



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105153313 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201510524808. 4

(22) 申请日 2011. 02. 10

(30) 优先权数据

10153715. 7 2010. 02. 16 EP

61/306177 2010. 02. 19 US

(62) 分案原申请数据

201180009864. 4 2011. 02. 10

(71) 申请人 诺沃—诺迪斯克有限公司

地址 丹麦鲍斯韦

(72) 发明人 G. 博尔特 K. 克杰加尔德

P. L. 诺尔比

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 黄希贵

(51) Int. Cl.

C07K 19/00(2006. 01)

A61K 38/37(2006. 01)

A61K 47/48(2006. 01)

A61P 7/04(2006. 01)

权利要求书1页 说明书31页

序列表39页

(54) 发明名称

因子 VIII 融合蛋白

(57) 摘要

本发明涉及经修饰的凝血因子。具体地讲, 本发明涉及缀合的因子 VIII 分子, 所述因子 VIII 分子与诸如抗体结合蛋白或 Fc 结构域等多肽融合。

1. 一种重组 FVIII 分子, 其中所述 FVIII 分子是融合蛋白, 其包含 FVIII 分子和融合配偶体, 其中所述融合配偶体是 Fc 受体。
2. 权利要求 1 的分子, 其中所述 Fc 受体选自 Fc γ RI 和 Fc γ RII。
3. 权利要求 2 的分子, 其中所述 Fc 受体是 Fc γ RI。
4. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述分子与侧基缀合。
5. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述侧基选自下述一种或多种: 亲水聚合物、肽和疏水性侧基。
6. 权利要求 5 的分子, 其中所述侧基是亲水性聚合物。
7. 权利要求 6 的分子, 其中所述亲水性聚合物是 PEG。
8. 权利要求 6 的分子, 其中所述亲水性聚合物是非天然存在的修饰的糖。
9. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述 FVIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。
10. 权利要求 9 的分子, 其中所述 FVIII 分子包含 Y1680F 点突变。
11. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述 Fc 受体插入 FVIII 的 B 结构域。
12. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述融合配偶体插入 FVIII 中 C2 结构域的 C 末端中。
13. 前述任一项权利要求的分子, 其中所述 FVIII 分子是 B 结构域截短的分子, 其中所述 B 结构域在截短的 B 结构域中仅包含一个 O- 聚糖。
14. 权利要求 1-13 中任一项的分子在制备用于治疗血友病的药物中的用途。
15. 一种药物组合物, 其包含权利要求 1-13 中任一项的分子。

因子 VIII 融合蛋白

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 2 月 10 日,申请号为 201180009864.4 的、发明名称和本发明相同的发明专利申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及经修饰的凝血因子。特别是,本发明涉及与非同源多肽融合的因子 VIII 分子,所述多肽例如抗体结合多肽,例如 Fc 受体或 Fc 结构域。本发明还涉及所述分子的用途以及所述分子的生产方法。

[0003] 发明背景

A 型血友病是由凝血因子 VIII (FVIII) 活性缺乏或功能障碍所致的一种遗传性出血性疾病。临床表现不在于最初的止血,即血块的形成正常发生,但血块因缺乏相继的凝血酶形成而不稳定。该病通过静脉内注射从血液中分离的或重组产生的凝血因子 FVIII 而得以治疗。

[0004] 目前的治疗推荐由传统的按需治疗向预防转变。与冯维勒布兰德因子 (von Willebrandt Factor) 结合的内源 FVIII 的循环半衰期是 12-14 小时,因此预防性治疗应一周进行数次,以使患者获得几乎无症状的生活。IV 给予对于许多人,尤其是儿童和年轻人而言伴随明显的不便和 / 或痛苦。

[0005] 在具有显著延长的循环半衰期的因子 VIII 变体的开发中已经采用多种方法。很多这类方法都涉及到将因子 VIII 与亲水性聚合物例如 PEG (聚乙二醇) 缀合在一起。

[0006] 因此本领域需要具有因子 VIII 活性的新的因子 VIII 产品,其包括一种或多种以下特征:优选在结构上是同源的,优选为安全的,优选为生物可降解的,并优选具有显著延长的循环半衰期,以减少每周给予因子 VIII 的次数。本领域同样需要用于提供这类分子的相对简单的方法。

[0007] 发明概述

本发明涉及重组因子 VIII 分子,其中所述因子 VIII 分子是融合蛋白。本发明还涉及所述分子的制备方法以及所述分子的用途。所述分子优选具有改良的循环半衰期。

[0008] 发明描述

定义

融合蛋白:融合蛋白 / 嵌合蛋白,是通过原本编码分开的蛋白质的两种以上基因结合而产生的蛋白质。该融合基因经翻译而得到具有来源于每个原有蛋白质的功能特性的单个多肽。可将本发明的因子 VIII 分子与另一多肽融合。优选地,因子 VIII 融合蛋白将具有比非融合因子 VIII 分子更长的循环半衰期。

[0009] 可将很多种融合配偶体与 FVIII 部分结合起来。这些融合配偶体可通过不同机制改变融合蛋白相对于野生型 FVIII 的性能。

[0010] 推定多种融合配偶体通过与新生儿 Fc 受体 (FcRn) 相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与 FcRn 相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是免疫球蛋白 Fc 结构域、人血清白蛋白 (hSA) 和转铁蛋白或这些蛋白的组成部分。由与推定通过与 FcRn

