胞表位的许多区域, 包括例如 FVIII<sup>2030-2044</sup>。根据本公开, 移除所述区域可用以提供不诱导抗 FVIII 抗体产生的功能性 FVIII 蛋白。WO 09/071886 还公开了预计会产生患者免疫反应中所涉及的 HLA-DR2 结合肽的 FVIII 蛋白特定区域, 如 FVIII<sup>475-495</sup>、FVIII<sup>542-562</sup>、FVIII<sup>1785-1805</sup> 以及 FVIII<sup>2158-2178</sup>。鉴定可能用以在患者中诱导免疫耐受性的肽。

[0013] 虽然在鉴定免疫反应中所涉及的 FVIII 蛋白的区域方面已有进展, 但仍需要鉴定 FVIII 蛋白的可用于发展其它治疗性肽和方法的其它区域, 所述方法可以例如用以治疗甲型血友病患者。

[0014] 发明概述

[0015] 本发明是基于鉴定 FVIII 蛋白的与针对 FVIII 分子的免疫反应相关的区域。更确切地讲, 包含 FVIII 蛋白的所述区域的 FVIII 肽可用于在患有例如甲型血友病的患者中诱导对人类 FVIII 的耐受性。此外, 所述 FVIII 肽可用于免疫诊断目的, 以便在替补疗法期间并且在免疫耐受性诱导疗法期间监测患有甲型血友病的患者。

[0016] 在一方面中, 本发明提供一种在有需要的受试者中诱导对 FVIII 的免疫耐受性的方法, 所述方法包括以下步骤: 向所述受试者施用治疗有效量的具有由  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  组成的氨基酸序列的肽, 其中: P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸具有至少 85% 同一性的氨基酸序列;  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0017] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:10 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0018] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:10 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0019] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0020] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0021] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0022] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨

氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

[0023] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0024] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0025] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0026] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

[0027] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0028] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0029] 在上文所提供方法的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0030] 在上文所提供方法的一个实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0031] 在上文所提供方法的一个实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。

[0032] 在上文所提供方法的一个实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。

[0033] 在上文所提供方法的一个实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0034] 在上文所提供方法的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 100 个氨基酸组成。

[0035] 在上文所提供方法的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 50 个氨基酸组成。

[0036] 在上文所提供方法的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 25 个氨基酸组成。

[0037] 在上文所提供方法的一个实施方案中, 施用药物组合物可防止在受试者中发展抗 FVIII 抗体。

[0038] 在上文所提供方法的一个实施方案中, 施用药物组合物可减少在受试者中存在的抗 FVIII 抗体的量。

[0039] 在一方面中, 本发明提供一种由氨基酸序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  组成的肽, 其中 :P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列 ; $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ; $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0040] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:10 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0041] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:10 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0042] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0043] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0044] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:68 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0045] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

[0046] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0047] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0048] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:344 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0049] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。

[0050] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0051] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0052] 在上文所提供肽的一个实施方案中, P 为与 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列一致的氨基酸序列。

[0053] 在上文所提供肽的一个实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0054] 在上文所提供肽的一个实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。

[0055] 在上文所提供肽的一个实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。

[0056] 在上文所提供肽的一个实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0057] 在上文所提供肽的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 100 个氨基酸组成。

[0058] 在上文所提供肽的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 50 个氨基酸组成。

[0059] 在上文所提供肽的一个实施方案中, 所述肽由 9 至 25 个氨基酸组成。

[0060] 在一方面中, 本发明提供一种包含如本文所述的肽的组合物。

[0061] 在上文所提供的组合物的一个实施方案中, 所述组合物被配制用于药物施用。

[0062] 在上文所提供的组合物的一个实施方案中, 所述组合物进一步包含第二多肽, 所述第二多肽由氨基酸序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  组成, 其中: P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列;  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0063] 在一方面中, 本发明提供一种制造 FVIII 肽的方法, 所述方法包括以下步骤: a) 提供包含编码根据权利要求 24 至 41 中任一项所述的 FVIII 肽的多核苷酸的细胞培养物; 和 b) 在所述细胞培养物中表达所述肽。

[0064] 在一方面中, 本发明提供一种鉴定 FVIII 肽特异性 T 细胞的方法, 所述方法包括: a) 使多种 CD4<sup>+</sup>T 细胞与同 MHC II 类多聚体复合的肽进行组合, 其中所述肽为根据权利要求 24 至 41 中任一项所述的 FVIII 肽; 和 b) 鉴定对与 MHC II 类多聚体复合的肽具有特异

性的所述多种 CD4+T 细胞中的至少一员。

[0065] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述 MHC II 类多聚体为 MHC II 类四聚体。

[0066] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述肽或 MHC II 类多聚体进一步包含可检测部分。

[0067] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括分离对所述肽具有特异性的至少一种 CD4+T 细胞。

[0068] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述 CD4+T 细胞是使用流动式细胞测量术进行分离。

[0069] 在一方面中,本发明提供一种融合蛋白,其包含如本文中所提供的 FVIII 肽和第二肽。

[0070] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述第二肽为报导体肽。

[0071] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述融合蛋白由核酸编码。

[0072] 在上文所提供方法的一个实施方案中,所述 FVIII 肽被化学连接至所述第二肽。

[0073] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用以诱导针对人类 FVIII 的免疫耐受性以便防止 FVIII 抑制剂发展。

[0074] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用以诱导针对人类 FVIII 的免疫耐受性以便治疗具有确定的 FVIII 抑制剂的患者。

[0075] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用以产生适于在替补疗法期间或在免疫耐受性诱导疗法期间在免疫监测患者时使 FVIII 特异性 T 细胞直接染色的试剂(例如 MHC II 类多聚体或 MHC II 类四聚体)。

[0076] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用以鉴定抗原特异性 T 细胞。在一个实施方案中,这些试剂可用于在体外和离体环境中追踪 FVIII 特异性 T 细胞。在另一实施方案中,这些试剂可用于分离和进一步表征 FVIII 特异性 T 细胞。在一个实施方案中,荧光活化细胞分选 (fluorescent activated cell sorting ;FACS) 或单细胞 PCR 可用于这些目的。

[0077] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用于在免疫耐受性诱导疗法期间免疫监测 FVIII 特异性 T 细胞。

[0078] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用于在 FVIII 治疗期间免疫监测 FVIII 特异性 T 细胞。

[0079] 在一方面中,本文中所提供的 FVIII 肽用于在临床开发用于防止 FVIII 抑制剂产生的新型免疫调节剂期间免疫诊断 FVIII 特异性 T 细胞。

[0080] 附图简述

[0081] 不适用。

[0082] 发明详述

[0083] I. 引言

[0084] 本发明涉及因子 VIII (FVIII) 肽,其可用于在例如患有甲型血友病的患者中诱导对 FVIII 蛋白的耐受性。此外,所述肽可用于免疫诊断目的,以便在替补疗法期间并且在免疫耐受性诱导疗法期间在患有甲型血友病的患者中监测 FVIII 特异性 T 细胞。

[0085] 本发明部分基于以下发现:FVIII 的数个区域(确切地讲有 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>以及 FVIII<sup>1401-1424</sup>)涉及在因子 VIII 替补疗法期间针对 FVIII 蛋白产生的免疫反应中或与

后天性血友病相关联。所鉴定的区域的氨基酸序列分别为 TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740)、AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 以及 QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344)。相信本发明提供这些 FVIII 蛋白区和它们与对 FVIII 蛋白的免疫反应的关系的第一次鉴定。

[0086] 本发明的肽包括具有区域 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>以及 FVIII<sup>1401-1424</sup>的至少一部分的肽,所述肽与 MHC II 类分子复合而产生能够由患者免疫反应中所涉及的 T 细胞识别的 T 细胞表位。在一些实施方案中,所述肽包括至少九个邻接氨基酸,所述至少九个邻接氨基酸与 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>或 FVIII<sup>1401-1424</sup>中的九个邻接氨基酸相对应。如下文进一步描述,本文中提供的肽还包括长度上长于九个氨基酸的肽和 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>以及 FVIII<sup>1401-1424</sup>序列的变异体。本发明肽的这种鉴定可牵涉在改进和推进被设计以治疗与血液凝固相关的疾病(如甲型血友病)的治疗性策略方面。

## [0087] II. 定义

[0088] 术语“因子 VIII 蛋白”或“FVIII 蛋白”是指具有完整 B 域的至少一部分并且展现出与天然人类 FVIII 蛋白有关的生物活性的任何 FVIII 分子。FVIII 分子可以为全长 FVIII。FVIII 分子还可以为天然 FVIII 的经过保守修饰的变异体。FVIII 蛋白可来源于人类血浆或通过重组工程改造技术产生。FVIII 蛋白的其它表征可例如见于 US2010/0168018 的段落 [0042]-[0055],所述文献是以引用的方式并入本文中。

[0089] 术语“因子 VIII 肽”或“FVIII 肽”是指本文所述的肽,其包含对应于被发现在针对 FVIII 的免疫反应中至关重要的 FVIII 蛋白的区域的氨基酸序列。FVIII 肽包含至少九个氨基酸,所述至少九个氨基酸与 MHC II 类蛋白复合以便呈现给免疫反应中所涉及的 T 细胞。其它氨基酸可以存在于所述肽的至少九个氨基酸核心的任一端。在一些实施方案中,FVIII 肽可以包含与天然人类 FVIII 蛋白的特定区域一致的序列。在其它实施方案中,FVIII 肽可以为 FVIII 蛋白的区域的经过保守修饰的变异体。如本文中进一步描述,FVIII 肽的特征可以为相对于天然人类 FVIII 蛋白的区域的序列的某种同一性百分比(例如 85%一致)。

[0090] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和非天然氨基酸,包括以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸包括由遗传密码编码的氨基酸以及后来修饰的氨基酸,例如羟基脯氨酸、 $\gamma$ -羧基谷氨酸以及 O-磷酸丝氨酸。天然存在的氨基酸可以包括例如 D-氨基酸和 L-氨基酸。本文中所用的氨基酸还可以包括非天然氨基酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即与氢、羧基、氨基以及 R 基键接的任何碳)的化合物,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷或甲硫氨酸甲基砷。所述类似物具有经过修饰的 R 基(例如正亮氨酸)或经过修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有不同于氨基酸的一般化学结构的结构、但以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的化合物。氨基酸在本文中可以用其通常已知的三字母符号或用由 IUPAC-IUB 生化命名委员会(IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission)推荐的一字母符号提及。同样,核苷酸可以用其通常认可的单字母代码提及。

[0091] “经过保守修饰的变异体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,经过保守修饰的变异体是指编码一致或基本上一致的氨基酸序列的核酸,或当核酸并不编码氨基酸序列时,是指基本上一致的序列。由于遗传密码的简并,大量功能上相同的核酸编码

任何给定的肽。例如,密码子 GCA、GCC、GCG 以及 GCU 皆编码氨基酸丙氨酸。因此,在丙氨酸由密码子指定的每个位置上,密码子可以变成所描述的相应密码子中的任一个,而不改变所编码的多肽。所述核酸变异为“沉默变异”,其为一种经过保守修饰的变异。本文中编码多肽的每个核酸序列还说明每种可能的核酸沉默变异。本领域的普通技术人员将认识到核酸中的各密码子(除了通常为甲硫氨酸的唯一密码子的 AUG 和通常为色氨酸的唯一密码子的 TGG 以外)可被修饰以获得功能上相同的分子。因此,编码多肽的核酸的各沉默变异在相对于表达产物而非相对于实际探测序列所述的各序列中为隐含的。

[0092] 关于氨基酸序列,本领域的普通技术人员将认识到改变、添加或删除编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸的对于核酸或肽序列的个别取代、删除或添加为“经过保守修饰的变异”,其中变化使得氨基酸被化学上类似的氨基酸取代。提供功能上类似的氨基酸的保守性取代表格在本领域中是熟知的。所述经过保守修饰的变异体为除了本发明的多态变异体、种间同系物以及等位基因以外的变异体并且并不排除本发明的多态变异体、种间同系物以及等位基因。

[0093] 以下八组各含有可以为彼此的保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G); 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K); 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。参见例如 Creighton, Proteins(1984)。

[0094] 在两个或两个以上核酸或肽序列的背景中,术语“一致”或“同一性”百分比是指如使用 BLAST 或 BLAST 2.0 序列比较算法与如下所述的预设参数或通过人工比对和目视检查所测量,两个或两个以上序列或子序列相同或具有指定百分比的相同氨基酸残基或核苷酸(即,当比较和比对与比较窗或指定区相比的最大对应性时,相比于指定区有约 60% 同一性,优选为 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高同一性)。

[0095] “治疗有效量或剂量”或“足够量或剂量”在本文中意指在施用时产生效应的剂量。精确剂量将取决于治疗目的并且可以由本领域技术人员使用已知技术来确定(参见例如 Augsburger&Hoag, Pharmaceutical Dosage Forms(第 1-3 卷,第 3 版,2008); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(第 3 版,2008); Pickar, Dosage Calculations(第 8 版,2007);以及 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 21 版,2005, Gennaro 编, Lippincott, Williams&Wilkins)。

[0096] III. FVIII 肽

[0097] 本发明涉及与 FVIII 蛋白的在针对 FVIII 的免疫反应中涉及的区域对应的 FVIII 肽。在一方面中,本发明提供一种 FVIII 肽,其由九个氨基酸的连续序列组成,所述序列与以下氨基酸序列之一中的九个连续氨基酸至少 85% 一致: AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO: 68); QANRSLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344); 或 TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO: 740), 其中所述肽由 9 至 180 个氨基酸组成。

[0098] 在一个特定实施方案中,所述 FVIII 肽具有以下序列:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , 其中 P 为与选自 SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO: 344 以及 SEQ ID NO: 740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列; R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R2

为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列；并且  $x$  和  $y$  各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中， $R^1$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列，且  $R^2$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0099] 在一个实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中， $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0100] 在一个实施方案中，FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中，FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中，FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中，FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中，FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0101] 一般来说，本发明的 FVIII 肽可以包括 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup> 或 FVIII<sup>1401-1424</sup>、或经过修饰的变异体的鉴定区中所存在的任何氨基酸序列，所述变异体可以例如具有与 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup> 或 FVIII<sup>1401-1424</sup> 相似或相同的保留功能。具体来说，本发明的 FVIII 肽包含含有 T 细胞表位的氨基酸序列。所述 FVIII 肽包括相对于氨基酸序列 AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68)、QANRSPLPIAKVSSFPPIRPIYLT (SEQ ID NO:344)、或 TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740) 的氨基酸序列，同一性百分比可在一定范围内变化的至少九个氨基酸的序列。例如，FVIII 肽可以具有与 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup> 或 FVIII<sup>1401-1424</sup> 中任意九个连续氨基酸一致或至少 50%、60%、70%、80% 或 85% (百分比) 一致的九个氨基酸。

[0102] 在另一组实施方案中，FVIII 肽可以具有多于九个氨基酸的氨基酸序列，其中所述氨基酸序列包括可以与 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup> 或 FVIII<sup>1401-1424</sup> 中的连续氨基酸序列一致或至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% (百分比) 一致的区域。本领域的普通技术人员应了解已知诱变技术 (如丙氨酸取代) 可以用以鉴定保留 FVIII<sup>102-122</sup>、FVIII<sup>246-266</sup> 或 FVIII<sup>1401-1424</sup> 区的功能的经过修饰的变异体。

[0103] 另外, FVIII 肽可以在上文所论述的 FVIII 肽核心序列的任一端进一步包括其它氨基酸序列。其它序列指示为  $(R^1)_x$  和  $(R^2)_y$ 。在某些实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  的长度范围可介于 1 至约 80 个氨基酸。或者,  $R^1$  和  $R^2$  的长度范围可介于 1 至约 40 个氨基酸。在某些实施方案中, 下标  $x$  和  $y$  各独立地为 0 或 1。在一些实施方案中,  $x$  与  $y$  可以均为 0。在其它实施方案中,  $x$  可为 1 且  $y$  可为 0。在其它实施方案中,  $x$  可为 0 且  $y$  可为 1。在另一实施方案中,  $x$  与  $y$  均为 1。由于以下各种原因可以在任一端添加其它氨基酸, 所述原因包括增加肽稳定性、改善与 MHC II 类分子和 / 或 T 细胞的结合以及本领域的普通技术人员所将了解的其它方面。

[0104] 在一个实施方案中, 本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽, 其中 P 为与表 1 中所鉴定的因子 VIII 区的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中  $x$  和  $y$  各独立地为 0 或 1。或者,  $R^1$  和  $R^2$  的长度范围可介于 1 至约 40 个氨基酸。在一个实施方案中, P 为与表 1 中所鉴定的因子 VIII 区的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在另一实施方案中, P 为与表 1 中所鉴定的因子 VIII 区的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,  $x$  与  $y$  可均为 0。在其它实施方案中,  $x$  可为 1 且  $y$  可为 0。在其它实施方案中,  $x$  可为 0 且  $y$  可为 1。在另一实施方案中,  $x$  与  $y$  可均为 1。在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。

[0105] 表 1. FVIII 的包括 T 细胞表位的区域

[0106]

包括 T 细胞表位的区域	氨基酸序列
FVIII <sup>102-119</sup>	TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10)
FVIII <sup>246-266</sup>	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68)
FVIII <sup>474-494</sup>	GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)
FVIII <sup>540-560</sup>	PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250)
FVIII <sup>1401-1424</sup>	QANRSPLPIAKVSSFP SIRPIYLT (SEQ ID NO:344)
FVIII <sup>1785-1805</sup>	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)
FVIII <sup>2025-2045</sup>	LHAGMSTLFLVYSNKCQ TPLG (SEQ ID NO:568)
FVIII <sup>2160-2180</sup>	NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)
FVIII <sup>102-122</sup>	TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (SEQ ID NO:740)

[0107] 如上所述, 本发明的 FVIII 肽可以包括 FVIII<sup>1401-1424</sup>、或经修饰的变异体的鉴定区中所存在的任何氨基酸序列, 所述变异体可以例如具有与 FVIII<sup>1401-1424</sup> 相似或一致的保留

功能。在某些实施方案中,所述肽可涵盖人类 FVIII 蛋白的整个 B 域。本发明还可以包括其它 FVIII 肽,所述肽包括具有至少九个氨基酸的序列的肽,所述序列相对于以下氨基酸序列中的任一个的同一性百分比可在一定范围内变化:GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (FVIII<sup>474-494</sup>; SEQ ID NO:159)、PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (FVIII<sup>540-560</sup>;SEQ ID NO:250)、EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (FVIII<sup>1785-1805</sup>;SEQ ID NO:477)、LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (FVIII<sup>2025-2045</sup>;SEQ ID NO:568)、NPPIIARYIRLHPHTYSIRST (FVIII<sup>2160-2180</sup>;SEQ ID NO:659)、TVVITLKNMASHPVS LHA (FVIII<sup>102-119</sup>;SEQ ID NO:10)、AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (FVIII<sup>246-266</sup>;SEQ ID NO:68) 以及 TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (FVIII<sup>102-122</sup>;SEQ ID NO:740)。

[0108] 例如, FVIII 肽具有与 FVIII<sup>474-494</sup>、FVIII<sup>540-560</sup>、FVIII<sup>1785-1805</sup>、FVIII<sup>2025-2045</sup>、FVIII<sup>2160-2180</sup>、FVIII<sup>102-119</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>或 FVIII<sup>102-122</sup>中任意九个连续氨基酸一致或至少 50%、60%、70%、80%或 85% (百分比) 一致的九个氨基酸。在另一组实施方案中, FVIII 肽可以具有多于九个氨基酸的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列可以与 FVIII<sup>474-494</sup>、FVIII<sup>540-560</sup>、FVIII<sup>1785-1805</sup>、FVIII<sup>2025-2045</sup>、FVIII<sup>2160-2180</sup>、FVIII<sup>102-119</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>或 FVIII<sup>102-122</sup>中任意九个连续氨基酸一致或至少 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% (百分比) 一致。本领域的普通技术人员应了解, 已知诱变技术 (如丙氨酸取代) 可以用以鉴定保留 FVIII<sup>474-494</sup>、FVIII<sup>540-560</sup>、FVIII<sup>1785-1805</sup>、FVIII<sup>2025-2045</sup>、FVIII<sup>2160-2180</sup>、FVIII<sup>102-119</sup>、FVIII<sup>246-266</sup>或 FVIII<sup>102-122</sup>区域的功能的经过修饰的变体。此处所公开的 FVIII 肽可以使用以上关于与 FVIII<sup>1401-1424</sup>有关的 FVIII 肽所述的方法制得。

[0109] A. 因子 VIII<sup>102-119</sup>肽

[0110] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽,其中 P 为与具有序列 :TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10) 的因子 VIII<sup>102-119</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0111] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10) 的因子 VIII<sup>102-119</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 (SEQ ID NO:10) 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0112] 在一个实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或

两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0113] 在某些实施方案中,  $R^1$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 且  $R^2$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0114] 表 2. 示例性 FVIII<sup>102-119</sup> 肽

[0115]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>102-119</sup> -1	TVVITLKNM	1
FVIII <sup>102-119</sup> -2	TVVITLKNMA	2
FVIII <sup>102-119</sup> -3	TVVITLKNMAS	3
FVIII <sup>102-119</sup> -4	TVVITLKNMASH	4
FVIII <sup>102-119</sup> -5	TVVITLKNMASHP	5
FVIII <sup>102-119</sup> -6	TVVITLKNMASHPV	6
FVIII <sup>102-119</sup> -7	TVVITLKNMASHPVS	7
FVIII <sup>102-119</sup> -8	TVVITLKNMASHPVSL	8
FVIII <sup>102-119</sup> -9	TVVITLKNMASHPVSLH	9
FVIII <sup>102-119</sup> -10	TVVITLKNMASHPVSLHA	10
FVIII <sup>102-119</sup> -11	VVITLKNMA	11
FVIII <sup>102-119</sup> -12	VVITLKNMAS	12

[0116]

FVIII <sup>102-119</sup> -13	VVITLKNMASH	13
FVIII <sup>102-119</sup> -14	VVITLKNMASHP	14
FVIII <sup>102-119</sup> -15	VVITLKNMASHPV	15
FVIII <sup>102-119</sup> -16	VVITLKNMASHPVS	16
FVIII <sup>102-119</sup> -17	VVITLKNMASHPVSL	17
FVIII <sup>102-119</sup> -18	VVITLKNMASHPVSLH	18
FVIII <sup>102-119</sup> -19	VVITLKNMASHPVSLHA	19
FVIII <sup>102-119</sup> -20	VITLKNMAS	20
FVIII <sup>102-119</sup> -21	VITLKNMASH	21
FVIII <sup>102-119</sup> -22	VITLKNMASHP	22
FVIII <sup>102-119</sup> -23	VITLKNMASHPV	23
FVIII <sup>102-119</sup> -24	VITLKNMASHPVS	24
FVIII <sup>102-119</sup> -25	VITLKNMASHPVSL	25
FVIII <sup>102-119</sup> -26	VITLKNMASHPVSLH	26
FVIII <sup>102-119</sup> -27	VITLKNMASHPVSLHA	27
FVIII <sup>102-119</sup> -28	ITLKNMASH	28
FVIII <sup>102-119</sup> -29	ITLKNMASHP	29
FVIII <sup>102-119</sup> -30	ITLKNMASHPV	30
FVIII <sup>102-119</sup> -31	ITLKNMASHPVS	31
FVIII <sup>102-119</sup> -32	ITLKNMASHPVSL	32
FVIII <sup>102-119</sup> -33	ITLKNMASHPVSLH	33
FVIII <sup>102-119</sup> -34	ITLKNMASHPVSLHA	34
FVIII <sup>102-119</sup> -35	TLKNMASHP	35
FVIII <sup>102-119</sup> -36	TLKNMASHPV	36

FVIII <sup>102-119</sup> -37	TLKNMASHPVS	37
FVIII <sup>102-119</sup> -38	TLKNMASHPVSL	38
FVIII <sup>102-119</sup> -39	TLKNMASHPVSLH	39
FVIII <sup>102-119</sup> -40	TLKNMASHPVSLHA	40
FVIII <sup>102-119</sup> -41	LKNMASHPV	41
FVIII <sup>102-119</sup> -42	LKNMASHPVS	42
FVIII <sup>102-119</sup> -43	LKNMASHPVSL	43
FVIII <sup>102-119</sup> -44	LKNMASHPVSLH	44
FVIII <sup>102-119</sup> -45	LKNMASHPVSLHA	45
FVIII <sup>102-119</sup> -46	KNMASHPVS	46
FVIII <sup>102-119</sup> -47	KNMASHPVSL	47
FVIII <sup>102-119</sup> -48	KNMASHPVSLH	48
FVIII <sup>102-119</sup> -49	KNMASHPVSLHA	49
FVIII <sup>102-119</sup> -50	NMASHPVSL	50
FVIII <sup>102-119</sup> -51	NMASHPVSLH	51
FVIII <sup>102-119</sup> -52	NMASHPVSLHA	52
FVIII <sup>102-119</sup> -53	MASHPVSLH	53
FVIII <sup>102-119</sup> -54	MASHPVSLHA	54
FVIII <sup>102-119</sup> -55	ASHPVSLHA	55

[0117] B. 因子 VIII<sup>246-266</sup>肽

[0118] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽,其中P为与具有序列 :AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0119] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 的因子 VIII<sup>246-266</sup>

肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:56 至 SEQ ID NO:146 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:56 至 SEQ ID NO:146 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:56 至 SEQ ID NO:146 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:56 至 SEQ ID NO:146 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0120] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0121] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0122] 表 3. 示例性 FVIII<sup>246-266</sup> 肽

[0123]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>246-266</sup> -1	AWPKMHTVN	56
FVIII <sup>246-266</sup> -2	AWPKMHTVNG	57
FVIII <sup>246-266</sup> -3	AWPKMHTVNGY	58
FVIII <sup>246-266</sup> -4	AWPKMHTVNGYV	59

FVIII <sup>246-266</sup> -5	AWPKMHTVNGYVN	60
FVIII <sup>246-266</sup> -6	AWPKMHTVNGYVNR	61
FVIII <sup>246-266</sup> -7	AWPKMHTVNGYVNRS	62
FVIII <sup>246-266</sup> -8	AWPKMHTVNGYVNRSL	63
FVIII <sup>246-266</sup> -9	AWPKMHTVNGYVNRSLP	64
FVIII <sup>246-266</sup> -10	AWPKMHTVNGYVNRSLPG	65

## [0124]

FVIII <sup>246-266</sup> -11	AWPKMHTVNGYVNRSLPGL	66
FVIII <sup>246-266</sup> -12	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLI	67
FVIII <sup>246-266</sup> -13	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG	68
FVIII <sup>246-266</sup> -14	WPKMHTVNG	69
FVIII <sup>246-266</sup> -15	WPKMHTVNGY	70
FVIII <sup>246-266</sup> -16	WPKMHTVNGYV	71
FVIII <sup>246-266</sup> -17	WPKMHTVNGYVN	72
FVIII <sup>246-266</sup> -18	WPKMHTVNGYVNR	73
FVIII <sup>246-266</sup> -19	WPKMHTVNGYVNRS	74
FVIII <sup>246-266</sup> -20	WPKMHTVNGYVNRSL	75
FVIII <sup>246-266</sup> -21	WPKMHTVNGYVNRSLP	76
FVIII <sup>246-266</sup> -22	WPKMHTVNGYVNRSLPG	77
FVIII <sup>246-266</sup> -23	WPKMHTVNGYVNRSLPGL	78
FVIII <sup>246-266</sup> -24	WPKMHTVNGYVNRSLPGLI	79
FVIII <sup>246-266</sup> -25	WPKMHTVNGYVNRSLPGLIG	80
FVIII <sup>246-266</sup> -26	PKMHTVNGY	81
FVIII <sup>246-266</sup> -27	PKMHTVNGYV	82

FVIII <sup>246-266</sup> -28	PKMHTVNGYVN	83
FVIII <sup>246-266</sup> -29	PKMHTVNGYVNR	84
FVIII <sup>246-266</sup> -30	PKMHTVNGYVNRS	85
FVIII <sup>246-266</sup> -31	PKMHTVNGYVNRSL	86
FVIII <sup>246-266</sup> -32	PKMHTVNGYVNRSLP	87
FVIII <sup>246-266</sup> -33	PKMHTVNGYVNRSLPG	88
FVIII <sup>246-266</sup> -34	PKMHTVNGYVNRSLPGL	89
FVIII <sup>246-266</sup> -35	PKMHTVNGYVNRSLPGLI	90
FVIII <sup>246-266</sup> -36	PKMHTVNGYVNRSLPGLIG	91
FVIII <sup>246-266</sup> -37	KMHTVNGYV	92
FVIII <sup>246-266</sup> -38	KMHTVNGYVN	93
FVIII <sup>246-266</sup> -39	KMHTVNGYVNR	94
FVIII <sup>246-266</sup> -40	KMHTVNGYVNRS	95
FVIII <sup>246-266</sup> -41	KMHTVNGYVNRSL	96
FVIII <sup>246-266</sup> -42	KMHTVNGYVNRSLP	97
FVIII <sup>246-266</sup> -43	KMHTVNGYVNRSLPG	98
FVIII <sup>246-266</sup> -44	KMHTVNGYVNRSLPGL	99
FVIII <sup>246-266</sup> -45	KMHTVNGYVNRSLPGLI	100
FVIII <sup>246-266</sup> -46	KMHTVNGYVNRSLPGLIG	101
FVIII <sup>246-266</sup> -47	MHTVNGYVN	102
FVIII <sup>246-266</sup> -48	MHTVNGYVNR	103
FVIII <sup>246-266</sup> -49	MHTVNGYVNRS	104
FVIII <sup>246-266</sup> -50	MHTVNGYVNRSL	105
FVIII <sup>246-266</sup> -51	MHTVNGYVNRSLP	106

FVIII <sup>246-266</sup> -52	MHTVNGYVNRSLPG	107
FVIII <sup>246-266</sup> -53	MHTVNGYVNRSLPGL	108
FVIII <sup>246-266</sup> -54	MHTVNGYVNRSLPGLI	109
FVIII <sup>246-266</sup> -55	MHTVNGYVNRSLPGLIG	110
FVIII <sup>246-266</sup> -56	HTVNGYVNR	111
FVIII <sup>246-266</sup> -57	HTVNGYVNR	112
FVIII <sup>246-266</sup> -58	HTVNGYVNRSL	113

## [0125]

FVIII <sup>246-266</sup> -59	HTVNGYVNRSLP	114
FVIII <sup>246-266</sup> -60	HTVNGYVNRSLPG	115
FVIII <sup>246-266</sup> -61	HTVNGYVNRSLPGL	116
FVIII <sup>246-266</sup> -62	HTVNGYVNRSLPGLI	117
FVIII <sup>246-266</sup> -63	HTVNGYVNRSLPGLIG	118
FVIII <sup>246-266</sup> -64	TVNGYVNR	119
FVIII <sup>246-266</sup> -65	TVNGYVNRSL	120
FVIII <sup>246-266</sup> -66	TVNGYVNRSLP	121
FVIII <sup>246-266</sup> -67	TVNGYVNRSLPG	122
FVIII <sup>246-266</sup> -68	TVNGYVNRSLPGL	123
FVIII <sup>246-266</sup> -69	TVNGYVNRSLPGLI	124
FVIII <sup>246-266</sup> -70	TVNGYVNRSLPGLIG	125
FVIII <sup>246-266</sup> -71	VNGYVNRSL	126
FVIII <sup>246-266</sup> -72	VNGYVNRSLP	127
FVIII <sup>246-266</sup> -73	VNGYVNRSLPG	128
FVIII <sup>246-266</sup> -74	VNGYVNRSLPGL	129

FVIII <sup>246-266</sup> -75	VNGYVNRSLPGLI	130
FVIII <sup>246-266</sup> -76	VNGYVNRSLPGLIG	131
FVIII <sup>246-266</sup> -77	NGYVNRSLP	132
FVIII <sup>246-266</sup> -78	NGYVNRSLPG	133
FVIII <sup>246-266</sup> -79	NGYVNRSLPGL	134
FVIII <sup>246-266</sup> -80	NGYVNRSLPGLI	135
FVIII <sup>246-266</sup> -81	NGYVNRSLPGLIG	136
FVIII <sup>246-266</sup> -82	GYVNRSLPG	137
FVIII <sup>246-266</sup> -83	GYVNRSLPGL	138
FVIII <sup>246-266</sup> -84	GYVNRSLPGLI	139
FVIII <sup>246-266</sup> -85	GYVNRSLPGLIG	140
FVIII <sup>246-266</sup> -86	YVNRSLPGL	141
FVIII <sup>246-266</sup> -87	YVNRSLPGLI	142
FVIII <sup>246-266</sup> -88	YVNRSLPGLIG	143
FVIII <sup>246-266</sup> -89	VNRSLPGLI	144
FVIII <sup>246-266</sup> -90	VNRSLPGLIG	145
FVIII <sup>246-266</sup> -91	NRSLPGLIG	146

[0126] C. 因子 VIII<sup>474-494</sup>肽

[0127] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽,其中P为与具有序列 :GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159) 的因子 VIII<sup>474-494</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0128] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159) 的因子 VIII<sup>474-494</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159) 的因子 VIII<sup>474-494</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:147 至 SEQ ID NO:237 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:147 至 SEQ ID NO:237 的序列具有

至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:147 至 SEQ ID NO:237 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:147 至 SEQ ID NO:237 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0129] 在某些实施方案中, R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0130] 表 4. 示例性 FVIII<sup>474-494</sup> 肽

[0131]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>474-494</sup> -1	GEVDTLLI	147
FVIII <sup>474-494</sup> -2	GEVDTLLII	148
FVIII <sup>474-494</sup> -3	GEVDTLLIIF	149
FVIII <sup>474-494</sup> -4	GEVDTLLIIFK	150
FVIII <sup>474-494</sup> -5	GEVDTLLIIFKN	151
FVIII <sup>474-494</sup> -6	GEVDTLLIIFKNQ	152
FVIII <sup>474-494</sup> -7	GEVDTLLIIFKNQA	153
FVIII <sup>474-494</sup> -8	GEVDTLLIIFKNQAS	154
FVIII <sup>474-494</sup> -9	GEVDTLLIIFKNQASR	155
FVIII <sup>474-494</sup> -10	GEVDTLLIIFKNQASRP	156
FVIII <sup>474-494</sup> -11	GEVDTLLIIFKNQASRPY	157
FVIII <sup>474-494</sup> -12	GEVDTLLIIFKNQASRPYN	158
FVIII <sup>474-494</sup> -13	GEVDTLLIIFKNQASRPYNI	159