相互作用而延迟 FVIII 的多肽结合的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 2。尽管因为 IgG 抗体的相对长的循环半衰期而通常优选 IgG Fc 结构域,但“Fc 融合衍生物”或“Fc 融合蛋白”在本文中意指包括与可来源于任何抗体同种型的 Fc 结构域融合的本发明 FVIII 变体。Fc 结构域还可经修饰以调节某些效应子功能,例如补体结合和 / 或与某些 Fc 受体结合。FVIII 与具有与 FcRn 受体结合的能力的 Fc 结构域的融合,通常将会导致融合蛋白的循环半衰期延长(与 wt FVIII 的半衰期相比)。在 IgG Fc 结构域中 234、235 和 237 位的突变通常将会导致与 Fc γ RI 受体的结合减少,还可能导致与 Fc γ RIIa 和 Fc γ RIII 受体的结合减少。这些突变不改变与 FcRn 受体的结合,其通过内吞再循环途径而促进了长循环半衰期。优选地,本发明的融合蛋白经修饰的 IgG Fc 结构域包含一个或多个以下突变,所述突变将会分别导致对某些 Fc 受体的亲和力下降(L234A、L235E 和 G237A)以及 C1q- 介导的补体结合降低(A330S 和 P331S)。

[0011] 然而,本发明也包含这样的 FVIII 变体:其与例如与新生儿 Fc 受体的结合特性发生改变的 Fc 结构域融合。如果例如 Fc 结构域变体具有增加的与例如新生儿 Fc 受体的亲和力,可能融合蛋白的体内循环半衰期将得到进一步延长。据信调节 Fc 结构域与新生儿 Fc 受体的亲和力的人 IgG 中氨基酸置换的实例是 T250Q、M252Y、S254T、T256E、P257I、T307A、Q311I 和 M428L(残基编号按照 EU 索引)。

[0012] 推定其它融合配偶体通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 Fc 受体,例如 Fc γ RI (CD64) 或 FcRn 或这些蛋白的组成部分。由与推定通过与免疫球蛋白相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 3。

[0013] 推定某些融合配偶体通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是低密度脂蛋白受体家族 Fc 受体成员,例如低密度脂蛋白受体相关蛋白或这些蛋白的组成部分,例如重复簇 5 (CR5)、6 (CR6) 和 / 或 7 (CR7)。由与推定通过减少与清除受体的相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 4。

[0014] 推定其它融合配偶体通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是与血小板表面上的蛋白质例如 GPIIIa 结合的单链(SC)抗体。在 SC 抗体中,源自免疫球蛋白重链的多肽序列可位于源自免疫球蛋白轻链的多肽序列的 N-端。该顺序称为 HC-LC。源自免疫球蛋白重链的多肽序列也可位于源自免疫球蛋白轻链的多肽序列的 C-端。这后一种顺序称为 LC-HC。由与推定通过与血小板相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 5。

[0015] 推定一些融合配偶体通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是单链抗血清白蛋白抗体(SC 抗 HSA)和白蛋白结合多肽例如 ABD035 多肽。白蛋白结合多肽可重复若干次,例如 4 次重复,正如在 4XABD035 融合配偶体中所示。由与推定通过与血清白蛋白相互作用而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 6。

[0016] 推定其它融合配偶体通过保护(shielding)而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过保护而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是具有非疏水性氨基酸段例如序列 A

(seq A) 的多肽或充满弹性蛋白样多肽 (ELP) 例如 ELP60 的多肽。由与推定通过保护而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 7。

[0017] 推定某些融合配偶体通过调节与 vWF 的亲合力而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过调节与 vWF 的亲合力而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 FVIII 的 a3 区 (野生型人 FVIII 的氨基酸 1649-1689) 或 a3 区的部分, 因此给 FVIII 添加一个或多个额外的 a3 区。由与推定通过调节与 vWF 的亲合力而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 8。

[0018] 推定某些融合配偶体通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是生长激素结合蛋白 (GHBP)、凝血因子 IX (FIX) 部分、vWF 部分、vWF 结合蛋白、绒毛膜促性腺激素部分和凝血因子 X (FX) 部分。源自 FIX 的融合配偶体的非限制性实例是人 FIX 的氨基酸 298-342 (FIX298-342) 和人 FIX 的氨基酸 47-125 (FIX47-125)。源自 vWF 的融合配偶体的非限制性实例是人 vWF 的氨基酸 1-272 (vWF1-272)、人 vWF 的氨基酸 1-1390 (vWF1-1390) 和人 vWF 的氨基酸 497-716 (vWF497-716)。源自绒毛膜促性腺激素的融合配偶体的非限制性实例是人绒毛膜促性腺激素 β -链的 C-端 28 个氨基酸 (hCG C-端)。源自 FX 的融合配偶体的非限制性实例是人 FX 活化肽 (F10AP)。由与推定通过尚待确定的机制而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 9。

[0019] 推定某些融合配偶体通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的体内清除。推定通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的融合配偶体的非限制性实例是 FVIII 的 C2 结构域, 因此给 FVIII 添加一个或多个额外 C2 结构域。由与推定通过调节与脂质的亲合力而延迟 FVIII 的多肽连接的 FVIII 部分组成的融合蛋白的非限制性实例见表 10。

[0020] Fc 受体: Fc 受体是识别和结合抗体的 Fc 部分的细胞表面受体。根据其结构、细胞分布和与 IgG 的亲合力, 将 Fc 受体分为 3 类: Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32) 和 Fc γ RIII (CD16)。依据本发明, 与因子 VIII 分子融合的 Fc 受体可以是全长或部分长度的 Fc 受体、及其任何变体 (变体包括氨基酸取代、缺失和添加)。如果它们是部分长度的, 则应保留与抗体结合的能力。