FVIII <sup>474-494</sup> -14	EVGDTLII	160
FVIII <sup>474-494</sup> -15	EVGDTLIIIF	161
FVIII <sup>474-494</sup> -16	EVGDTLIIIFK	162
FVIII <sup>474-494</sup> -17	EVGDTLIIIFKN	163
FVIII <sup>474-494</sup> -18	EVGDTLIIIFKNQ	164
FVIII <sup>474-494</sup> -19	EVGDTLIIIFKNQA	165
FVIII <sup>474-494</sup> -20	EVGDTLIIIFKNQAS	166
FVIII <sup>474-494</sup> -21	EVGDTLIIIFKNQASR	167
FVIII <sup>474-494</sup> -22	EVGDTLIIIFKNQASRP	168
FVIII <sup>474-494</sup> -23	EVGDTLIIIFKNQASRPY	169
FVIII <sup>474-494</sup> -24	EVGDTLIIIFKNQASRPYN	170
FVIII <sup>474-494</sup> -25	EVGDTLIIIFKNQASRPYNI	171
FVIII <sup>474-494</sup> -26	VGDTLIIIF	172
FVIII <sup>474-494</sup> -27	VGDTLIIIFK	173
FVIII <sup>474-494</sup> -28	VGDTLIIIFKN	174
FVIII <sup>474-494</sup> -29	VGDTLIIIFKNQ	175
FVIII <sup>474-494</sup> -30	VGDTLIIIFKNQA	176
FVIII <sup>474-494</sup> -31	VGDTLIIIFKNQAS	177
FVIII <sup>474-494</sup> -32	VGDTLIIIFKNQASR	178
FVIII <sup>474-494</sup> -33	VGDTLIIIFKNQASRP	179
FVIII <sup>474-494</sup> -34	VGDTLIIIFKNQASRPY	180
FVIII <sup>474-494</sup> -35	VGDTLIIIFKNQASRPYN	181
FVIII <sup>474-494</sup> -36	VGDTLIIIFKNQASRPYNI	182
FVIII <sup>474-494</sup> -37	GDTLLIIIFK	183

FVIII <sup>474-494</sup> -38	GDTLLIIFKN	184
FVIII <sup>474-494</sup> -39	GDTLLIIFKNQ	185
FVIII <sup>474-494</sup> -40	GDTLLIIFKNQA	186
FVIII <sup>474-494</sup> -41	GDTLLIIFKNQAS	187
FVIII <sup>474-494</sup> -42	GDTLLIIFKNQASR	188
FVIII <sup>474-494</sup> -43	GDTLLIIFKNQASRP	189
FVIII <sup>474-494</sup> -44	GDTLLIIFKNQASRPY	190
FVIII <sup>474-494</sup> -45	GDTLLIIFKNQASRPYN	191
FVIII <sup>474-494</sup> -46	GDTLLIIFKNQASRPYNI	192
FVIII <sup>474-494</sup> -47	DTLLIIFKN	193

## [0132]

FVIII <sup>474-494</sup> -48	DTLLIIFKNQ	194
FVIII <sup>474-494</sup> -49	DTLLIIFKNQA	195
FVIII <sup>474-494</sup> -50	DTLLIIFKNQAS	196
FVIII <sup>474-494</sup> -51	DTLLIIFKNQASR	197
FVIII <sup>474-494</sup> -52	DTLLIIFKNQASRP	198
FVIII <sup>474-494</sup> -53	DTLLIIFKNQASRPY	199
FVIII <sup>474-494</sup> -54	DTLLIIFKNQASRPYN	200
FVIII <sup>474-494</sup> -55	DTLLIIFKNQASRPYNI	201
FVIII <sup>474-494</sup> -56	TLLIIFKNQ	202
FVIII <sup>474-494</sup> -57	TLLIIFKNQA	203
FVIII <sup>474-494</sup> -58	TLLIIFKNQAS	204
FVIII <sup>474-494</sup> -59	TLLIIFKNQASR	205
FVIII <sup>474-494</sup> -60	TLLIIFKNQASRP	206

FVIII <sup>474-494</sup> -61	TLLIIFKNQASRPY	207
FVIII <sup>474-494</sup> -62	TLLIIFKNQASRPYN	208
FVIII <sup>474-494</sup> -63	TLLIIFKNQASRPYNI	209
FVIII <sup>474-494</sup> -64	LLIIFKNQA	210
FVIII <sup>474-494</sup> -65	LLIIFKNQAS	211
FVIII <sup>474-494</sup> -66	LLIIFKNQASR	212
FVIII <sup>474-494</sup> -67	LLIIFKNQASRP	213
FVIII <sup>474-494</sup> -68	LLIIFKNQASRPY	214
FVIII <sup>474-494</sup> -69	LLIIFKNQASRPYN	215
FVIII <sup>474-494</sup> -70	LLIIFKNQASRPYNI	216
FVIII <sup>474-494</sup> -71	LIIIFKNQAS	217
FVIII <sup>474-494</sup> -72	LIIIFKNQASR	218
FVIII <sup>474-494</sup> -73	LIIIFKNQASRP	219
FVIII <sup>474-494</sup> -74	LIIIFKNQASRPY	220
FVIII <sup>474-494</sup> -75	LIIIFKNQASRPYN	221
FVIII <sup>474-494</sup> -76	LIIIFKNQASRPYNI	222
FVIII <sup>474-494</sup> -77	IIFKNQASR	223
FVIII <sup>474-494</sup> -78	IIFKNQASRP	224
FVIII <sup>474-494</sup> -79	IIFKNQASRPY	225
FVIII <sup>474-494</sup> -80	IIFKNQASRPYN	226
FVIII <sup>474-494</sup> -81	IIFKNQASRPYNI	227
FVIII <sup>474-494</sup> -82	IFKNQASRP	228
FVIII <sup>474-494</sup> -83	IFKNQASRPY	229
FVIII <sup>474-494</sup> -84	IFKNQASRPYN	230

FVIII <sup>474-494</sup> -85	IFKNQASRPYNI	231
FVIII <sup>474-494</sup> -86	FKNQASRPY	232
FVIII <sup>474-494</sup> -87	FKNQASRPYN	233
FVIII <sup>474-494</sup> -88	FKNQASRPYNI	234
FVIII <sup>474-494</sup> -89	KNQASRPYN	235
FVIII <sup>474-494</sup> -90	KNQASRPYNI	236
FVIII <sup>474-494</sup> -91	NQASRPYNI	237

[0133] D. 因子 VIII<sup>540-560</sup>肽

[0134] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽,其中P为与具有序列:PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250) 的因子 VIII<sup>540-560</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0135] 在一个实施方案中, P 为与具有序列:PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250) 的因子 VIII<sup>540-560</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列:PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250) 的因子 VIII<sup>540-560</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:238 至 SEQ ID NO:328 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:238 至 SEQ ID NO:328 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:238 至 SEQ ID NO:328 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:238 至 SEQ ID NO:328 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0136] 在一个实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79

或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0137] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0138] 表 5. 示例性 FVIII<sup>540-560</sup> 肽

[0139]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>540-560</sup> -1	PTKSDPRCL	238
FVIII <sup>540-560</sup> -2	PTKSDPRCLT	239
FVIII <sup>540-560</sup> -3	PTKSDPRCLTR	240
FVIII <sup>540-560</sup> -4	PTKSDPRCLTRY	241
FVIII <sup>540-560</sup> -5	PTKSDPRCLTRY Y	242
FVIII <sup>540-560</sup> -6	PTKSDPRCLTRYYS	243
FVIII <sup>540-560</sup> -7	PTKSDPRCLTRY YSS	244
FVIII <sup>540-560</sup> -8	PTKSDPRCLTRY YSSF	245
FVIII <sup>540-560</sup> -9	PTKSDPRCLTRY YSSFV	246

[0140]

FVIII <sup>540-560</sup> -10	PTKSDPRCLTRY YSSFVN	247
FVIII <sup>540-560</sup> -11	PTKSDPRCLTRY YSSFVNM	248
FVIII <sup>540-560</sup> -12	PTKSDPRCLTRY YSSFVNME	249
FVIII <sup>540-560</sup> -13	PTKSDPRCLTRY YSSFVNMER	250
FVIII <sup>540-560</sup> -14	TKSDPRCLT	251
FVIII <sup>540-560</sup> -15	TKSDPRCLTR	252

FVIII <sup>540-560</sup> -16	TKSDPRCLTRY	253
FVIII <sup>540-560</sup> -17	TKSDPRCLTRY	254
FVIII <sup>540-560</sup> -18	TKSDPRCLTRYYS	255
FVIII <sup>540-560</sup> -19	TKSDPRCLTRYSS	256
FVIII <sup>540-560</sup> -20	TKSDPRCLTRYSSF	257
FVIII <sup>540-560</sup> -21	TKSDPRCLTRYSSFV	258
FVIII <sup>540-560</sup> -22	TKSDPRCLTRYSSFVN	259
FVIII <sup>540-560</sup> -23	TKSDPRCLTRYSSFVNM	260
FVIII <sup>540-560</sup> -24	TKSDPRCLTRYSSFVNME	261
FVIII <sup>540-560</sup> -25	TKSDPRCLTRYSSFVNMER	262
FVIII <sup>540-560</sup> -26	KSDPRCLTR	263
FVIII <sup>540-560</sup> -27	KSDPRCLTRY	264
FVIII <sup>540-560</sup> -28	KSDPRCLTRY	265
FVIII <sup>540-560</sup> -29	KSDPRCLTRYYS	266
FVIII <sup>540-560</sup> -30	KSDPRCLTRYSS	267
FVIII <sup>540-560</sup> -31	KSDPRCLTRYSSF	268
FVIII <sup>540-560</sup> -32	KSDPRCLTRYSSFV	269
FVIII <sup>540-560</sup> -33	KSDPRCLTRYSSFVN	270
FVIII <sup>540-560</sup> -34	KSDPRCLTRYSSFVNM	271
FVIII <sup>540-560</sup> -35	KSDPRCLTRYSSFVNME	272
FVIII <sup>540-560</sup> -36	KSDPRCLTRYSSFVNMER	273
FVIII <sup>540-560</sup> -37	SDPRCLTRY	274
FVIII <sup>540-560</sup> -38	SDPRCLTRY	275
FVIII <sup>540-560</sup> -39	SDPRCLTRYYS	276

FVIII <sup>540-560</sup> -40	SDPRCLTRYSS	277
FVIII <sup>540-560</sup> -41	SDPRCLTRYSSF	278
FVIII <sup>540-560</sup> -42	SDPRCLTRYSSFV	279
FVIII <sup>540-560</sup> -43	SDPRCLTRYSSFVN	280
FVIII <sup>540-560</sup> -44	SDPRCLTRYSSFVNM	281
FVIII <sup>540-560</sup> -45	SDPRCLTRYSSFVNME	282
FVIII <sup>540-560</sup> -46	SDPRCLTRYSSFVNMER	283
FVIII <sup>540-560</sup> -47	DPRCLTRY	284
FVIII <sup>540-560</sup> -48	DPRCLTRYYS	285
FVIII <sup>540-560</sup> -49	DPRCLTRYSS	286
FVIII <sup>540-560</sup> -50	DPRCLTRYSSF	287
FVIII <sup>540-560</sup> -51	DPRCLTRYSSFV	288
FVIII <sup>540-560</sup> -52	DPRCLTRYSSFVN	289
FVIII <sup>540-560</sup> -53	DPRCLTRYSSFVNM	290
FVIII <sup>540-560</sup> -54	DPRCLTRYSSFVNME	291
FVIII <sup>540-560</sup> -55	DPRCLTRYSSFVNMER	292
FVIII <sup>540-560</sup> -56	PRCLTRYYS	293
FVIII <sup>540-560</sup> -57	PRCLTRYSS	294

[0141]

FVIII <sup>540-560</sup> -58	PRCLTRYSSF	295
FVIII <sup>540-560</sup> -59	PRCLTRYSSFV	296
FVIII <sup>540-560</sup> -60	PRCLTRYSSFVN	297
FVIII <sup>540-560</sup> -61	PRCLTRYSSFVNM	298
FVIII <sup>540-560</sup> -62	PRCLTRYSSFVNME	299

FVIII <sup>540-560</sup> -63	PRCLTRYSSFVNMER	300
FVIII <sup>540-560</sup> -64	RCLTRYSS	301
FVIII <sup>540-560</sup> -65	RCLTRYSSF	302
FVIII <sup>540-560</sup> -66	RCLTRYSSFV	303
FVIII <sup>540-560</sup> -67	RCLTRYSSFVN	304
FVIII <sup>540-560</sup> -68	RCLTRYSSFVNM	305
FVIII <sup>540-560</sup> -69	RCLTRYSSFVNME	306
FVIII <sup>540-560</sup> -70	RCLTRYSSFVNMER	307
FVIII <sup>540-560</sup> -71	CLTRYSSF	308
FVIII <sup>540-560</sup> -72	CLTRYSSFV	309
FVIII <sup>540-560</sup> -73	CLTRYSSFVN	310
FVIII <sup>540-560</sup> -74	CLTRYSSFVNM	311
FVIII <sup>540-560</sup> -75	CLTRYSSFVNME	312
FVIII <sup>540-560</sup> -76	CLTRYSSFVNMER	313
FVIII <sup>540-560</sup> -77	LTRYSSFV	314
FVIII <sup>540-560</sup> -78	LTRYSSFVN	315
FVIII <sup>540-560</sup> -79	LTRYSSFVNM	316
FVIII <sup>540-560</sup> -80	LTRYSSFVNME	317
FVIII <sup>540-560</sup> -81	LTRYSSFVNMER	318
FVIII <sup>540-560</sup> -82	TRYSSFVN	319
FVIII <sup>540-560</sup> -83	TRYSSFVNM	320
FVIII <sup>540-560</sup> -84	TRYSSFVNME	321
FVIII <sup>540-560</sup> -85	TRYSSFVNMER	322
FVIII <sup>540-560</sup> -86	RYSSFVNM	323

FVIII <sup>540-560</sup> -87	RYYSSFVNME	324
FVIII <sup>540-560</sup> -88	RYYSSFVNMER	325
FVIII <sup>540-560</sup> -89	YYSSFVNME	326
FVIII <sup>540-560</sup> -90	YYSSFVNMER	327
FVIII <sup>540-560</sup> -91	YSSFVNMER	328

[0142] E. 因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽

[0143] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽,其中 P 为与具有序列 :QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0144] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:329 至 SEQ ID NO:464 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:329 至 SEQ ID NO:464 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:329 至 SEQ ID NO:464 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:329 至 SEQ ID NO:464 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0145] 在一个实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0146] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在

另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0147] 表 6. 示例性 FVIII<sup>1401-1424</sup>肽

[0148]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>1401-1424</sup> -1	QANRSPLPI	329
FVIII <sup>1401-1424</sup> -2	QANRSPLPIA	330
FVIII <sup>1401-1424</sup> -3	QANRSPLPIAK	331
FVIII <sup>1401-1424</sup> -4	QANRSPLPIAKV	332
FVIII <sup>1401-1424</sup> -5	QANRSPLPIAKVS	333
FVIII <sup>1401-1424</sup> -6	QANRSPLPIAKVSS	334
FVIII <sup>1401-1424</sup> -7	QANRSPLPIAKVSSF	335
FVIII <sup>1401-1424</sup> -8	QANRSPLPIAKVSSFP	336
FVIII <sup>1401-1424</sup> -9	QANRSPLPIAKVSSFPS	337
FVIII <sup>1401-1424</sup> -10	QANRSPLPIAKVSSFPSI	338
FVIII <sup>1401-1424</sup> -11	QANRSPLPIAKVSSFPSIR	339
FVIII <sup>1401-1424</sup> -12	QANRSPLPIAKVSSFPSIRP	340
FVIII <sup>1401-1424</sup> -13	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	341
FVIII <sup>1401-1424</sup> -14	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	342
FVIII <sup>1401-1424</sup> -15	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	343
FVIII <sup>1401-1424</sup> -16	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	344
FVIII <sup>1401-1424</sup> -17	ANRSPLPIA	345

[0149]

FVIII <sup>1401-1424</sup> -18	ANRSPLPIAK	346
FVIII <sup>1401-1424</sup> -19	ANRSPLPIAKV	347
FVIII <sup>1401-1424</sup> -20	ANRSPLPIAKVS	348
FVIII <sup>1401-1424</sup> -21	ANRSPLPIAKVSS	349
FVIII <sup>1401-1424</sup> -22	ANRSPLPIAKVSSF	350
FVIII <sup>1401-1424</sup> -23	ANRSPLPIAKVSSFP	351
FVIII <sup>1401-1424</sup> -24	ANRSPLPIAKVSSFPS	352
FVIII <sup>1401-1424</sup> -25	ANRSPLPIAKVSSFPSI	353
FVIII <sup>1401-1424</sup> -26	ANRSPLPIAKVSSFPSIR	354
FVIII <sup>1401-1424</sup> -27	ANRSPLPIAKVSSFPSIRP	355
FVIII <sup>1401-1424</sup> -28	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPI	356
FVIII <sup>1401-1424</sup> -29	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	357
FVIII <sup>1401-1424</sup> -30	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	358
FVIII <sup>1401-1424</sup> -31	ANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	359
FVIII <sup>1401-1424</sup> -32	NRSPLPIAK	360
FVIII <sup>1401-1424</sup> -33	NRSPLPIAKV	361
FVIII <sup>1401-1424</sup> -34	NRSPLPIAKVS	362
FVIII <sup>1401-1424</sup> -35	NRSPLPIAKVSS	363
FVIII <sup>1401-1424</sup> -36	NRSPLPIAKVSSF	364
FVIII <sup>1401-1424</sup> -37	NRSPLPIAKVSSFP	365
FVIII <sup>1401-1424</sup> -38	NRSPLPIAKVSSFPS	366
FVIII <sup>1401-1424</sup> -39	NRSPLPIAKVSSFPSI	367
FVIII <sup>1401-1424</sup> -40	NRSPLPIAKVSSFPSIR	368
FVIII <sup>1401-1424</sup> -41	NRSPLPIAKVSSFPSIRP	369