[0021] 冯维勒布兰德因子 (vWF): vWF 是存在于血浆中并在内皮 (在怀布尔-帕拉德体中)、巨核细胞 (血小板 α -颗粒) 和内皮下结缔组织中组成性地产生的一种大的单聚/多聚糖蛋白。其主要功能是与其它蛋白、尤其是与因子 VIII 结合, 并且它在血细胞粘附于受伤部位中是重要的。

[0022] 因子 VIII 与 vWF 结合的同时在循环中失活; 因子 VIII 当未与 vWF 结合时快速降解或被清除。因此由此断定, 迄今已认为降低或消除 FVIII 的 vWF 结合能力在获取具有延长循环半衰期的因子 FVIII 变体中是非常不希望的途径。

[0023] 术语“与 vWF 的结合能力降低”在本文中意指包括因子 VIII 变体, 其中与 vWF 的结合能力降低至少 50%, 优选至少 60%、更优选至少 70%、更优选至少 80%、更优选至少 90%、和最优选约 100%。FVIII 与 vWF 的结合可通过 ELISA 样测定来检测或使用表面等离子共振来测定为与固定化 vWF 的直接结合。在因子 VIII 中负责与 vWF 结合的区域是跨越残基 1670-1684 的区域, 其公开于 EP0319315。设想涉及该区域的因子 VIII 点突变和/或缺失突变 (deletion mutant) 将会改变与 vWF 结合的能力。本发明特别优选的点突变的实例

包括包含一个或多个以下点突变的变体：Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0024] 因子 VIII 分子：FVIII/ 因子 VIII 是由肝细胞产生的一种大而复杂糖蛋白。FVIII 由 2351 个氨基酸组成，包括信号肽，并含有由同源性限定的若干不同结构域。有 3 个 A 结构域、1 个独特的 B 结构域和 2 个 C 结构域。结构域的顺序可列为 NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH。FVIII 在血浆内以在 B-A3 边界分开的 2 条链而循环。这两条链通过二价金属离子结合而连接。A1-A2-B 链称为重链 (HC)，而 A3-C1-C2 称为轻链 (LC)。

[0025] 内源因子 VIII 分子在体内作为具有不同大小的 B 结构域的分子库而循环。在体内可能发生的是对 B 结构域的逐步酶切除，产生具有不同大小的 B 结构域的分子库。通常认为在 740 位的切割 (B 结构域的最后部分正是因此而被切除) 的发生与凝血酶激活相关。然而，这并不能排除因子 VIII 变体 (其中例如在 740 位的切割位点已经受损) 可具有活性。

[0026] 本文所用的“因子 VIII”或“FVIII”是指作为内源性凝血途径的成员并对凝血而言至关重要的人血浆糖蛋白。“天然 FVIII”是如 SEQ ID NO. 1 (氨基酸 1-2332) 所示的全长人 FVIII 分子。B 结构域跨越 SEQ ID NO 1 中的氨基酸 741-1648

SEQ ID NO 1:

ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDARFPFPRVPKSFNFNTSVVYKKTLFVEFT
DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
VNRSPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIFLTAOTLL
MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
DDDNPSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLPDDRYSYKSQYLNNGPQRIGR
KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIFKNQASRPYNIYPHGIDVRP
LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLI
GPLLICYSVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA
SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPF
SGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKN
NAIEPRSFSONSRHPSTROKQFNATTIPENDIEKTDPWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQ

SPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSGDMVFTPESSGLQL
RLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDIT
LFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHG
PALLTKDNALFKVVISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDFEKKVTP
LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPES
ARWIQORTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVESQNFLEKKNVVGKGEFTKDVGLKE
MVFPSSRNLFNLNLDNLHENNTHNQEKQIEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGTKNFMKNLF
LLSTRQNVESGYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVE
KYACTTRISPNTSQQNFTVQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTL
TQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHL
PAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKNLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVEN
TVLPKPDLPKTSKGVELLPKVHIYQKDLFTTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGAIKWNEAN
RPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFAKKKDTILSL
NACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPVVKRHQREITRTTLQSDQEEID
YDDTISVEMKKEDFDIYDEDENGSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQS
GSVPQFKKVVFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFY
SSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKD
VHSGUGPLLVTHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME
DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEE
YKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHI
RDFQITASGOYQGWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFS
SLYISQFIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIR
STLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFTWSPSKARLHLQGRSNAW
RPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGK
VKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

[0027] 本发明的因子 VIII 分子可以是 B 结构域截短的因子 FVIII 分子,其中剩余结构域基本对应于 SEQ ID NO 1 中氨基酸编号 1-740 和 1649-2332 所示序列,尽管在残基 1670-1684 之间的 vWF 结合区内可能也有例如一个或多个改变。然而,本发明的 B 结构域截短的分子可与 SEQ ID NO 1 所示序列具有微小差异,意即剩余结构域(即 3 个 A 结构域和 2 个 C 结构域)与 SEQ ID NO 1 所示氨基酸序列(氨基酸 1-740 和 1649-2332)可具有微小差异,例如 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸差异或约 1%、2%、3%、4% 或 5% 差异,这是因为可引入突变以降低例如 vWF 结合能力这一事实。此外,可能在分子的其它位置导入氨基酸修饰(取代、缺失等),以改变因子 VIII 与多种其它组分(例如 LRP、多种受体、其它凝血因子、细胞表面)的结合能力,引入和/或消除糖基化位点等。