FVIII <sup>1401-1424</sup> -42	NRSPLPIAKVSSFPSIRPI	370
FVIII <sup>1401-1424</sup> -43	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIY	371
FVIII <sup>1401-1424</sup> -44	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	372
FVIII <sup>1401-1424</sup> -45	NRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	373
FVIII <sup>1401-1424</sup> -46	RSPLPIAKV	374
FVIII <sup>1401-1424</sup> -47	RSPLPIAKVS	375
FVIII <sup>1401-1424</sup> -48	RSPLPIAKVSS	376
FVIII <sup>1401-1424</sup> -49	RSPLPIAKVSSF	377
FVIII <sup>1401-1424</sup> -50	RSPLPIAKVSSFP	378
FVIII <sup>1401-1424</sup> -51	RSPLPIAKVSSFPS	379
FVIII <sup>1401-1424</sup> -52	RSPLPIAKVSSFPSI	380
FVIII <sup>1401-1424</sup> -53	RSPLPIAKVSSFPSIR	381
FVIII <sup>1401-1424</sup> -54	RSPLPIAKVSSFPSIRP	382
FVIII <sup>1401-1424</sup> -55	RSPLPIAKVSSFPSIRPI	383
FVIII <sup>1401-1424</sup> -56	RSPLPIAKVSSFPSIRPIY	384
FVIII <sup>1401-1424</sup> -57	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYL	385
FVIII <sup>1401-1424</sup> -58	RSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	386
FVIII <sup>1401-1424</sup> -59	SPLPIAKVS	387
FVIII <sup>1401-1424</sup> -60	SPLPIAKVSS	388
FVIII <sup>1401-1424</sup> -61	SPLPIAKVSSF	389
FVIII <sup>1401-1424</sup> -62	SPLPIAKVSSFP	390
FVIII <sup>1401-1424</sup> -63	SPLPIAKVSSFPS	391
FVIII <sup>1401-1424</sup> -64	SPLPIAKVSSFPSI	392
FVIII <sup>1401-1424</sup> -65	SPLPIAKVSSFPSIR	393

[0150]

FVIII <sup>1401-1424</sup> -66	SPLPIAKVSSFPSIRP	394
FVIII <sup>1401-1424</sup> -67	SPLPIAKVSSFPSIRPI	395
FVIII <sup>1401-1424</sup> -68	SPLPIAKVSSFPSIRPIY	396
FVIII <sup>1401-1424</sup> -69	SPLPIAKVSSFPSIRPIYL	397
FVIII <sup>1401-1424</sup> -70	SPLPIAKVSSFPSIRPIYLT	398
FVIII <sup>1401-1424</sup> -71	PLPIAKVSS	399
FVIII <sup>1401-1424</sup> -72	PLPIAKVSSF	400
FVIII <sup>1401-1424</sup> -73	PLPIAKVSSFP	401
FVIII <sup>1401-1424</sup> -74	PLPIAKVSSFPS	402
FVIII <sup>1401-1424</sup> -75	PLPIAKVSSFPSI	403
FVIII <sup>1401-1424</sup> -76	PLPIAKVSSFPSIR	404
FVIII <sup>1401-1424</sup> -77	PLPIAKVSSFPSIRP	405
FVIII <sup>1401-1424</sup> -78	PLPIAKVSSFPSIRPI	406
FVIII <sup>1401-1424</sup> -79	PLPIAKVSSFPSIRPIY	407
FVIII <sup>1401-1424</sup> -80	PLPIAKVSSFPSIRPIYL	408
FVIII <sup>1401-1424</sup> -81	PLPIAKVSSFPSIRPIYLT	409
FVIII <sup>1401-1424</sup> -82	LPIAKVSSF	410
FVIII <sup>1401-1424</sup> -83	LPIAKVSSFP	411
FVIII <sup>1401-1424</sup> -84	LPIAKVSSFPS	412
FVIII <sup>1401-1424</sup> -85	LPIAKVSSFPSI	413
FVIII <sup>1401-1424</sup> -86	LPIAKVSSFPSIR	414
FVIII <sup>1401-1424</sup> -87	LPIAKVSSFPSIRP	415
FVIII <sup>1401-1424</sup> -88	LPIAKVSSFPSIRPI	416

FVIII <sup>1401-1424</sup> -89	LPIAKVSSFPSIRPIY	417
FVIII <sup>1401-1424</sup> -90	LPIAKVSSFPSIRPIYL	418
FVIII <sup>1401-1424</sup> -91	LPIAKVSSFPSIRPIYLT	419
FVIII <sup>1401-1424</sup> -92	PIAKVSSFP	420
FVIII <sup>1401-1424</sup> -93	PIAKVSSFPS	421
FVIII <sup>1401-1424</sup> -94	PIAKVSSFPSI	422
FVIII <sup>1401-1424</sup> -95	PIAKVSSFPSIR	423
FVIII <sup>1401-1424</sup> -96	PIAKVSSFPSIRP	424
FVIII <sup>1401-1424</sup> -97	PIAKVSSFPSIRPI	425
FVIII <sup>1401-1424</sup> -98	PIAKVSSFPSIRPIY	426
FVIII <sup>1401-1424</sup> -99	PIAKVSSFPSIRPIYL	427
FVIII <sup>1401-1424</sup> -100	PIAKVSSFPSIRPIYLT	428
FVIII <sup>1401-1424</sup> -101	IAKVSSFPS	429
FVIII <sup>1401-1424</sup> -102	IAKVSSFPSI	430
FVIII <sup>1401-1424</sup> -103	IAKVSSFPSIR	431
FVIII <sup>1401-1424</sup> -104	IAKVSSFPSIRP	432
FVIII <sup>1401-1424</sup> -105	IAKVSSFPSIRPI	433
FVIII <sup>1401-1424</sup> -106	IAKVSSFPSIRPIY	434
FVIII <sup>1401-1424</sup> -107	IAKVSSFPSIRPIYL	435
FVIII <sup>1401-1424</sup> -108	IAKVSSFPSIRPIYLT	436
FVIII <sup>1401-1424</sup> -109	AKVSSFPSI	437
FVIII <sup>1401-1424</sup> -110	AKVSSFPSIR	438
FVIII <sup>1401-1424</sup> -111	AKVSSFPSIRP	439
FVIII <sup>1401-1424</sup> -112	AKVSSFPSIRPI	440

FVIII <sup>1401-1424</sup> -113	AKVSSFPSIRPIY	441
---------------------------------	---------------	-----

## [0151]

FVIII <sup>1401-1424</sup> -114	AKVSSFPSIRPIYL	442
FVIII <sup>1401-1424</sup> -115	AKVSSFPSIRPIYLT	443
FVIII <sup>1401-1424</sup> -116	KVSSFPSIR	444
FVIII <sup>1401-1424</sup> -117	KVSSFPSIRP	445
FVIII <sup>1401-1424</sup> -118	KVSSFPSIRPI	446
FVIII <sup>1401-1424</sup> -119	KVSSFPSIRPIY	447
FVIII <sup>1401-1424</sup> -120	KVSSFPSIRPIYL	448
FVIII <sup>1401-1424</sup> -121	KVSSFPSIRPIYLT	449
FVIII <sup>1401-1424</sup> -122	VSSFPSIRP	450
FVIII <sup>1401-1424</sup> -123	VSSFPSIRPI	451
FVIII <sup>1401-1424</sup> -124	VSSFPSIRPIY	452
FVIII <sup>1401-1424</sup> -125	VSSFPSIRPIYL	453
FVIII <sup>1401-1424</sup> -126	VSSFPSIRPIYLT	454
FVIII <sup>1401-1424</sup> -127	SSFPSIRPI	455
FVIII <sup>1401-1424</sup> -128	SSFPSIRPIY	456
FVIII <sup>1401-1424</sup> -129	SSFPSIRPIYL	457
FVIII <sup>1401-1424</sup> -130	SSFPSIRPIYLT	458
FVIII <sup>1401-1424</sup> -131	SFPSIRPIY	459
FVIII <sup>1401-1424</sup> -132	SFPSIRPIYL	460
FVIII <sup>1401-1424</sup> -133	SFPSIRPIYLT	461
FVIII <sup>1401-1424</sup> -134	FPSIRPIYL	462
FVIII <sup>1401-1424</sup> -135	FPSIRPIYLT	463

FVIII <sup>1401-1424</sup> -136	PSIRPIYLT	464
---------------------------------	-----------	-----

**[0152]** F. 因子 VIII<sup>1785-1805</sup>肽

**[0153]** 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽,其中P为与具有序列 :EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477) 的因子 VIII<sup>1785-1805</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中,P 为与具有序列 :EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477) 的因子 VIII<sup>1785-1805</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

**[0154]** 在一个实施方案中,P 为与具有序列 :EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477) 的因子 VIII<sup>1785-1805</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,P 为与选自 SEQ ID NO:465 至 SEQ ID NO:555 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,P 为与选自 SEQ ID NO:465 至 SEQ ID NO:555 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,P 为与选自 SEQ ID NO:465 至 SEQ ID NO:555 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中,P 为选自 SEQ ID NO:465 至 SEQ ID NO:555 的氨基酸序列。在一些实施方案中,x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中,x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中,x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中,x 与 y 可均为 1。

**[0155]** 在一个实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

**[0156]** 在一个实施方案中,FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中,FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0157] 表 7. 示例性 FVIII<sup>1785-1805</sup>肽

[0158]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>1785-1805</sup> -1	EVEDNIMVT	465
FVIII <sup>1785-1805</sup> -2	EVEDNIMVTF	466
FVIII <sup>1785-1805</sup> -3	EVEDNIMVTFR	467
FVIII <sup>1785-1805</sup> -4	EVEDNIMVTFRN	468
FVIII <sup>1785-1805</sup> -5	EVEDNIMVTFRNQ	469
FVIII <sup>1785-1805</sup> -6	EVEDNIMVTFRNQA	470
FVIII <sup>1785-1805</sup> -7	EVEDNIMVTFRNQAS	471
FVIII <sup>1785-1805</sup> -8	EVEDNIMVTFRNQASR	472
FVIII <sup>1785-1805</sup> -9	EVEDNIMVTFRNQASRP	473
FVIII <sup>1785-1805</sup> -10	EVEDNIMVTFRNQASRPY	474
FVIII <sup>1785-1805</sup> -11	EVEDNIMVTFRNQASRPYS	475
FVIII <sup>1785-1805</sup> -12	EVEDNIMVTFRNQASRPYSF	476
FVIII <sup>1785-1805</sup> -13	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY	477
FVIII <sup>1785-1805</sup> -14	VEDNIMVTF	478
FVIII <sup>1785-1805</sup> -15	VEDNIMVTFR	479
FVIII <sup>1785-1805</sup> -16	VEDNIMVTFRN	480
FVIII <sup>1785-1805</sup> -17	VEDNIMVTFRNQ	481
FVIII <sup>1785-1805</sup> -18	VEDNIMVTFRNQA	482
FVIII <sup>1785-1805</sup> -19	VEDNIMVTFRNQAS	483
FVIII <sup>1785-1805</sup> -20	VEDNIMVTFRNQASR	484
FVIII <sup>1785-1805</sup> -21	VEDNIMVTFRNQASRP	485
FVIII <sup>1785-1805</sup> -22	VEDNIMVTFRNQASRPY	486

FVIII <sup>1785-1805</sup> -23	VEDNIMVTFRNQASRPYS	487
FVIII <sup>1785-1805</sup> -24	VEDNIMVTFRNQASRPYSF	488
FVIII <sup>1785-1805</sup> -25	VEDNIMVTFRNQASRPYSFY	489
FVIII <sup>1785-1805</sup> -26	EDNIMVTFR	490
FVIII <sup>1785-1805</sup> -27	EDNIMVTFRN	491
FVIII <sup>1785-1805</sup> -28	EDNIMVTFRNQ	492
FVIII <sup>1785-1805</sup> -29	EDNIMVTFRNQA	493
FVIII <sup>1785-1805</sup> -30	EDNIMVTFRNQAS	494
FVIII <sup>1785-1805</sup> -31	EDNIMVTFRNQASR	495

## [0159]

FVIII <sup>1785-1805</sup> -32	EDNIMVTFRNQASRP	496
FVIII <sup>1785-1805</sup> -33	EDNIMVTFRNQASRPY	497
FVIII <sup>1785-1805</sup> -34	EDNIMVTFRNQASRPYS	498
FVIII <sup>1785-1805</sup> -35	EDNIMVTFRNQASRPYSF	499
FVIII <sup>1785-1805</sup> -36	EDNIMVTFRNQASRPYSFY	500
FVIII <sup>1785-1805</sup> -37	DNIMVTFRN	501
FVIII <sup>1785-1805</sup> -38	DNIMVTFRNQ	502
FVIII <sup>1785-1805</sup> -39	DNIMVTFRNQA	503
FVIII <sup>1785-1805</sup> -40	DNIMVTFRNQAS	504
FVIII <sup>1785-1805</sup> -41	DNIMVTFRNQASR	505
FVIII <sup>1785-1805</sup> -42	DNIMVTFRNQASRP	506
FVIII <sup>1785-1805</sup> -43	DNIMVTFRNQASRPY	507
FVIII <sup>1785-1805</sup> -44	DNIMVTFRNQASRPYS	508
FVIII <sup>1785-1805</sup> -45	DNIMVTFRNQASRPYSF	509

FVIII <sup>1785-1805</sup> -46	DNIMVTFRNQASRPYSFY	510
FVIII <sup>1785-1805</sup> -47	NIMVTFRNQ	511
FVIII <sup>1785-1805</sup> -48	NIMVTFRNQA	512
FVIII <sup>1785-1805</sup> -49	NIMVTFRNQAS	513
FVIII <sup>1785-1805</sup> -50	NIMVTFRNQASR	514
FVIII <sup>1785-1805</sup> -51	NIMVTFRNQASRP	515
FVIII <sup>1785-1805</sup> -52	NIMVTFRNQASRPY	516
FVIII <sup>1785-1805</sup> -53	NIMVTFRNQASRPYS	517
FVIII <sup>1785-1805</sup> -54	NIMVTFRNQASRPYSF	518
FVIII <sup>1785-1805</sup> -55	NIMVTFRNQASRPYSFY	519
FVIII <sup>1785-1805</sup> -56	IMVTFRNQA	520
FVIII <sup>1785-1805</sup> -57	IMVTFRNQAS	521
FVIII <sup>1785-1805</sup> -58	IMVTFRNQASR	522
FVIII <sup>1785-1805</sup> -59	IMVTFRNQASRP	523
FVIII <sup>1785-1805</sup> -60	IMVTFRNQASRPY	524
FVIII <sup>1785-1805</sup> -61	IMVTFRNQASRPYS	525
FVIII <sup>1785-1805</sup> -62	IMVTFRNQASRPYSF	526
FVIII <sup>1785-1805</sup> -63	IMVTFRNQASRPYSFY	527
FVIII <sup>1785-1805</sup> -64	MVTFRNQAS	528
FVIII <sup>1785-1805</sup> -65	MVTFRNQASR	529
FVIII <sup>1785-1805</sup> -66	MVTFRNQASRP	530
FVIII <sup>1785-1805</sup> -67	MVTFRNQASRPY	531
FVIII <sup>1785-1805</sup> -68	MVTFRNQASRPYS	532
FVIII <sup>1785-1805</sup> -69	MVTFRNQASRPYSF	533

FVIII <sup>1785-1805</sup> -70	MVTFRNQASRPYSFY	534
FVIII <sup>1785-1805</sup> -71	VTFRNQASR	535
FVIII <sup>1785-1805</sup> -72	VTFRNQASRP	536
FVIII <sup>1785-1805</sup> -73	VTFRNQASRPY	537
FVIII <sup>1785-1805</sup> -74	VTFRNQASRPYS	538
FVIII <sup>1785-1805</sup> -75	VTFRNQASRPYSF	539
FVIII <sup>1785-1805</sup> -76	VTFRNQASRPYSFY	540
FVIII <sup>1785-1805</sup> -77	TFRNQASRP	541
FVIII <sup>1785-1805</sup> -78	TFRNQASRPY	542
FVIII <sup>1785-1805</sup> -79	TFRNQASRPYS	543

## [0160]

FVIII <sup>1785-1805</sup> -80	TFRNQASRPYSF	544
FVIII <sup>1785-1805</sup> -81	TFRNQASRPYSFY	545
FVIII <sup>1785-1805</sup> -82	FRNQASRPY	546
FVIII <sup>1785-1805</sup> -83	FRNQASRPYS	547
FVIII <sup>1785-1805</sup> -84	FRNQASRPYSF	548
FVIII <sup>1785-1805</sup> -85	FRNQASRPYSFY	549
FVIII <sup>1785-1805</sup> -86	RNQASRPYS	550
FVIII <sup>1785-1805</sup> -87	RNQASRPYSF	551
FVIII <sup>1785-1805</sup> -88	RNQASRPYSFY	552
FVIII <sup>1785-1805</sup> -89	NQASRPYSF	553
FVIII <sup>1785-1805</sup> -90	NQASRPYSFY	554
FVIII <sup>1785-1805</sup> -91	QASRPYSFY	555

[0161] G. 因子 VIII<sup>2025-2045</sup>肽

[0162] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列 (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>的多肽,其中P为与具

有序列 :LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568) 的因子 VIII<sup>2025-2045</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列, R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0163] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568) 的因子 VIII<sup>2025-2045</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568) 的因子 VIII<sup>2025-2045</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:556 至 SEQ ID NO:646 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:556 至 SEQ ID NO:646 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:556 至 SEQ ID NO:646 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:556 至 SEQ ID NO:646 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0164] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0165] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0166] 表 8. 示例性 FVIII<sup>2025-2045</sup> 肽

[0167]

肽	序列	SEQ ID NO:

FVIII <sup>2025-2045</sup> -1	LHAGMSTLFL	556
FVIII <sup>2025-2045</sup> -2	LHAGMSTLFL	557
FVIII <sup>2025-2045</sup> -3	LHAGMSTLFLV	558
FVIII <sup>2025-2045</sup> -4	LHAGMSTLFLVY	559
FVIII <sup>2025-2045</sup> -5	LHAGMSTLFLVYS	560
FVIII <sup>2025-2045</sup> -6	LHAGMSTLFLVYSN	561
FVIII <sup>2025-2045</sup> -7	LHAGMSTLFLVYSNK	562
FVIII <sup>2025-2045</sup> -8	LHAGMSTLFLVYSNKC	563
FVIII <sup>2025-2045</sup> -9	LHAGMSTLFLVYSNKCQ	564
FVIII <sup>2025-2045</sup> -10	LHAGMSTLFLVYSNKCQT	565
FVIII <sup>2025-2045</sup> -11	LHAGMSTLFLVYSNKCQTP	566
FVIII <sup>2025-2045</sup> -12	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPL	567
FVIII <sup>2025-2045</sup> -13	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	568
FVIII <sup>2025-2045</sup> -14	HAGMSTLFL	569
FVIII <sup>2025-2045</sup> -15	HAGMSTLFLV	570
FVIII <sup>2025-2045</sup> -16	HAGMSTLFLVY	571
FVIII <sup>2025-2045</sup> -17	HAGMSTLFLVYS	572
FVIII <sup>2025-2045</sup> -18	HAGMSTLFLVYSN	573
FVIII <sup>2025-2045</sup> -19	HAGMSTLFLVYSNK	574
FVIII <sup>2025-2045</sup> -20	HAGMSTLFLVYSNKC	575
FVIII <sup>2025-2045</sup> -21	HAGMSTLFLVYSNKCQ	576
FVIII <sup>2025-2045</sup> -22	HAGMSTLFLVYSNKCQT	577
FVIII <sup>2025-2045</sup> -23	HAGMSTLFLVYSNKCQTP	578
FVIII <sup>2025-2045</sup> -24	HAGMSTLFLVYSNKCQTPL	579

FVIII <sup>2025-2045</sup> -25	HAGMSTLFLVYSNKCQTPLG	580
FVIII <sup>2025-2045</sup> -26	AGMSTLFLV	581
FVIII <sup>2025-2045</sup> -27	AGMSTLFLVY	582
FVIII <sup>2025-2045</sup> -28	AGMSTLFLVYS	583
FVIII <sup>2025-2045</sup> -29	AGMSTLFLVYSN	584
FVIII <sup>2025-2045</sup> -30	AGMSTLFLVYSNK	585
FVIII <sup>2025-2045</sup> -31	AGMSTLFLVYSNKC	586
FVIII <sup>2025-2045</sup> -32	AGMSTLFLVYSNKCQ	587
FVIII <sup>2025-2045</sup> -33	AGMSTLFLVYSNKCQT	588
FVIII <sup>2025-2045</sup> -34	AGMSTLFLVYSNKCQTP	589
FVIII <sup>2025-2045</sup> -35	AGMSTLFLVYSNKCQTPL	590
FVIII <sup>2025-2045</sup> -36	AGMSTLFLVYSNKCQTPLG	591
FVIII <sup>2025-2045</sup> -37	GMSTLFLVY	592
FVIII <sup>2025-2045</sup> -38	GMSTLFLVYS	593
FVIII <sup>2025-2045</sup> -39	GMSTLFLVYSN	594
FVIII <sup>2025-2045</sup> -40	GMSTLFLVYSNK	595
FVIII <sup>2025-2045</sup> -41	GMSTLFLVYSNKC	596
FVIII <sup>2025-2045</sup> -42	GMSTLFLVYSNKCQ	597

## [0168]

FVIII <sup>2025-2045</sup> -43	GMSTLFLVYSNKCQT	598
FVIII <sup>2025-2045</sup> -44	GMSTLFLVYSNKCQTP	599
FVIII <sup>2025-2045</sup> -45	GMSTLFLVYSNKCQTPL	600
FVIII <sup>2025-2045</sup> -46	GMSTLFLVYSNKCQTPLG	601
FVIII <sup>2025-2045</sup> -47	MSTLFLVYS	602

FVIII <sup>2025-2045</sup> -48	MSTLFLVYSN	603
FVIII <sup>2025-2045</sup> -49	MSTLFLVYSNK	604
FVIII <sup>2025-2045</sup> -50	MSTLFLVYSNKC	605
FVIII <sup>2025-2045</sup> -51	MSTLFLVYSNKCQ	606
FVIII <sup>2025-2045</sup> -52	MSTLFLVYSNKCQT	607
FVIII <sup>2025-2045</sup> -53	MSTLFLVYSNKCQTP	608
FVIII <sup>2025-2045</sup> -54	MSTLFLVYSNKCQTPL	609
FVIII <sup>2025-2045</sup> -55	MSTLFLVYSNKCQTPLG	610
FVIII <sup>2025-2045</sup> -56	STLFLVYSN	611
FVIII <sup>2025-2045</sup> -57	STLFLVYSNK	612
FVIII <sup>2025-2045</sup> -58	STLFLVYSNKC	613
FVIII <sup>2025-2045</sup> -59	STLFLVYSNKCQ	614
FVIII <sup>2025-2045</sup> -60	STLFLVYSNKCQT	615
FVIII <sup>2025-2045</sup> -61	STLFLVYSNKCQTP	616
FVIII <sup>2025-2045</sup> -62	STLFLVYSNKCQTPL	617
FVIII <sup>2025-2045</sup> -63	STLFLVYSNKCQTPLG	618
FVIII <sup>2025-2045</sup> -64	TLFLVYSNK	619
FVIII <sup>2025-2045</sup> -65	TLFLVYSNKC	620
FVIII <sup>2025-2045</sup> -66	TLFLVYSNKCQ	621
FVIII <sup>2025-2045</sup> -67	TLFLVYSNKCQT	622
FVIII <sup>2025-2045</sup> -68	TLFLVYSNKCQTP	623
FVIII <sup>2025-2045</sup> -69	TLFLVYSNKCQTPL	624
FVIII <sup>2025-2045</sup> -70	TLFLVYSNKCQTPLG	625
FVIII <sup>2025-2045</sup> -71	LFLVYSNKC	626

FVIII <sup>2025-2045</sup> -72	LFLVYSNKCQ	627
FVIII <sup>2025-2045</sup> -73	LFLVYSNKCQT	628
FVIII <sup>2025-2045</sup> -74	LFLVYSNKCQTP	629
FVIII <sup>2025-2045</sup> -75	LFLVYSNKCQTPL	630
FVIII <sup>2025-2045</sup> -76	LFLVYSNKCQTPLG	631
FVIII <sup>2025-2045</sup> -77	FLVYSNKCQ	632
FVIII <sup>2025-2045</sup> -78	FLVYSNKCQT	633
FVIII <sup>2025-2045</sup> -79	FLVYSNKCQTP	634
FVIII <sup>2025-2045</sup> -80	FLVYSNKCQTPL	635
FVIII <sup>2025-2045</sup> -81	FLVYSNKCQTPLG	636
FVIII <sup>2025-2045</sup> -82	LVYSNKCQT	637
FVIII <sup>2025-2045</sup> -83	LVYSNKCQTP	638
FVIII <sup>2025-2045</sup> -84	LVYSNKCQTPL	639
FVIII <sup>2025-2045</sup> -85	LVYSNKCQTPLG	640
FVIII <sup>2025-2045</sup> -86	VYSNKCQTP	641
FVIII <sup>2025-2045</sup> -87	VYSNKCQTPL	642
FVIII <sup>2025-2045</sup> -88	VYSNKCQTPLG	643
FVIII <sup>2025-2045</sup> -89	YSNKCQTPL	644
FVIII <sup>2025-2045</sup> -90	YSNKCQTPLG	645

## [0169]

FVIII <sup>2025-2045</sup> -91	SNKCQTPLG	646
--------------------------------	-----------	-----

[0170] H. 因子 VIII<sup>2160-2180</sup>肽

[0171] 在一个实施方案中,本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽,其中P为与具有序列 :NPPIIARYIRLHPHTYSISIRST (SEQ ID NO:659) 的因子 VIII<sup>2160-2180</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列,其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0172] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :NPPIIARYIRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO:659) 的因子 VIII<sup>2160-2180</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :NPPIIARYIRLHPHTHSIRST (SEQ ID NO:659) 的因子 VIII<sup>2160-2180</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:647 至 SEQ ID NO:737 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:647 至 SEQ ID NO:737 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:647 至 SEQ ID NO:737 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在其它实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0173] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0174] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0175] 表 9. 示例性 FVIII<sup>2160-2180</sup> 肽

[0176]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>2160-2180</sup> -1	NPPIIARYI	647
FVIII <sup>2160-2180</sup> -2	NPPIIARYIR	648

FVIII <sup>2160-2180</sup> -3	NPPIIARYIRL	649
FVIII <sup>2160-2180</sup> -4	NPPIIARYIRLH	650

[0177]

FVIII <sup>2160-2180</sup> -5	NPPIIARYIRLHP	651
FVIII <sup>2160-2180</sup> -6	NPPIIARYIRLHPT	652
FVIII <sup>2160-2180</sup> -7	NPPIIARYIRLHPH	653
FVIII <sup>2160-2180</sup> -8	NPPIIARYIRLHPHXY	654
FVIII <sup>2160-2180</sup> -9	NPPIIARYIRLHPHXYH	655
FVIII <sup>2160-2180</sup> -10	NPPIIARYIRLHPHXYH	656
FVIII <sup>2160-2180</sup> -11	NPPIIARYIRLHPHXYH	657
FVIII <sup>2160-2180</sup> -12	NPPIIARYIRLHPHXYH	658
FVIII <sup>2160-2180</sup> -13	NPPIIARYIRLHPHXYH	659
FVIII <sup>2160-2180</sup> -14	PPIIARYIR	660
FVIII <sup>2160-2180</sup> -15	PPIIARYIRL	661
FVIII <sup>2160-2180</sup> -16	PPIIARYIRLH	662
FVIII <sup>2160-2180</sup> -17	PPIIARYIRLHP	663
FVIII <sup>2160-2180</sup> -18	PPIIARYIRLHPT	664
FVIII <sup>2160-2180</sup> -19	PPIIARYIRLHPH	665
FVIII <sup>2160-2180</sup> -20	PPIIARYIRLHPHXY	666
FVIII <sup>2160-2180</sup> -21	PPIIARYIRLHPHXYH	667
FVIII <sup>2160-2180</sup> -22	PPIIARYIRLHPHXYH	668
FVIII <sup>2160-2180</sup> -23	PPIIARYIRLHPHXYH	669
FVIII <sup>2160-2180</sup> -24	PPIIARYIRLHPHXYH	670
FVIII <sup>2160-2180</sup> -25	PPIIARYIRLHPHXYH	671

FVIII <sup>2160-2180</sup> -26	PIIARYIRL	672
FVIII <sup>2160-2180</sup> -27	PIIARYIRLH	673
FVIII <sup>2160-2180</sup> -28	PIIARYIRLHP	674
FVIII <sup>2160-2180</sup> -29	PIIARYIRLHPT	675
FVIII <sup>2160-2180</sup> -30	PIIARYIRLHPTH	676
FVIII <sup>2160-2180</sup> -31	PIIARYIRLHPTHY	677
FVIII <sup>2160-2180</sup> -32	PIIARYIRLHPTHYS	678
FVIII <sup>2160-2180</sup> -33	PIIARYIRLHPTHYSI	679
FVIII <sup>2160-2180</sup> -34	PIIARYIRLHPTHYSIR	680
FVIII <sup>2160-2180</sup> -35	PIIARYIRLHPTHYSIRS	681
FVIII <sup>2160-2180</sup> -36	PIIARYIRLHPTHYSIRST	682
FVIII <sup>2160-2180</sup> -37	IIARYIRLH	683
FVIII <sup>2160-2180</sup> -38	IIARYIRLHP	684
FVIII <sup>2160-2180</sup> -39	IIARYIRLHPT	685
FVIII <sup>2160-2180</sup> -40	IIARYIRLHPTH	686
FVIII <sup>2160-2180</sup> -41	IIARYIRLHPTHY	687
FVIII <sup>2160-2180</sup> -42	IIARYIRLHPTHYS	688
FVIII <sup>2160-2180</sup> -43	IIARYIRLHPTHYSI	689
FVIII <sup>2160-2180</sup> -44	IIARYIRLHPTHYSIR	690
FVIII <sup>2160-2180</sup> -45	IIARYIRLHPTHYSIRS	691
FVIII <sup>2160-2180</sup> -46	IIARYIRLHPTHYSIRST	692
FVIII <sup>2160-2180</sup> -47	IARYIRLHP	693
FVIII <sup>2160-2180</sup> -48	IARYIRLHPT	694
FVIII <sup>2160-2180</sup> -49	IARYIRLHPTH	695

FVIII <sup>2160-2180</sup> -50	IARYIRLHPTHY	696
FVIII <sup>2160-2180</sup> -51	IARYIRLHPTHYS	697
FVIII <sup>2160-2180</sup> -52	IARYIRLHPTHYSI	698

[0178]

FVIII <sup>2160-2180</sup> -53	IARYIRLHPTHYSIR	699
FVIII <sup>2160-2180</sup> -54	IARYIRLHPTHYSIRS	700
FVIII <sup>2160-2180</sup> -55	IARYIRLHPTHYSIRST	701
FVIII <sup>2160-2180</sup> -56	ARYIRLHPT	702
FVIII <sup>2160-2180</sup> -57	ARYIRLHPTH	703
FVIII <sup>2160-2180</sup> -58	ARYIRLHPTHY	704
FVIII <sup>2160-2180</sup> -59	ARYIRLHPTHYS	705
FVIII <sup>2160-2180</sup> -60	ARYIRLHPTHYSI	706
FVIII <sup>2160-2180</sup> -61	ARYIRLHPTHYSIR	707
FVIII <sup>2160-2180</sup> -62	ARYIRLHPTHYSIRS	708
FVIII <sup>2160-2180</sup> -63	ARYIRLHPTHYSIRST	709
FVIII <sup>2160-2180</sup> -64	RYIRLHPTH	710
FVIII <sup>2160-2180</sup> -65	RYIRLHPTHY	711
FVIII <sup>2160-2180</sup> -66	RYIRLHPTHYS	712
FVIII <sup>2160-2180</sup> -67	RYIRLHPTHYSI	713
FVIII <sup>2160-2180</sup> -68	RYIRLHPTHYSIR	714
FVIII <sup>2160-2180</sup> -69	RYIRLHPTHYSIRS	715
FVIII <sup>2160-2180</sup> -70	RYIRLHPTHYSIRST	716
FVIII <sup>2160-2180</sup> -71	YIRLHPTHY	717
FVIII <sup>2160-2180</sup> -72	YIRLHPTHYS	718

FVIII <sup>2160-2180</sup> -73	YIRLHPHYSI	719
FVIII <sup>2160-2180</sup> -74	YIRLHPHYSIR	720
FVIII <sup>2160-2180</sup> -75	YIRLHPHYSIRS	721
FVIII <sup>2160-2180</sup> -76	YIRLHPHYSIRST	722
FVIII <sup>2160-2180</sup> -77	IRLHPHYS	723
FVIII <sup>2160-2180</sup> -78	IRLHPHYSI	724
FVIII <sup>2160-2180</sup> -79	IRLHPHYSIR	725
FVIII <sup>2160-2180</sup> -80	IRLHPHYSIRS	726
FVIII <sup>2160-2180</sup> -81	IRLHPHYSIRST	727
FVIII <sup>2160-2180</sup> -82	RLHPHYSI	728
FVIII <sup>2160-2180</sup> -83	RLHPHYSIR	729
FVIII <sup>2160-2180</sup> -84	RLHPHYSIRS	730
FVIII <sup>2160-2180</sup> -85	RLHPHYSIRST	731
FVIII <sup>2160-2180</sup> -86	LHPHYSIR	732
FVIII <sup>2160-2180</sup> -87	LHPHYSIRS	733
FVIII <sup>2160-2180</sup> -88	LHPHYSIRST	734
FVIII <sup>2160-2180</sup> -89	HHPHYSIRS	735
FVIII <sup>2160-2180</sup> -90	HHPHYSIRST	736
FVIII <sup>2160-2180</sup> -91	HPHYSIRST	737

[0179] I. 因子 VIII<sup>102-122</sup>肽

[0180] 在一个实施方案中, 本发明提供一种具有序列  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$  的多肽, 其中 P 为与具有序列 :TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740) 的因子 VIII<sup>102-122</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 且  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0181] 在一个实施方案中, P 为与具有序列 :TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740) 的因子 VIII<sup>102-122</sup> 肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与具有序列 :TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740) 的因子