[0028] 本发明的因子 VIII 分子具有因子 VIII 活性,意即以下能力:在凝血级联中以与 FVIII 功能类似或等同的方式起作用,通过与被激活的血小板上的 FIXa 相互作用而诱导 FXa 的形成,并支持血块的形成。该活性可通过本领域熟知的技术在体外评估,所述技术为例如凝血分析、内源凝血酶潜在性分析等。本发明的因子 VIII 分子具有 FVIII 活性,其为天然人 FVIII 活性的至少约 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、和 100% 或甚至超过 100%。

[0029] B结构域：因子 VIII 中的 B 结构域跨越 SEQ ID NO 1 的氨基酸 741-1648。B 结构域在若干不同位点被切割，在循环血浆 FVIII 分子中产生大的异质性。高度糖基化的 B 结构域的准确功能尚未知晓。已经知道的是该结构域对于凝血级联中的 FVIII 活性而言并非必要。这种明显的功能缺乏得到以下事实支持：B 结构域缺失的 / 截短的 FVIII 看来具有与在全长天然 FVIII 中所见的相同的体内性能。话虽如此，据显示 B 结构域可减少与细胞膜的缔合，至少在无血清条件下是如此。

[0030] B结构域截短的 / 缺失的因子 VIII 分子：将内源全长 FVIII 合成为单链前体分子。分泌之前，将前体切割成重链和轻链。可由 2 种不同策略产生重组 B 结构域缺失的 FVIII。将无 B 结构域的重链以及轻链分别合成为两种不同多肽链（两链策略）或者将 B 结构域缺失的 FVIII 合成为单条前体多肽链（单链策略），其按照与全长 FVIII 前体相同的方式切割为重链和轻链。

[0031] 在 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽中，重链和轻链部分通常被接头间隔开来。为了尽量减小在 B 结构域缺失的 FVIII 中引入免疫原性表位的风险，接头序列优选源自 FVIII B 结构域。至少，接头必须包含蛋白酶识别位点，所述酶将 B 结构域缺失的 FVIII 前体多肽分离为重链和轻链。在全长 FVIII 的 B 结构域中，氨基酸 1644-1648 构成该识别位点。在 B 结构域缺失的 FVIII 激活时导致接头去除的凝血酶位点位于重链上。因此，接头的大小和氨基酸序列不大可能影响其经由凝血酶激活而从剩余 FVIII 分子上切除。B 结构域的缺失对于 FVIII 的产生是有利的。然而，B 结构域的部分可包括在接头中而不降低产率。B 结构域对产率的负面效应并不归因于 B 结构域的任何特定尺寸或序列。

[0032] 截短的 B 结构域可含有若干 O- 糖基化位点。然而，依据一个优选的实施方案，所述分子在截短的 B 结构域中包含仅 1 个、备选 2、3 或 4 个 O 联寡糖。

[0033] 依据一个优选的实施方案，截短的 B 结构域包含仅 1 个可能的 O- 糖基化位点并且侧链例如 PEG 或白蛋白结合剂与该 O- 糖基化位点共价缀合。

[0034] 可将在本发明的 B 结构域截短的分子中的 O 联寡糖连接到 O- 糖基化位点，所述位点通过重组方式和 / 或通过经由 B 结构域截短而将“隐藏的”O- 糖基化位点暴露而人工产生。在这两种情况下，可通过设计 B 结构域截短的因子 VIII 的氨基酸序列并随后对所述氨基酸序列进行计算机 (*in silico*) 分析，预测截短的 B 结构域中 O- 糖基化位点的概率，从而制备所述分子。可在合适宿主细胞中合成有相对高概率具有所述糖基化位点的分子，然后分析糖基化模式并随后选择在截短的 B 结构域中具有 O 联糖基化的分子。

[0035] 所述因子 VIII 分子也含有大量 N 联寡糖并且它们每个都可同样作为用于连接疏水性侧基的锚。

[0036] 用于产生本发明的重组因子 VIII 融合蛋白的合适宿主细胞优选是哺乳动物来源的，以确保所述分子被糖基化。在实施本发明时，所述细胞是哺乳动物细胞，更优选已确立的哺乳动物细胞系，包括但不限于 CHO、COS-1、幼仓鼠肾 (BHK) 和 HEK293 细胞系。其它合适的细胞系包括但不限于大鼠 Hep I、大鼠 Hep II、TCMK、人肺、DUKX 细胞 (CHO 细胞系)。还可使用的是 3T3 细胞、Namalwa 细胞、骨髓瘤和骨髓瘤与其它细胞的融合物。在某些实施方案中，所述细胞可以是突变的或重组的细胞，例如与其所来源的细胞类型相比表达在质量或数量上不同的酶谱的细胞，所述酶催化蛋白质的翻译后修饰（例如糖基化酶例如糖基转移酶和 / 或糖苷酶，或加工酶例如前肽）。DUKX 细胞 (CHO 细胞系) 是特别优选的。

[0037] 目前优选的细胞是 HEK293、COS、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、幼仓鼠肾 (BHK) 和骨髓瘤细胞, 尤其是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0038] 在 wt FVIII 分子中 B 结构域的长度为约 908 个氨基酸。在本发明分子中截短的 B 结构域的长度可在约 10- 约 800 个氨基酸的范围内变化, 例如约 10 个氨基酸 - 约 700 个氨基酸, 例如约 12-500 个氨基酸、12-400 个氨基酸、12-300 个氨基酸、12-200 个氨基酸、15-100 个氨基酸、15-75 个氨基酸、15-50 个氨基酸、15-45 个氨基酸、20-45 个氨基酸、20-40 个氨基酸、或 20-30 个氨基酸。所述截短的 B 结构域可包含重链和 / 或轻链的片段和 / 或 wt FVIII 分子中不存在的人工导入序列。术语“B 结构域截短的”和“B 结构域缺失的”在本文中可互换使用。

[0039] 改良的循环半衰期: 与野生型因子 VIII 分子相比, 本发明的分子具有改变的循环半衰期, 优选增加的循环半衰期。循环半衰期优选增加至少 10%, 优选至少 15%, 优选至少 20%, 优选至少 25%, 优选至少 30%, 优选至少 35%, 优选至少 40%, 优选至少 45%, 优选至少 50%, 优选至少 55%, 优选至少 60%, 优选至少 65%, 优选至少 70%, 优选至少 75%, 优选至少 80%, 优选至少 85%, 优选至少 90%, 优选至少 95%, 优选至少 100%, 更优选至少 125%, 更优选至少 150%, 更优选至少 175%, 更优选至少 200%, 和最优选至少 250% 或 300%。甚至更优选地, 所述分子具有的循环半衰期增加至少 400%, 500%, 600%, 或甚至 700%。

[0040] 亲水性聚合物: 本发明的侧基优选是非天然存在的亲水性聚合物, 其包含至少一个非天然存在的聚合部分。在另一实例中, 非天然存在的修饰基团是经修饰的碳水化合物。

[0041] 示例性的本发明亲水性聚合物包括水溶性聚合物, 其可以是直链或支链并且可包含一个或多个独立选择的聚合部分, 例如聚(亚烷基二醇)及其衍生物。本发明的聚合修饰基团可包括水溶性聚合物, 例如聚(乙二醇)及其衍生物(PEG, m-PEG)、聚(丙二醇)及其衍生物(PPG, m-PPG)等。

[0042] 本发明水溶性聚合物的聚合物主链可以是聚(乙二醇)(即 PEG)。本发明相关的术语 PEG 包括任何形式的聚(乙二醇), 包括烷氧基 PEG、双功能 PEG、多臂 PEG、分叉 PEG、分支 PEG、垂悬 PEG (即具有挂在聚合物主链上的一个或多个官能团的 PEG 或相关聚合物)、或其中具有可降解键的 PEG。

[0043] 聚合物主链可以是直链或支链的。支链聚合物主链是本领域公知的。通常, 支链聚合物具有中央分支核心部分和与该中央分支核心连接的多个直链聚合物链。常使用支链形式的 PEG, 其可通过将氧化乙烯加成到不同多元醇例如甘油、季戊四醇和山梨醇中而制备。中央分支部分也可源自若干氨基酸, 例如赖氨酸或半胱氨酸。在一个实例中, 支链聚(乙二醇)可以通式表示为 $R(-\text{PEG}-\text{OH})_m$, 其中 R 代表核心部分, 例如甘油或季戊四醇, m 代表臂的数目。多臂 PEG 分子, 例如美国专利号 5, 932, 462 (其通过引用全部结合到本文中) 中描述的那些, 也可用作聚合物主链。

[0044] 许多其它聚合物也适合本发明。非肽和水溶性的聚合物主链特别可用于本发明。合适聚合物的实例包括但不限于其它聚(亚烷基二醇)、例如聚(丙二醇) (“PPG”)、乙二醇和丙二醇等的共聚物、聚(氧乙基化多元醇)、聚(烯醇(olefinic alcohol))、聚(乙烯吡咯烷酮)、聚(羟丙基甲基丙烯酰胺)、聚([α]-羟基酸)、聚(乙醇醇)、聚磷腈、聚噁唑啉、聚(N-丙烯酰吗啉)(例如美国专利号 5, 629, 384 (其通过引用全部结合到本文中) 中描述的), 及其共聚物、三元共聚物和混合物。

[0045] 尽管所述聚合物主链每条链的分子量可变化,但典型的范围为约 100 Da- 约 160,000 Da,例如约 5,000 Da- 约 100,000 Da。更具体地讲,每种本发明缀合的亲水性聚合物的大小可在以下范围内变化:约 500 Da- 约 80,000 Da,例如约 1000 Da- 约 80,000 Da;约 2000 Da- 约 70,000 Da;约 5000- 约 70,000 Da;约 5000- 约 60,000 Da;约 10,000- 约 70,000 Da;约 20,000- 约 60,000 Da;约 30,000- 约 60,000 Da;约 30,000- 约 50,000 Da;或约 30,000- 约 40,000 Da。应当知道,这些大小代表估计值,而并非准确测量值。依据一个优选的实施方案,将本发明的分子与亲水性聚合物的异质群体缀合,所述聚合物为例如大小如下的 PEG:例如 10,000、40,000 或 80,000 Da +/- 约 5000、约 4000、约 3000、约 2000 或约 1000 Da。

[0046] 侧链/侧基:也可将本发明的因子 VIII 分子与并非亲水性聚合物的侧基缀合。本发明的侧链可以例如选自以下列出的一种或多种:脂肪酸及其衍生物(有时也称为“白蛋白结合剂”)、肽等。本发明的疏水性侧基优选是生物可降解的。此外,可有不只一个疏水性侧基与单个因子 VIII 分子缀合,例如有 2、3、4、5、6、7、8、9、10 个或更多个。此外由此得出还可将本发明的因子 VIII 分子与一个或多个疏水性侧基以及一个或多个疏水性侧基、肽侧基等缀合。