VIII<sup>102-122</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。

[0182] 在本发明的背景中, FVIII<sup>102-122</sup>肽还包括 FVIII<sup>102-119</sup>肽。因此, 在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 以及 SEQ ID NO:738 至 SEQ ID NO:773 的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 以及 SEQ ID NO:738 至 SEQ ID NO:773 的序列具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为与选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 以及 SEQ ID NO:738 至 SEQ ID NO:773 的序列具有至少 95% 同一性的氨基酸序列。在一个实施方案中, P 为选自 SEQ ID NO:1 至 SEQ ID NO:55 以及 SEQ ID NO:738 至 SEQ ID NO:773 的氨基酸序列。在一些实施方案中, x 与 y 可均为 0。在其它实施方案中, x 可为 1 且 y 可为 0。在其它实施方案中, x 可为 0 且 y 可为 1。在另一实施方案中, x 与 y 可均为 1。

[0183] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0184] 在一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0185] 表 10. 示例性 FVIII<sup>102-122</sup>肽

[0186]

肽	序列	SEQ ID NO:
FVIII <sup>102-122</sup> -738	TVVITLKNMASHPVSLHAV	738
FVIII <sup>102-122</sup> -739	TVVITLKNMASHPVSLHAVG	739

FVIII <sup>102-122</sup> -740	TVVITLKNMASHPVS LHAVGV	740
FVIII <sup>102-122</sup> -741	VVITLKNMASHPVS LHAV	741
FVIII <sup>102-122</sup> -742	VVITLKNMASHPVS LHAVG	742
FVIII <sup>102-122</sup> -743	VVITLKNMASHPVS LHAVGV	743

## [0187]

FVIII <sup>102-122</sup> -744	VITLKNMASHPVS LHAV	744
FVIII <sup>102-122</sup> -745	VITLKNMASHPVS LHAVG	745
FVIII <sup>102-122</sup> -746	VITLKNMASHPVS LHAVGV	746
FVIII <sup>102-122</sup> -747	ITLKNMASHPVS LHAV	747
FVIII <sup>102-122</sup> -748	ITLKNMASHPVS LHAVG	748
FVIII <sup>102-122</sup> -749	ITLKNMASHPVS LHAVGV	749
FVIII <sup>102-122</sup> -750	TLKNMASHPVS LHAV	750
FVIII <sup>102-122</sup> -751	TLKNMASHPVS LHAVG	751
FVIII <sup>102-122</sup> -752	TLKNMASHPVS LHAVGV	752
FVIII <sup>102-122</sup> -753	LKNMASHPVS LHAV	753
FVIII <sup>102-122</sup> -754	LKNMASHPVS LHAVG	754
FVIII <sup>102-122</sup> -755	LKNMASHPVS LHAVGV	755
FVIII <sup>102-122</sup> -756	KNMASHPVS LHAV	756
FVIII <sup>102-122</sup> -757	KNMASHPVS LHAVG	757
FVIII <sup>102-122</sup> -758	KNMASHPVS LHAVGV	758
FVIII <sup>102-122</sup> -759	NMASHPVS LHAV	759
FVIII <sup>102-122</sup> -760	NMASHPVS LHAVG	760
FVIII <sup>102-122</sup> -761	NMASHPVS LHAVGV	761
FVIII <sup>102-122</sup> -762	MASHPVS LHAV	762

FVIII <sup>102-122</sup> -763	MASHPVSLHAVG	763
FVIII <sup>102-122</sup> -764	MASHPVSLHAVGV	764
FVIII <sup>102-122</sup> -765	ASHPVSLHAV	765
FVIII <sup>102-122</sup> -766	ASHPVSLHAVG	766
FVIII <sup>102-122</sup> -767	ASHPVSLHAVGV	767
FVIII <sup>102-122</sup> -768	SHPVSLHAV	768
FVIII <sup>102-122</sup> -769	SHPVSLHAVG	769
FVIII <sup>102-122</sup> -770	SHPVSLHAVGV	770
FVIII <sup>102-122</sup> -771	HPVSLHAVG	771
FVIII <sup>102-122</sup> -772	HPVSLHAVGV	772
FVIII <sup>102-122</sup> -773	PVSLHAVGV	773

#### [0188] IV. 制造 FVIII 肽的方法

[0189] 在另一方面中,本发明进一步涉及制造 FVIII 肽的方法。在一些实施方案中,本发明的 FVIII 肽可以使用本领域中通常已知的固相(例如 Fmoc 或 t-Boc)或液相合成技术来制造。参见例如 Chan&White 编, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000); Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis (CRC Press, 2005); Howl, Peptide Synthesis and Applications (Humana Press, 2010)。

[0190] 在一个实施方案中,本发明包括一种制造 FVIII 肽的方法,所述方法包括:a) 使用固相或液相合成技术合成肽,所述 FVIII 肽具有以下序列: $(R^1)_x$ -P-( $R^2$ )<sub>y</sub>, 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列, R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在某些实施方案中,所述肽可涵盖人类 FVIII 蛋白的整个 B 域。

[0191] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或

两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0192] 在其它实施方案中, 所述肽可以使用重组技术来制造。在一个实施方案中, 本发明包括一种制造 FVIII 肽的方法, 所述方法包括以下步骤: a) 提供包含编码 FVIII 肽的载体的细胞培养物, 所述 FVIII 肽具有以下序列:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且  $x$  和  $y$  各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中,  $R^1$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且  $R^2$  为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在某些实施方案中, 所述肽可以涵盖人类 FVIII 蛋白的整个 B 域。

[0193] 在一个实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0194] 在一个实施方案中, 本发明提供一种制造 FVIII 肽的方法, 所述方法包括以下步骤: a) 提供包含编码 FVIII 肽的多核苷酸的细胞培养物, 所述肽具有以下序列:  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$ , 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;  $R^2$  为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且  $x$  和  $y$  各独立地为 0 或 1; 和 b) 在所述细胞培养物中表达所述肽。

[0195] 在一个实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$  和  $R^2$  单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$

和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0196] 在制造 FVIII 肽的方法的一个实施方案中, FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0197] 本发明的 FVIII 肽可以通过在合适的原核或真核宿主系统中表达来产生。真核细胞的实例包括(但不限于)哺乳动物细胞,如 CHO、COS、HEK 293、BHK、SK-Hep 以及 HepG2; 昆虫细胞,例如 SF9 细胞、SF21 细胞、S2 细胞以及 High Five 细胞; 以及酵母细胞,例如酵母属 (*Saccharomyces*) 细胞或裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 细胞。在一个实施方案中, FVIII 肽可以在细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞、禽类细胞、哺乳动物细胞以及其类似细胞中表达。在一些实施方案中, 肽可在人类细胞系、仓鼠细胞系或鼠类细胞系中表达。在一个特定实施方案中, 细胞系为 CHO、BHK 或 HEK 细胞系。

[0198] 广泛多种载体可以用于表达 FVIII 肽且可以选自真核和原核表达载体。所述载体将包括表达至少一种本文中所公开的 FVIII 肽所必需的核苷酸序列。原核表达载体的实例包括质粒, 如 pRSET、pET、pBAD 等, 其中原核表达载体中所用的启动子包括 lac、trc、trp、recA、araBAD 等。真核表达载体的实例包括: (i) 对于在酵母中表达, 如 pA0、pPIC、pYES、pMET 的载体, 使用如 AOX1、GAP、GAL1、AUG1 等的启动子; (ii) 对于在昆虫细胞中表达, 如 pMT、pAc5、pIB、pMIB、pBAC 等的载体, 使用如 PH、p10、MT、Ac5、OpIE2、gp64、polh 等的启动子, 并且 (iii) 对于在哺乳动物细胞中表达, 如 pSVL、pCMV、pRc/RSV、pcDNA3、pBPV 等的载体和来源于病毒系统(如牛痘病毒、腺相关病毒、疱疹病毒、反转录病毒等)的载体, 使用如 CMV、SV40、EF-1、UbC、RSV、ADV、BPV 以及  $\beta$ -肌动蛋白的启动子。

[0199] 在本发明的一些实施方案中, 用于产生 FVIII 肽的核酸序列进一步包括适用于受控蛋白质表达的其它序列, 如启动子序列、增强子、TATA 盒、转录起始位点、多接头、限制性位点、聚 A 序列、蛋白质加工序列、选择标记以及其类似序列, 其通常为本领域的普通技术人员所已知。

[0200] 对产生 FVIII 肽的细胞所用的培养基可以基于本领域中熟知的合适基础培养基, 例如 DMEM、汉姆氏 F12 (Ham's F12)、培养基 199 (Medium 199)、McCoy 或 RPMI。基础培养基可以包括许多成分, 包括氨基酸、维生素、有机盐和无机盐、以及碳水化合物来源。各成分可

以按支持细胞培养的量存在,所述量通常为本领域技术人员已知。培养基可以包括辅助物质,如缓冲物质(例如碳酸氢钠)、抗氧化剂、抵消机械应力的稳定剂、或蛋白酶抑制剂。必要时,可以添加非离子表面活性剂,如聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物和/或混合物。

[0201] 在一些实施方案中,培养基不含外源添加的蛋白质。“不含蛋白质”和相关术语是指来自自由培养物中的细胞外源性或除培养物中的细胞以外的来源的蛋白质,其中所述细胞在生长期间天然排出蛋白质。在另一实施方案中,培养基不含多肽。在另一实施方案中,培养基不含血清。在另一实施方案中,培养基不含动物蛋白。在另一实施方案中,培养基不含动物组分。在另一实施方案中,培养基含有蛋白质,例如来自血清(如胎牛血清)的动物蛋白。在另一实施方案中,培养物具有外源添加的重组蛋白。在另一实施方案中,蛋白质来自经过证实无病原体的动物。

[0202] 制备不含动物蛋白且化学成分确定的培养基的方法为本领域中已知,例如在 US 2008/0009040 和 US 2007/0212770 中,所述文献皆并入本文中以用于所有目的。在一个实施方案中,本文所述的方法中所用的培养基为不含动物蛋白或不含寡肽的培养基。在某些实施方案中,培养基可为化学成分确定的培养基。如本文所用的术语“化学成分确定”应意指培养基不包含任何不确定的补充物,如例如动物组分、器官、腺体、植物或酵母的提取物。因此,化学成分确定的培养基的各组分为精确确定的。

[0203] 在某些实施方案中,本发明的方法可以包括使用例如以分批方式、半分批方式、补料分批方式或连续方式操作的细胞培养系统。分批培养可为大规模细胞培养,其中细胞接种物在槽或发酵罐中培养至最大密度,且以分批形式收集和处理。补料分批培养可为供给新鲜营养物(例如生长限制性底物)或添加剂(例如产物前体)的分批培养。连续培养可为通过流入新鲜培养基连续供给营养物的悬浮培养,其中培养物体积一般为恒定的。类似地,连续发酵可指通过连续添加新鲜培养基(其通过从生物反应器移除细胞悬浮液而恰好平衡)而使细胞或微生物在培养物中维持在指数生长期的过程。此外,搅拌槽反应器系统可用于悬浮培养、灌流培养、恒化培养(chemostatic culture)和/或微载体培养。通常,搅拌槽反应器系统可如同具有任何类型的搅拌器(如 Rushton 型、水翼型、斜叶桨型或船用型(marine))的任何常规搅拌槽反应器般操作。

[0204] 在某些实施方案中,本发明的细胞培养法可以包括使用微载体。在一些实施方案中,实施方案的细胞培养可以在适于提供高体积-比培养表面积的条件于大型生物反应器中进行以获得高细胞密度和蛋白质表达。一种提供所述生长条件的手段为在搅拌槽生物反应器中使用微载体进行细胞培养。细胞在微载体上生长的概念首先由 vanWezel(van Wezel, A. L., Nature 216:64-5(1967)) 描述并且允许细胞附着于悬浮于生长培养基中的小固体颗粒表面上。这些方法提供高表面与体积比并且因此允许有效的营养物利用。此外,对于在真核细胞系中表达分泌蛋白,表面与体积比增大允许较高分泌并且因此在培养物上清液中的蛋白质产率较高。最后,这些方法允许真核表达培养容易地按比例扩大。

[0205] 表达 FVIII 肽的细胞可以在细胞培养生长期间结合至球形或多孔微载体。微载体可为选自基于葡聚糖、胶原蛋白、塑料、明胶和纤维素以及其它的微载体的组的微载体。还可能使细胞在球形微载体上生长至某一生物量并且当它们已达到最终发酵罐生物量时且在多孔微载体上产生表达蛋白之前继代培养细胞,或反之亦然。合适的球形微载体可以包括光滑表面微载体,如 Cytodex™ 1、Cytodex™ 2 以及 Cytodex™ 3(GE Healthcare);和大孔

微载体,如 Cytopore™ 1、Cytopore™ 2、Cytoline™ 1 以及 Cytoline™ 2(GE Healthcare)。

[0206] 本领域的普通技术人员应了解,通过上述合成和 / 或重组方法产生的 FVIII 肽可包括天然和 / 或非天然氨基酸,包括氨基酸类似物和 / 或氨基酸模拟物。

[0207] V. 用于诱导免疫耐受性的因子 FVIII 肽组合物

[0208] 在另一方面中,本文中所公开的 FVIII 肽可以包括于药物组合物中。在一个实施方案中,本发明提供一种药物组合物,其包含如本文所述的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽、因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽或因子 VIII<sup>102-122</sup>肽。

[0209] 在一个实施方案中,所述药物组合物包含如本文所述的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽、FVIII<sup>102-122</sup>肽或第二 FVIII<sup>246-266</sup>肽。

[0210] 在另一实施方案中,所述药物组合物包含如本文所述的因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>102-122</sup>肽或第二 FVIII<sup>1401-1424</sup>肽。

[0211] 在另一实施方案中,所述药物组合物包含如本文所述的因子 VIII<sup>102-122</sup>肽。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或第二 FVIII<sup>102-122</sup>肽。

[0212] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种包含肽的药物组合物,所述肽具有以下序列:(R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>,其中 P 为与选自 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中,R<sup>1</sup>为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列,并且 R<sup>2</sup>为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0213] 在一个实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0214] 在一个实施方案中,FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII

肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0215] 在一个特定实施方案中, 所述药物组合物进一步包含第二多肽, 所述第二多肽具有以下序列:  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$ , 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列, R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0216] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup> 和 R<sup>2</sup> 单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0217] 在一个实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0218] A. 施用

[0219] 为向人类或测试动物施用组合物, 在一方面中, 所述组合物可以包含一种或多种药学上可接受的载体。短语“药学上”或“药理学上”可接受是指当使用如下所述的本领域中熟知的途径施用时, 稳定、抑制蛋白质或肽降解(如聚集和裂解产物)并且另外不产生过

敏性或其它不良反应的分子实体和组合物。“药学上可接受的载体”包括任何和所有临床上有用的溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂以及其类似物。

[0220] 药物组合物可以经口、局部、经皮、胃肠外、通过吸入喷雾、经阴道、直肠或通过颅内注射施用。如本文所用的术语胃肠外包括皮下注射、静脉内、肌肉内、脑池内注射或输注技术。还涵盖通过静脉内、皮内、肌肉内、乳房内、腹膜内、鞘内、眼球后、肺内注射和或手术植入特定部位而进行的施用。通常，组合物基本上不含热原质以及可能对接受者有害的其它杂质。

[0221] 施用的剂量和频率将取决于本领域技术人员通常所了解的各种因素，包括例如患者血友病的严重程度和 / 或使用较大或较小剂量是否更有效地诱导免疫耐受性。典型每日剂量可在约 0.01mg/kg 至 100mg/kg 范围内。每周 0.07-700mg FVIII 肽范围内的剂量可能为有效且被完全耐受的，不过甚至更高的每周剂量可能为适当且 / 或被完全耐受的。在规定的适当剂量中的主要决定因素为在特定情形下在治疗上有效所必需的特定 FVIII 肽的量。为获得较长持续时间的免疫耐受性，可能需要重复施用。可以使用由治疗医师所选的剂量水平和模式进行组合物的单次或多次使用。

[0222] 在一方面中，本发明的组合物可以通过团注 (bolus) 施用。作为另一实例，FVIII 肽可以作为一次剂量施用。本领域的普通技术人员将容易地如由良好医疗操作和个别患者临床情况所确定使有效剂量和施用方案最优化。给药频率取决于施用途径。最优药物组合物由本领域技术人员根据施用途径和所需剂量而确定。参见例如 Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Remington the Science and Practice of Pharmacy), 第 21 版. (2005, Lippincott Williams & Wilkins), 其公开内容据此以引用的方式并入本文中。所述组合物影响所施用药剂的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除率。取决于施用途径，根据体重、体表面积或器官大小计算合适剂量。适当剂量可以通过使用测定血液水平剂量的已确立的测定连同适当的剂量 - 反应数据来确定。最终给药方案由主治医师考虑改变药物作用的各种因素来确定，所述因素例如药物比活性、患者的损伤严重程度和反应性、患者年龄、病状、体重、性别以及饮食、任何感染的严重程度、施用时间以及其它临床因素。