[0047] 因此,单个本发明的因子 VIII 分子可包含侧基,例如亲水性和疏水性/肽类侧基。然而,将该分子与不同类型侧基缀合伴随着另外的努力,因此这种解决方案可变得在实践中相对不实用。本发明的分子因此优选仅包含 1 种侧链(例如亲水性侧链/疏水性侧链)。

[0048] 然而,迄今为止,并不认为因子 VIII 同疏水性侧基的缀合是同亲水性基团的缀合的具有吸引力的备选。一种解释可能是预期到需要采用使用有机溶剂的费力和/或苛刻的化学方法。另一种解释可能是预期通常相对小的疏水性分子不能有效地将缀合的(大)因子 VIII 分子与例如白蛋白结合并因此可能保护分子免于清除。

[0049] 白蛋白结合剂缀合物

已知可通过使用白蛋白结合侧链来改善这种蛋白质的体内性能。这种侧链或白蛋白结合剂可在给予之前连接到所述蛋白质上并且例如可以在体内稳定所述蛋白质或改进或延长所述蛋白质的体内半衰期。

[0050] 因此白蛋白结合剂可促进衍生物在血流中循环。白蛋白结合剂可具有延长或延迟与之结合的蛋白质的作用时间的效果,这是因为以下事实:肽衍生物和白蛋白的复合物仅缓慢崩解以释放活性药物成分。因此,优选的取代基或侧链作为整体可称为白蛋白结合部分。

[0051] 白蛋白结合剂(白蛋白结合部分)可包含与白蛋白结合以及因此在血流中循环的延长特别相关的部分,所述部分因此可称为延长部分。延长部分优选位于白蛋白结合部分相比于其与肽的连接点的相反一端或附近。

[0052] 在一个优选的实施方案中,白蛋白结合剂是或包含能够与白蛋白形成非共价复合物的侧链。白蛋白结合剂可与白蛋白非共价结合和/或可逆结合。白蛋白结合剂可与白蛋白特异性结合。根据下述方法可以清楚的是,白蛋白结合剂可结合到环糊精。白蛋白结合剂可与环糊精非共价结合和/或可逆结合。白蛋白结合剂可与环糊精特异性结合。

[0053] 本文所述的白蛋白结合剂通常是疏水性基团。

[0054] 白蛋白结合部分的其它部分,即介于延长部分和与肽的连接点之间的部分,可称

为接头部分、接头、间隔物等。然而,这类接头的存在是任选的,因此白蛋白结合部分可与延长部分相同。

[0055] 在特别的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分是亲脂的,和/或在生理 pH (7.4) 下带负电荷。

[0056] 白蛋白结合部分和/或延长部分可通过缀合化学例如烷基化、酰化或形成酰胺而与肽的氨基共价连接;或通过例如酯化、烷基化、腈化而与羟基共价连接。

[0057] 在一个优选的实施方案中,白蛋白结合部分和/或延长部分的活性酯在形成酰胺键的条件下与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基共价连接(该过程称为酰化)。

[0058] 除非另有说明,否则当谈及蛋白质酰化时,应当理解为氨基与糖蛋白上的唾液酸残基连接。

[0059] 对于本发明的目的,术语“白蛋白结合部分”、“延长部分”和“接头”包括这些分子的未反应形式以及反应形式。是否意指一种形式或其它形式,根据其中使用术语的上下文是清楚的。

[0060] 白蛋白结合部分可以是或可包括脂肪酸或脂肪二酸或其衍生物或其任一种。

[0061] 术语“脂肪酸”是指具有 4-28 个碳原子、例如 16 个碳原子的脂族一羧酸。其优选是无支链的,和/或偶数个的,并且它可以是饱和或不饱和的。

[0062] 术语“脂肪二酸”是指如上定义的、但在 ω 位置上具有额外羧酸基团的脂肪酸。因此,脂肪二酸是二羧酸。

[0063] 命名按照本领域常用的命名,例如 $-\text{COOH}$ 以及 $\text{HOOC}-$, 是指羧基; $-\text{C}_6\text{H}_4-$ 是亚苯基; $-\text{CO}-$ 以及 $-\text{OC}-$, 是指羰基 ($\text{O}=\text{C}<$); 和 $\text{C}_6\text{H}_5-\text{O}-$ 是指苯氧基。

[0064] 在一个优选的实施方案中,所述接头部分,如果存在的话,具有 2-80 个 C 原子、优选 5-70 个 C 原子。在额外优选的实施方案中,所述接头部分,如果存在的话,具有 4-20 个杂原子,优选 2-40 个杂原子,更优选 3-30 个杂原子。杂原子的特别优选的实例是 N 原子和 O 原子。H 原子不是杂原子。

[0065] 在另一个实施方案中,所述接头包含至少一个 OEG 分子、和/或至少一个谷氨酸残基,或相应的基团(OEG 是指 8-氨基-3,6-二氧杂辛酸,即以下基团: $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-$)。

[0066] 在一个优选的实施方案中,所述接头部分包含通过酰胺键与唾液酸残基连接的二羧基残基。在优选的实例中,所述二羧基残基具有 2-30 个 C 原子,优选 4-20 个 C 原子,更优选 4-10 个 C 原子。在另外的优选实例中,所述二羧基残基具有 0-10 个杂原子,优选 0-5 个杂原子。

[0067] 在另一个优选的实例中,所述接头部分包含同时含有氨基和远端羧基的基团,所述基团通过其远端羧基经由酰胺键与唾液酸残基连接。在一个优选的实施方案中,该基团是 OEG 基团。

[0068] 氨基酸谷氨酸(Glu)包含 2 个羧酸基团。其 γ -羧基优选用于与唾液酸残基或唾液酸衍生物的氨基、或与 OEG 分子的氨基(如果有的话)、或与另一 Glu 残基的氨基(如果有的话)形成酰胺键。Glu 的氨基进而与延长部分的羧基、或与 OEG 分子的羧基(如果有的话)、或与另一 Glu 的 γ -羧基(如果有的话)形成酰胺键。这种包含 Glu 的方式偶尔简称为“ γ -Glu”。

[0069] 不受理论的束缚,设想之所以将疏水性侧基与具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接,而不是将这类侧基与具有正常 vWF 结合能力的因子 VIII 分子连接可能有利的原因在于:侧基的相对大小在大的因子 VIII/vWF 复合物中是相对小的。假定相对大的侧基在保护游离因子 VIII 不被清除中起更有效的作用。还假定 FVIII 的半衰期与 vWF 的相关。与 vWF 结合能力降低的 FVIII 分子最有可能具有暴露的清除表位,所述清除表位通常已被 vWF 保护。因而假定通过连接侧基,该“清除保护”可被恢复。在其它情况下,侧基例如抗体片段的连接可通过例如将所述分子与具有相对长循环半衰期的蛋白、细胞或血小板连接而起作用。

[0070] 0-联寡糖:N-聚糖和 O-聚糖都通过产生蛋白质的细胞而与该蛋白连接。当初生蛋白质从核糖体向内质网移动时,细胞的 N-糖基化机构识别氨基酸链中的 N-糖基化信号(N-X-S/T 基序)并使之糖基化(Kiely 等,1976;Glabe 等,1980)。

[0071] 同样,O-聚糖连接到氨基酸链中的特异性 O-糖基化位点,但触发 O-糖基化的基序与 N-糖基化信号相比要异质得多,并且我们对氨基酸序列中 O-糖基化位点的预测能力尚不充分(Julenius 等,2004)。因此,人工 O-糖基化位点的构建有一些不确定性。

[0072] 疏水性侧基的连接:可使用化学方法进行因子 FVIII 分子与疏水性侧基的缀合。然而,使用酶促方法具有很多潜在优势。根据本发明优选的酶促方法,可经化学方法制备[疏水性延长基团]-唾液酸基-CMP 底物。使用唾液酸转移酶,可经酶促方法将该底物转移到因子 FVIII 上存在的聚糖上。本发明的发明人已经出乎意料地证明无需添加任何有机溶剂就可进行这种酶促方法。使用有机溶剂有很多的不利条件,例如丧失生物活性、环境问题、确保完全除去有机溶剂所采取的额外步骤等。也有可能可避免加入环糊精,环糊精是一种去垢剂,也可造成生物功能的损失。在酶促缀合过程中,添加甘油,例如 5-30% 甘油,优选 10-20% 甘油,可能是有利的。甘油的存在似乎例如在冷冻/融解过程中稳定因子 VIII 分子,并且它还可防止形成因子 VIII 结晶。因此,在缀合过程完成之后,无需除去酶促缀合期间所存在的甘油。

[0073] 唾液酸转移酶:唾液酸转移酶是将唾液酸转移到初生寡糖上的酶。每种唾液酸转移酶对特定的糖底物具有特异性。唾液酸转移酶将唾液酸添加到唾液酸化糖脂(神经节苷脂)的末端部分或添加到糖蛋白的 N-联糖链或 O-联糖链上。存在大约 20 种不同唾液酸转移酶,其可根据它们所作用的受体结构和它们所形成的糖键类型而区分。本发明优选的唾液酸转移酶是 ST3Gal-I(对 O-聚糖具有特异性)和 ST3Gal-III(对 N-聚糖具有特异性)。因此有可能通过例如选择特异性唾液酸转移酶和/或改造具有特定糖基化模式的因子 VIII 分子,对本发明的缀合的因子 VIII 分子的结构进行改造。

[0074] 药物组合物:药物组合物在本文优选意指包括包含本发明因子 VIII 分子的适于胃肠外给药用的组合物,例如即用型无菌含水组合物或可在例如水或含水平冲液中重构的干燥的无菌组合物。本发明的组合物可包含多种药学上可接受的赋形剂、稳定剂等。

[0075] 在这类组合物中的额外成分可包括润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油性溶媒、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白)和两性离子(例如氨基酸,例如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。这类额外成分当然不应对本发明药物制剂的总体稳定性有不利影响。胃肠外给药可通过使用注射器任选笔样注射器经由皮下、肌内、腹膜内或静脉内注射而进行。或者,胃肠外给药可通过输注泵的方

式而进行。进一步的选项是组合物,其可以是以鼻或肺部喷雾的形式给予 FVIII 化合物的溶液剂或混悬剂。作为再一个进一步的选项,含有本发明 FVIII 化合物的药物组合物也可适于透皮给药,例如通过无针注射或贴剂(任选离子电渗贴剂),或透黏膜给药例如口腔给药。

[0076] 本文所用的术语“治疗”是指对有需要的任何人类或其它动物受试者的医学治疗。预期所述受试者已经历医师的体检,所述医师已经做出试验性或确定性诊断,表明使用所述特定治疗对所述人类或其它动物受试者的健康而言是有益的。所述治疗的时机和目的可依据受试者的健康现状而因不同个体而异。因此,所述治疗可以是预防性的、治标的、针对症状的和/或治愈性的。