[0223] 在一些实施方案中，包含本文中所公开的 FVIII 肽的组合物在施用之前冻干。冻干是使用本领域中常见的技术来进行且应如例如 Tang 等, Pharm Res. 21:191-200, (2004) 和 Chang 等, Pharm Res. 13:243-9 (1996) 中所述最优化而用于所开发的组合物。制备药物组合物的方法可以包括以下步骤中的一个或多个：在冻干之前将稳定剂添加至混合物中；在冻干之前添加至少一种选自增积剂、渗透压 (osmolarity) 调节剂以及表面活性剂的试剂至混合物中。在一方面中，冻干制剂至少包含缓冲剂、增积剂以及稳定剂中的一种或多种。在此方面中，在冻干步骤期间或在复原期间聚集成为问题的情况下评估并选择表面活性剂的应用。包含适当缓冲剂以使制剂在冻干期间维持在稳定 pH 带内。

[0224] 冻干材料的标准复原实践是添加回一定体积的纯水或无菌注射用水 (WFI) (通常等于在冻干期间所移除的体积)，但是在用于胃肠外施用的药物的制造中有时使用抗菌剂的稀溶液。因此，提供制备复原 FVIII 肽组合物的方法，其包括添加稀释剂至冻干 FVIII 肽组合物中的步骤。

[0225] 在一些实施方案中，冻干材料可以复原为水溶液。多种水性载体，例如无菌注射用水、供多剂量使用的含防腐剂的水、或含适当量的表面活性剂的水 (例如含有与适

于制造水性混悬液的赋形剂混合的活性化合物的水性混悬液)。在各种方面中,所述赋形剂为悬浮剂,例如(但不限于)羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、褐藻酸钠、聚乙烯基吡咯烷酮、黄耆胶以及阿拉伯胶;分散或湿润剂为天然存在的磷脂,例如(但不限于)卵磷脂;或环氧烷与脂肪酸的缩合产物,例如(但不限于)聚氧乙烯硬脂酸酯;或环氧乙烷与长链脂肪族醇的缩合产物,例如(但不限于)十七乙氧基十六醇(heptadecaethyl-eneoxycetanol);或环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物,如聚氧乙烯山梨糖醇单油酸酯;或环氧乙烷与从脂肪酸和己糖醇衍生的偏酯的缩合产物,例如(但不限于)聚乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。在各种方面中,水性悬浮液还含有一种或多种防腐剂,例如(但不限于)对羟基苯甲酸乙酯或对羟基苯甲酸正丙酯。

#### [0226] VI. 治疗方法

[0227] 本发明进一步涉及治疗患有与 FVIII 蛋白有关的疾病(如甲型血友病或后天性血友病)的患者的方法。所述方法可以包括施用至少一种本文中公开的 FVIII 肽。具体来说,可以施用包含至少一种 FVIII 肽的药物组合物以在患者中诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性。

[0228] 在一些实施方案中,诱导对 FVIII 的免疫耐受性的方法可以包括在施用 FVIII 之后防止 FVIII 抑制剂发展。术语“防止”是指不允许大致可检测的针对 FVIII 的免疫反应。例如,患者在施用 FVIII 蛋白之前可能不具有任何可检测的抗 FVIII 抗体。然而,在 FVIII 蛋白的施用疗法之后,如果未施用 FVIII 肽来诱导免疫耐受性,那么可检测的抗 FVIII 抗体的含量会增加。施用本文中所公开的 FVIII 肽可以诱导免疫耐受性,从而治疗患有血友病的患者。

[0229] 在其它实施方案中,诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性的方法可以包括治疗已经具有确定的 FVIII 抑制剂的患者。在这些实施方案中,施用 FVIII 肽可以减少或消除抗 FVIII 抗体的存在。术语“减少”意指针对 FVIII 蛋白的免疫反应部分减少。在某些实施方案中,减少免疫反应可以包括与患者在施用 FVIII 肽之前的免疫反应程度相比免疫反应减少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 或 90%。例如,减少百分比可以通过使用测定 FVIII 抗体存在量的标准方法来测量在施用 FVIII 肽之前和之后血液中所存在的抗 FVIII 抗体的量来分析。在其它实施方案中,免疫反应减少可以包括测量对 FVIII 有特异性的 CD4<sup>+</sup>T 细胞,或分泌 FVIII 抗体的 FVIII 特异性 B 细胞,或 T 细胞、B 细胞以及抗 FVIII 抗体所有三者的组合的减少程度。可以使用本领域中通常已知的方法分离免疫细胞,如对 FVIII 有特异性的 T 细胞和 B 细胞。

[0230] 在一方面中,本发明包括一种在受试者中诱导对 FVIII 的免疫耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含如本文所述的 FVIII 肽的药物组合物的步骤。在一个特定实施方案中,所述 FVIII 肽为如本文所述的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽、因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽或因子 VIII<sup>102-122</sup>肽。

[0231] 在一个实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含如本文所述的因子 VIII<sup>246-266</sup>肽的药物组合物的步骤。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽、FVIII<sup>102-122</sup>肽或第二 FVIII<sup>246-266</sup>肽。

[0232] 在另一实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含如本文

所述的因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽的药物组合物的步骤。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>102-122</sup>肽或第二 FVIII<sup>1401-1424</sup>肽。

[0233] 在另一实施方案中,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含如本文所述的因子 VIII<sup>102-122</sup>肽的药物组合物的步骤。在另一实施方案中,所述药物组合物进一步包含如本文所述的 FVIII<sup>474-494</sup>肽、FVIII<sup>540-560</sup>肽、FVIII<sup>1785-1805</sup>肽、FVIII<sup>2025-2045</sup>肽、FVIII<sup>2160-2180</sup>肽、FVIII<sup>102-119</sup>肽、FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或第二 FVIII<sup>102-122</sup>肽。

[0234] 在一个实施方案中,本发明提供一种诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的包含肽的药物组合物,所述肽具有以下序列:(R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>,其中 P 为与选自 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列;R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1;从而在所述受试者中诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性。在某些实施方案中,R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列,并且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0235] 在一个实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0236] 在一个实施方案中,FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中,FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中,FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0237] 诱导免疫耐受性的方法可以进一步包括组合疗法,其中可以施用数种肽来诱导免疫耐受性。在一个实施方案中,诱导免疫耐受性的方法进一步包括施用治疗有效量的至少具有序列 (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub> 的第二肽,其中 P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659

以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列 ;R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ;R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ;并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1 ;从而在受试者中诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性。在某些实施方案中, R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在一个特定实施方案中, 所述第二肽由 9 至 80 个氨基酸组成。在另一特定实施方案中, 所述第二肽中的任何其它氨基酸为天然氨基酸。在另一特定实施方案中, 所述第二肽由 9 至 40 个氨基酸长度组成。在一个特定实施方案中, 所述第二肽由 9 至 80 个氨基酸长度组成, 并且所述第二肽中的任何其它氨基酸为天然氨基酸。

[0238] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0239] 在一个实施方案中, 第二 FVIII 肽由 9 至 150 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 100 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 50 个氨基酸组成。在另一实施方案中, FVIII 肽由 9 至 25 个氨基酸组成。在其它实施方案中, FVIII 肽由 9 至 10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175 或 180 个氨基酸组成。

[0240] 在诱导免疫耐受性的方法的一个特定实施方案中, 其中所施用的药物组合物包含肽, 其中 P 为与 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 或 SEQ ID NO:740 的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列, 所述组合物进一步包含第二多肽, 所述第二多肽具有以下序列: (R<sup>1</sup>)<sub>x</sub>-P-(R<sup>2</sup>)<sub>y</sub>, 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:159、SEQ ID NO:250、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:477、SEQ ID NO:568、SEQ ID NO:659 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列 ;R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ;R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列 ;并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0241] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在

另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中,  $R^1$ 和  $R^2$ 单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0242] 在一方面中, 本发明提供如本文所述的 FVIII 肽的用途, 其用于制造用以处理针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的药物。在一个特定实施方案中, 所述 FVIII 肽为 FVIII<sup>1401-1424</sup>肽。在相关方面中, 本发明提供如本文所述的 FVIII 肽的用途, 其用于制造用以防止针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的药物。在一个特定实施方案中, 所述 FVIII 肽为 FVIII<sup>1401-1424</sup>肽。

[0243] 在一方面中, 本发明提供一种用作药剂的 FVIII 肽。在一个特定实施方案中, 本发明提供一种用作药剂的具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽, 其中 P 为与具有序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且  $R^2$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0244] 在一方面中, 本发明提供一种用于处理针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的 FVIII 肽。在一个特定实施方案中, 本发明提供一种用于处理针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽, 其中 P 为与具有序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且  $R^2$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0245] 在一方面中, 本发明提供一种用于防止针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的 FVIII 肽。在一个特定实施方案中, 本发明提供一种用于防止针对 FVIII 替代疗法产生的免疫反应的具有序列  $(R^1)_x$ -P- $(R^2)_y$  的多肽, 其中 P 为与具有序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO: 344) 的因子 VIII<sup>1401-1424</sup>肽的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列,  $R^1$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且  $R^2$ 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列, 其中 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0246] VII. 免疫诊断

[0247] 在一方面中, 本发明提供一种在有需要的受试者中监测 FVIII 替代疗法或 FVIII 免疫耐受性诱导疗法的方法, 其是通过在从所述受试者获取的生物样品中鉴定对 FVIII 有特异性的 FVIII 抑制抗体或 CD4<sup>+</sup>T 细胞的存在或含量来达成。

[0248] 在一个实施方案中, 所述方法包括一种在有需要的受试者中监测 FVIII 替代疗法的方法, 所述方法包括: 使所述受试者的生物样品与如本文所述的 FVIII<sup>246-266</sup>肽、

FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或 FVIII<sup>102-122</sup>肽接触；和检测在所述 FVIII 肽与所述样品中所存在的 FVIII 抑制抗体之间形成的复合物。在一个实施方案中，所述方法包括测定所述样品中 FVIII 抑制抗体的含量。在另一实施方案中，所述方法包括测定在不同时间从所述受试者获取的至少两个样品中 FVIII 抑制抗体的含量，并且比较所述两个样品之间 FVIII 抑制抗体的含量，其中抗体含量随时间增加表明针对向所述受试者施用的 FVIII 的免疫反应在 FVIII 替代疗法过程中形成。

[0249] 在另一实施方案中，所述方法包括一种在有需要的受试者中监测 FVIII 免疫耐受性诱导疗法的方法，所述方法包括：使所述受试者的生物样品与如本文所述的 FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或 FVIII<sup>102-122</sup>肽接触；和检测在所述 FVIII 肽与所述样品中所存在的 FVIII 抑制抗体之间形成的复合物。在一个实施方案中，所述方法包括测定所述样品中 FVIII 抑制抗体的含量。在另一实施方案中，所述方法包括测定在不同时间从所述受试者获取的至少两个样品中 FVIII 抑制抗体的含量，并且比较所述两个样品之间 FVIII 抑制抗体的含量，其中抗体含量随时间减少表明针对 FVIII 蛋白的免疫耐受性在所述受试者中形成。

[0250] 在一个实施方案中，所述方法包括一种在有需要的受试者中监测 FVIII 替代疗法的方法，所述方法包括：使所述受试者的生物样品与如本文所述的 FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或 FVIII<sup>102-122</sup>肽接触；和检测在所述 FVIII 肽与所述样品中所存在的对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞之间形成的复合物。在一个实施方案中，所述方法包括测定所述样品中对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量。在另一实施方案中，所述方法包括测定在不同时间从所述受试者获取的至少两个样品中对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量，并且比较所述两个样品之间对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量，其中抗体含量随时间增加表明针对向所述受试者施用的 FVIII 的免疫反应在 FVIII 替代疗法过程中形成。在一个特定实施方案中，所述 FVIII 肽与 MHC II 类多聚体复合。

[0251] 在另一实施方案中，所述方法包括一种在有需要的受试者中监测 FVIII 免疫耐受性诱导疗法的方法，所述方法包括：使所述受试者的生物样品与如本文所述的 FVIII<sup>246-266</sup>肽、FVIII<sup>1401-1424</sup>肽或 FVIII<sup>102-122</sup>肽接触；和检测在所述 FVIII 肽与所述样品中所存在的对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞之间形成的复合物。在一个实施方案中，所述方法包括测定所述样品中对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量。在另一实施方案中，所述方法包括测定在不同时间从所述受试者获取的至少两个样品中对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量，并且比较所述两个样品之间对 FVIII 有特异性的 CD4+T 细胞的含量，其中抗体含量随时间减少表明针对 FVIII 蛋白的免疫耐受性在所述受试者中形成。在一个特定实施方案中，所述 FVIII 肽与 MHC II 类多聚体复合。

[0252] 如本领域的普通技术人员所了解，免疫监测可以例如用以推进患有血友病的患者的治疗。例如，免疫监测可以用于鉴定施用本发明的肽和 / 或组合物是否防止或减少针对 FVIII 产物的免疫反应。剂量和 / 或剂量间隔可以通过免疫监测来最优化。在一些实施方案中，施用剂量可以特别基于防止或减少抗 FVIII 抗体的免疫监测结果来定制。另外，可以确定特定患者或患者群体的给药间隔以及剂量。

[0253] A. 鉴定 FVIII 特异性 T 细胞的方法

[0254] 在另一方面中，本发明包括鉴定抗原特异性 T 细胞，更确切地讲为对 FVIII 蛋白和

本文所述的 FVIII 肽有特异性的 T 细胞的方法。所述方法可以例如用于患者的免疫诊断, 如免疫监测。在一个实施方案中, 本发明包括一种鉴定 FVIII 肽特异性 T 细胞的方法, 所述方法包括 a) 使多种 CD4<sup>+</sup>T 细胞与同 MHC II 类多聚体复合的 FVIII 肽组合, 所述 FVIII 肽具有以下序列:  $(R^1)_x-P-(R^2)_y$ , 其中 P 为与选自 SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:344 以及 SEQ ID NO:740 的序列的至少九个连续氨基酸的序列具有至少 85% 同一性的氨基酸序列; R<sup>1</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R<sup>2</sup> 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且 x 和 y 各独立地为 0 或 1; 和 b) 鉴定对与 MHC II 类多聚体复合的肽有特异性的所述多种 CD4<sup>+</sup>T 细胞中的至少一员。在一些实施方案中, R<sup>1</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列, 并且 R<sup>2</sup> 为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0255] 在某些实施方案中, 本文中公开的 FVIII 肽可以用于产生适于使 FVIII 特异性 T 细胞直接染色的试剂。例如, 呈现本发明的 FVIII 肽的 MHC II 类多聚体可以包括多种形式, 如 MHC II 类四聚体。这些 MHC II 类分子可以经过进一步修饰而包含诊断剂。或者, 与 MHC II 类多聚体复合的 FVIII 肽可以包含诊断剂。本发明所用的诊断剂 (即可检测部分) 可以包括免疫监测领域中通常已知的诊断剂。例如, 可以基于检测与本文所述的由 MHC II 类四聚体呈现的 FVIII 肽缔合的诊断剂来鉴定和 / 或分离 FVIII 特异性 T 细胞。合适诊断剂可以包括荧光剂、化学发光剂、放射性试剂、造影剂以及其类似试剂。合适荧光剂包括典型用于流动式细胞测量术的荧光剂并且可以包括 (但不限于) 异硫氰酸荧光素、R-藻红素、得克萨斯红 (Texas Red)、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7 以及其衍生物。

[0256] 在某些实施方案中, FVIII 肽可以用于体外再刺激 CD4<sup>+</sup>FVIII 特异性 T 细胞。在这些实施方案中, 再刺激 T 细胞可以通过检测增殖、细胞因子或趋化因子的分泌或本领域技术人员已知的某些活化标记的上调或下调来监测。

[0257] 在一些实施方案中, 诊断剂检测可以用于鉴定和 / 或分离对本文中所公开的 FVIII 肽有特异性的 T 细胞。例如, 上述试剂 (例如肽、MHC II 类四聚体以及诊断剂) 可以用于体外或离体追踪 FVIII 特异性 T 细胞。在某些实施方案中, 可使用本领域中通常已知的各种技术进一步分离和表征 T 细胞, 所述技术如流动式细胞测量术, 例如荧光活化细胞分选 (FACS); 和 / 或 PCR, 例如单细胞 PCR。

[0258] 为进行免疫监测分析, 结合 FVIII 肽-MHC II 类多聚体复合物的 T 细胞包括 CD4<sup>+</sup>T 细胞, 并且可以使用本领域中通常已知的多种方法从患者分离。例如, T 细胞可从患者血液、器官或其它组织分离和纯化。FVIII 特异性 T 细胞的分离和鉴定可以用于多种免疫诊断应用。在某些实施方案中, FVIII 肽或相关试剂可以在新 FVIII 产品的临床开发期间用于免疫监测 FVIII 特异性 T 细胞。在其它实施方案中, FVIII 肽可以在免疫耐受性诱导疗法期间用于免疫监测 FVIII 特异性 T 细胞。在其它实施方案中, FVIII 肽可以在 FVIII 治疗期间用于免疫监测 FVIII 特异性 T 细胞。

[0259] VIII. 本发明的试剂盒

[0260] 本发明还提供推进和 / 或标准化由本发明提供的组合物的使用以及推进本发明的方法的试剂盒。可以在试剂盒中提供用于进行这些不同方法的材料和试剂以推行方法的执行。如本文中所示, 术语“试剂盒”用以指推进方法、测定、分析或操纵的物品组合。

[0261] 试剂盒可以含有化学试剂 (例如 FVIII 肽或编码 FVIII 肽的多核苷酸) 以及其它组分。另外, 本发明的试剂盒还可以包括例如 (但不限于) 用于样品收集和 / 或纯化的设

备和试剂、用于产物收集和 / 或纯化的设备和试剂、用于细菌细胞转化的试剂、用于真核细胞转染的试剂、预先转化或转染的宿主细胞、样品管、固持器、塔盘、支架、器皿、平板、试剂盒使用者的说明书、溶液、缓冲剂或其它化学试剂,适用于标准化、正规化的样品和 / 或对样品。本发明的试剂盒还可以封装于例如具有盖子的盒子中以便方便储存和安全运送。

[0262] 在一些实施方案中,例如,本发明的试剂盒可以提供本发明的 FVIII 肽、编码本发明的 FVIII 肽的多核苷酸载体(例如质粒)、适于繁殖载体的细菌细胞菌株以及用于纯化所表达的融合蛋白的试剂。或者,本发明的试剂盒可以提供为进行 FVIII 肽诱变所需的试剂,以便产生 FVIII 肽的经过保守修饰的变异体。

[0263] 试剂盒可以含有一种或多种本发明的组合物,例如一种或多种 FVIII 肽或一种或多种编码 FVIII 肽的多核苷酸。或者,试剂盒可以含有用于进行患者的免疫监测的试剂(例如肽、MHC II 类四聚体以及诊断剂)。

[0264] 本发明的试剂盒还可以含有一种或多种编码 FVIII 肽的重组核酸分子,所述分子可以为相同或不同的,并且可以进一步包含(例如)操作性连接的含有或编码限制性核酸内切酶识别位点或重组酶识别位点、或任何所感兴趣多肽的第二多核苷酸。另外,试剂盒可以含有使用试剂盒组分(尤其试剂盒中所含有的本发明的组合物)的说明书。

[0265] IX. 特定实施方案

[0266] 在一个实施方案中,本发明提供一种 FVIII 肽,其由与以下氨基酸序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT(SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成,并且所述肽具有式: (R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>, 其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 并且下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0267] 在一个实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 70 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 60 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 50 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 40 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 30 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 20 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 10 个氨基酸组成的氨基酸序列。在另一实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 5 个氨基酸组成的氨基酸序列。在其它实施方案中, R<sup>1</sup>和 R<sup>2</sup>单独或两者均为由 1 至 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、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、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79 或 80 个氨基酸组成的氨基酸序列。

[0268] 在上述肽的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0269] 在上述肽的一个特定实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。

[0270] 在上述肽的一个特定实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。

[0271] 在上述肽的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 1。

[0272] 在上述肽的一个特定实施方案中, 九个氨基酸的连续序列与氨基酸序列:

QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸一致。

[0273] 在一个实施方案中,本发明提供一种包含 FVIII 肽的药物组合物,所述 FVIII 肽由与以下氨基酸序列:QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成,并且所述肽具有式:(R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>,其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;且下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1。

[0274] 在上述组合物的一个特定实施方案中,x 和 y 都为 0。

[0275] 在上述组合物的一个特定实施方案中,x 为 1 且 y 为 0。

[0276] 在上述组合物的一个特定实施方案中,x 为 0 且 y 为 1。

[0277] 在上述组合物的一个特定实施方案中,x 和 y 都为 1。

[0278] 在上述组合物的一个特定实施方案中,所述组合物进一步包含至少一种肽,所述肽由与独立地选自由以下组成的组的氨基酸序列中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成:GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)、PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250)、EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)、LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568)、NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)、TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10)、AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 以及 TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (SEQ ID NO:740),其中所述至少一种肽长度为最大 80 个氨基酸并且其中所述至少一种肽中的任何其它氨基酸为天然氨基酸。

[0279] 在一个实施方案中,本发明提供一种在受试者中诱导对 FVIII 的免疫耐受性的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的包含 FVIII 肽的药物组合物的步骤,所述 FVIII 肽由与以下氨基酸序列:QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成,并且所述肽具有式:(R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>,其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列;下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1;并且从而在所述受试者中诱导对 FVIII 蛋白的免疫耐受性。

[0280] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述药物组合物进一步包含至少一种肽,所述肽由与独立地选自由以下组成的组的氨基酸序列中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成:GEVGD TLLIIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)、PTKSDPRCLTRYSSFVNMER (SEQ ID NO:250)、EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)、LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568)、NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)、TVVITLKNMASHPVS LHA (SEQ ID NO:10)、AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68) 以及 TVVITLKNMASHPVS LHAVGV (SEQ ID NO:740),其中所述至少一种肽长度为最大 80 个氨基酸并且其中所述至少一种肽中的任何其它氨基酸为天然氨基酸。

[0281] 在上述方法的一个特定实施方案中,施用药物组合物防止在受试者中发展抗 FVIII 抗体。

[0282] 在上述方法的一个特定实施方案中,施用药物组合物减少受试者中存在的抗 FVIII 抗体的量。

[0283] 在上述方法的一个特定实施方案中,x 和 y 都为 0。

[0284] 在上述方法的一个特定实施方案中,x 为 1 且 y 为 0。

- [0285] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。
- [0286] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 1。
- [0287] 在一个实施方案中, 本发明提供一种制造 FVIII 肽的方法, 所述方法包括以下步骤: a) 提供包含编码 FVIII 肽的载体的细胞培养物, 所述 FVIII 肽由与以下氨基酸序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成, 并且所述肽具有式: (R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>, 其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1; 和 b) 在所述细胞培养物中表达所述肽。
- [0288] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 0。
- [0289] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。
- [0290] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。
- [0291] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 1。
- [0292] 在一个实施方案中, 本发明提供一种制造 FVIII 肽的方法, 所述方法包括: a) 使用固相或液相合成技术合成肽, 所述肽由与以下氨基酸序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成, 并且所述肽具有式: (R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>, 其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1。
- [0293] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 0。
- [0294] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。
- [0295] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。
- [0296] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 1。
- [0297] 在一个实施方案中, 本发明提供一种鉴定 FVIII 肽特异性 T 细胞的方法, 所述方法包括: a) 使多种 CD4+T 细胞与同 MHC II 类多聚体复合的 FVIII 肽组合, 所述 FVIII 肽由与以下氨基酸序列: QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344) 中的九个连续氨基酸至少 85% 一致的九个氨基酸的连续序列组成, 并且所述肽具有式: (R1)<sub>x</sub>-肽-(R2)<sub>y</sub>, 其中 R1 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; R2 为由 1 至 80 个氨基酸组成的氨基酸序列; 下标 x 和 y 各独立地为 0 或 1; 和 b) 鉴定对与 MHC II 类多聚体复合的肽有特异性的所述多种 CD4+T 细胞中的至少一员。
- [0298] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述 MHC II 类多聚体为 MHC II 类四聚体。
- [0299] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述肽或 MHC II 类多聚体进一步包含诊断剂。
- [0300] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述诊断剂鉴定对肽有特异性的所述多种 CD4+T 细胞的至少一员。
- [0301] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述方法进一步包括基于所述诊断剂的检测分离对所述肽有特异性的所述多种 CD4+T 细胞的至少一员。
- [0302] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述多种 CD4+T 细胞的至少一员是使用流动式细胞测量术分离。
- [0303] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 0。

[0304] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 1 且 y 为 0。

[0305] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 为 0 且 y 为 1。

[0306] 在上述方法的一个特定实施方案中, x 和 y 都为 1。

[0307] 现在在以下实施例中进一步说明本发明, 但本发明不受限于这些实施例。

[0308] X. 实施例

[0309] 实施例 1

[0310] 为了更好地模拟人类 MHC II 类分子以鉴定 FVIII 肽, 开发具有携带人类 HLA-DRB1\*1501 特异性结合位点的嵌合 MHC II 类分子的甲型血友病的小鼠模型。这种小鼠与完全剔除所有鼠类 MHC II 类基因的小鼠回交 (Reipert 等, J. Thromb. Haemost. 7 增刊 1:92-97 (2009))。在这种新转基因小鼠模型中, 所有 CD4<sup>+</sup>T 细胞反应都由人类 MHC II 类分子驱动。此小鼠模型用以鉴定由 HLA-DRB1\*1501 呈现的在这些小鼠中驱动抗 FVIII 免疫反应的 FVIII 肽。

[0311] 材料和方法

[0312] FVIII: 制得重组人类 FVIII (rFVIII), 其呈无白蛋白散装产品 (Baxter Neuchatel) 和临床蔗糖配制的 FVIII 产品 (Advate, Baxter, Westlake Village, CA) 形式。

[0313] 血友病 HLA-DRB15E17 小鼠: 如 Reipert 等, J. Thromb. Haemost. 7 增刊 1:92-97 (2009) 中所述的 HLA-DRB1\*1501<sup>+/-</sup>E17<sup>-/-</sup>小鼠。小鼠全部为雄性且在实验开始时为 8 至 12 周大。

[0314] 用人类重组 FVIII 免疫: HLA-DRB1\*1501<sup>+/-</sup>E17<sup>-/-</sup>小鼠以每周间隔接受 4 至 8 次之间的 0.2 μg 或 1 μg 人类 rFVIII 的静脉内或皮下剂量。将 rFVIII 稀释于原始制剂缓冲液或杜尔贝科磷酸盐缓冲生理盐水 (含有钙和镁) (DPBS, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 中。

[0315] 细胞制备: 在使用 rFVIII 最后一次免疫后 3 至 7 天取得脾脏。切碎脾细胞并且使其通过 70 μm 细胞过滤器 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)。将单一细胞收集于以下培养基中: 补充有 10% 预选胎牛血清 (FCS; Hyclone, Logan, UT)、2mM L-谷氨酰胺、100U/mL 青霉素/链霉素 (两者均来自 Gibco) 以及 5×10<sup>-5</sup>M 巯基乙醇 (Sigma-Aldrich) 的 RPMI 1640 培养基 (Gibco, Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA)。使用主要由 0.15M 氯化铵、10mM 碳酸氢钾 (两者均来自 Merck, Darmstadt, Germany) 以及 0.1mM 乙二胺四乙酸 (Sigma-Aldrich) 组成的低渗缓冲液 (pH 7.2) 溶解红血球。洗涤细胞并且使用库尔特计数器 Z1 计数。

[0316] 产生 T 细胞杂交瘤以鉴定 FVIII 肽

[0317] 用人类 rFVIII 体外再刺激脾细胞: 在 20 μg/mL 人类 FVIII 存在下以 1.5×10<sup>6</sup>个细胞/毫升的浓度于培养基中再刺激脾细胞 3 或 10 天。在 6 天后更新用于 10 天培养的培养基。

[0318] 小鼠 T 细胞与 BW 细胞的融合: 用无血清培养基洗涤体外再刺激的脾细胞培养物和 BW 细胞 (α-β-) 两次, 并且随后以 1:3 至 1:10 (T 细胞: BW 细胞) 的比率组合。BW 细胞系来源于小鼠 AKR/J T 细胞淋巴瘤。这些细胞在其表面 (α-β-) 上不具有 T 细胞受体且因此在与小鼠脾细胞融合后的任何 T 细胞受体来源于融合搭配物。在第三个洗涤步骤后, 移除上清液。通过在 45 秒内添加 1ml 聚乙二醇 (PEG; 50% HybiMax, Sigma-Aldrich) 来达成融

合条件。再培育 45 秒后,接着添加 50ml 无血清培养基以防止 PEG 的毒性效应。在 1300rpm 下不间断地离心细胞 5 分钟以形成非常结实的沉淀。弃去上清液并且非常缓慢地添加 50ml 新的无血清培养基,旨在不使沉淀移位。缓慢颠倒试管直至细胞再悬浮并且如前所述离心。进行此操作两次以移除剩余 PEG。用培养基进行最后的洗涤步骤。接着稀释细胞并且在 96 孔板中培养。在 48 小时后将培养基更换为选择培养基 (HAT 培养基补充物, Sigma Aldrich) 且选择生长克隆。保留选择培养基 2 周,其后接着将培养基更换回正常培养基。

[0319] FVIII 特异性 T 细胞杂交瘤的肽特异性:测试 T 细胞杂交瘤的抗原特异性。为此目的,使  $1 \times 10^5$  个细胞与抗原呈现细胞共培养。使用  $5 \times 10^4$  个 Mgar 细胞 (表达 HLA-DRB1\*1501) 或  $1 \times 10^5$  个来源于未处理的 HLA-DRB1\*1501-E17 小鼠的完整脾细胞。在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下用  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  人类 rFVIII 或  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  肽 / 肽池培育细胞 24 小时。收集上清液且根据制造商方案使用 IL-2 ELISA (BioLegend, San Diego, CA) 或 IL-2 Bio-Plex (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 测量释放于培养上清液中的 IL-2。在 FVIII (或肽) 存在 (而非不存在) 下 IL-2 释放量  $\geq 20\text{pg}/\text{ml}$  视为阳性,或者在 FVIII 存在下,与不存在 FVIII 相比 IL-2 释放量增加 10 倍视为阳性。

[0320] T 细胞杂交瘤的亚克隆:为确保各克隆仅表示一种类型的 T 细胞,亚克隆所有杂交瘤克隆。将杂交瘤克隆稀释成 0.3 个细胞 / 孔的限制稀释度并且与每孔 200 个喂养细胞共培养。喂养细胞是通过以丝裂霉素 C 处理融合搭配物细胞 BW 细胞来产生。在室温下用 0.1mg 来自头状链霉菌 (*Streptomyces caespitosus*) 的丝裂霉素 C (Sigma Aldrich) 处理  $2 \times 10^8$  个 BW 细胞 10 分钟且在  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  下于培育箱中培育 25 分钟。每个克隆选择五个生长亚克隆且测试其 FVIII 特异性。

[0321] 用以确定 T 细胞杂交瘤特异性的 FVIII 肽池:如 Ay 等 (Biopolymers 88:64-75(2007)) 所述,使用 SPOT 合成法产生 FVIII 肽池。简单地说,在两个相同的纤维素膜上合成 15 聚体肽。将膜切割为垂直和水平条带。肽从膜条带释放并且在如上所述的特异性测试中用作肽池。将肽溶解于 DMSO (Hybrimax, Sigma Aldrich) 中且用 PBS 进一步稀释。

[0322] 结果

[0323] 产生 181 种 FVIII 特异性杂交瘤克隆。针对覆盖整个人类 FVIII 的肽库筛选这些克隆。使用偏移三个氨基酸的 15 聚体肽。使用此方法鉴定含有与 HLA-DRB1\*1501 结合的肽的六个不同 FVIII 区。发现人类 FVIII 的两个肽域在 A1 域内、两个肽在 A2 域内、一个在 B 域内、两个在 A3 域内且一个肽域在 C1 域内。先前并未描述 FVIII 肽<sup>1401-1424</sup> (表 11)。已经在 WO 09/071886 中使用计算机预测程序继之以 T 细胞杂交瘤技术鉴定肽 FVIII<sup>474-494</sup>、FVIII<sup>545-559</sup>、FVIII<sup>1788-1802</sup> 以及 FVIII<sup>2161-2175</sup>。肽 FVIII<sup>2030-2044</sup> 公开于 WO 03/087161 中。肽 FVIII<sup>2161-2180</sup> 已由 Jacquemin 等, Blood 101(4):1351-8(2003) 公开。

[0324] 表 11. FVIII 的包括 T 细胞表位的区域

[0325]

包括 T 细胞表位的区域	氨基酸序列	公开内容
--------------	-------	------

[0326]

FVIII <sup>102-122</sup>	TVVITLKNMASHPVSLHAVGV (SEQ ID NO:740)	WO 2003/087161 中所公开的 FVIII <sup>107-121</sup> WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>100-118</sup>
FVIII <sup>246-266</sup>	AWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG (SEQ ID NO:68)	WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>253-268</sup>
FVIII <sup>474-494</sup>	GEVGDTHLLIFKNQASRPYNI (SEQ ID NO:159)	WO 2009/071886 中所公开的 FVIII <sup>475-495</sup> WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>477-495</sup>
FVIII <sup>540-560</sup>	PTKSDPRCLTRYYSFVNMER (SEQ ID NO:250)	WO 2009/071886 中所公开的 FVIII <sup>542-562</sup> WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>545-569</sup>
FVIII <sup>1401-1424</sup>	QANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLT (SEQ ID NO:344)	本发明的肽
FVIII <sup>1785-1805</sup>	EVEDNIMVTFRNQASRPYSFY (SEQ ID NO:477)	WO 2009/071886 中所公开的 FVIII <sup>1785-1805</sup> WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>1787-1805</sup>
FVIII <sup>2025-2045</sup>	LHAGMSTLFLVYSNKCQTPLG (SEQ ID NO:568)	WO 2003/087161 中所公开的 FVIII <sup>2030-2044</sup>
FVIII <sup>2160-2180</sup>	NPPIIARYIRLHPHYSIRST (SEQ ID NO:659)	WO 2009/071886 中所公开的 FVIII <sup>2158-2178</sup> 和 FVIII <sup>2161-2180</sup> , Jacquemin 等, 前述 WO 2003/087161 中所公开的 FVIII <sup>2164-2183</sup> WO/2009/095646 中所公开的 FVIII <sup>2164-2188</sup>

[0327] 应了解, 本文所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的并且根据其产生的各种修改或变化可为本领域技术人员所想到且欲包括于本申请的精神和权限以及随附权利要求的范围内。本文所引用的所有公开、专利以及专利申请据此以全文引用的方式并入本文中以用于所有目的。

## **Abstract**

The present invention is related to peptides that can be used to reduce the immune response against FVIII or to induce tolerance to human FVIII in patients with, e.g., hemophilia A. Furthermore, the peptides can be used for immunodiagnostic purposes to detect FVIII- specific CD4<sup>+</sup> T cells to monitor patients with hemophilia A during replacement therapy and during immune tolerance induction therapy.