[0077] 第一方面,本发明涉及重组因子 VIII 分子,其中所述因子 VIII 分子是包含因子 VIII 分子和融合配偶体的融合蛋白。在第一实施方案中,所述融合配偶体置换了因子 VIII 分子的 a3 结构域。因此,因子 FVIII 的小的 a3 结构域可被融合配偶体全部或部分置换。在第二实施方案中,所述融合配偶体插入到因子 VIII 的 B 结构域中。B 结构域可以是全长 B 结构域,但在一个优选的实施方案中,B 结构域是显著截短的。因此在融合配偶体的 N-末端和 C-末端有至少 3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸来自 B 结构域。在另一个优选的实施方案中,所述融合配偶体插入到或位于因子 FVIII 的 C2 结构域的 C-末端。

[0078] 在第三实施方案中,本发明的因子 VIII 分子与抗体结合分子例如 Fc 受体融合。抗体结合分子的实例列于下表中。在第四实施方案中,因子 VIII 分子与具有与人血清白蛋白结合的能力的分子融合。在另一个实施方案中,因子 VIII 与转铁蛋白融合。其实例也在下文提供。在第五实施方案中,因子 VIII 分子与具有与血小板结合的能力的分子融合,这类分子的具体实例同样在下文提供。在再一个实施方案中,因子 VIII 分子与具有与因子 VIII 清除受体结合的能力的分子融合。

[0079] 在第六实施方案中,本发明的因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。优选地,这类因子 VIII 分子在跨越 SEQ ID NO1 的氨基酸 1670-1684 的区域内包含突变(氨基酸的取代、缺失或添加)。最优选地,这类因子 VIII 分子包含一个以下点突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0080] 在第七实施方案中,本发明的分子与侧基缀合。该侧基可选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。优选地,侧基是 PEG 基团、脂肪酸衍生物或多肽。优选地,使用酶促方法将这类侧基连接到分子上,所述方法为例如 W00331464 中所公开的技术,其中 O- 联聚糖和/或 N- 联聚糖用作接头。

[0081] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体置换因子 VIII 分子的 A3 结构域。

[0082] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和/或增加的对新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和/或 O- 联聚糖连接到融合蛋白。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和/或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏

水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0083] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体插入到因子 VIII 的 B 结构域中。

[0084] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和 / 或增加对的新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖与融合蛋白连接。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中所述 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0085] 本发明的另一方面涉及与融合配偶体融合的 FVIII 分子,其中所述融合配偶体插入到因子 FVIII 的 C2 结构域的 C- 末端。

[0086] 在一个实施方案中,所述融合配偶体是白蛋白。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 受体。在另一个实施方案中,所述 Fc 受体是 Fc γ RI。在另一个实施方案中,所述融合配偶体是 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述 Fc 结构域是具有降低的效应子功能和 / 或增加对的新生儿 Fc 受体的亲和力的突变 Fc 结构域。在另一个实施方案中,所述融合蛋白与侧基缀合。在另一个实施方案中,所述侧基通过 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖连接到融合蛋白。在另一个实施方案中,所述侧基通过唾液酸连接到 N- 联聚糖和 / 或 O- 联聚糖。在另一个实施方案中,所述侧基选自以下列出的一种或多种:亲水性聚合物、肽和疏水性侧基。在另一个实施方案中,所述 FVIII 分子是 B 结构域截短分子,其中所述 B 结构域包含 SEQ ID NO 2 所示的序列。在另一个实施方案中,所述融合蛋白在包含 SEQ ID NO 2 所示氨基酸序列的截短的 B 结构域中包含与 O- 联聚糖连接的侧基。在另一个实施方案中,因子 VIII 分子具有降低的 vWF 结合能力。在另一个实施方案中,具有降低的 vWF 结合能力的因子 VIII 分子包含选自以下列出的突变:Y1680F、Y1680R、Y1680N、和 E1682T、和 Y1680C。

[0087] 另一方面涉及本发明分子的制备方法,其中所述方法包括在合适条件下温育编码所述分子的宿主细胞。因此,本发明也涉及包含编码本发明分子的核酸序列的核酸分子以及表达载体和宿主细胞。经由这类方法获取的或可经由这类方法获取的分子同样是本发明的一个方面。

[0088] 另一方面涉及本发明分子作为药物的用途。

[0089] 另一方面涉及本发明分子用于治疗血友病、优选 A 型血友病的用途。

[0090] 另一方面涉及包含本发明的分子和任选一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0091] 本发明的另一方面涉及血友病的治疗方法,所述方法包括给予有需要的患者治疗有效量的本发明分子。

实施例

[0092] 实施例 1

FVIII 构架和融合配偶体

本发明的融合蛋白由与来自另一蛋白的多肽(融合配偶体)连接的 FVIII 蛋白(FVIII 部分)组成。

[0093] 融合蛋白的 FVIII 部分可以是具有 FVIII 活性的任何蛋白。FVIII 部分可以是 B 结构域缺失的/截短的(BDD) FVIII 蛋白,其中 FVIII B 结构域部分已从该蛋白上切除。可构成融合蛋白的 FVIII 部分的 FVIII 构架的非限制性实例见表 1。F8-500 是一种 BDD 人 FVIII 蛋白。从 N-端开始,F8-500 由 FVIII 信号肽(氨基酸 -19 至 -1)、后接无 B 结构域的 FVIII HC(氨基酸 1-740)、21 个氨基酸的接头(SFSQNSRHPSQNPPVLKRHR)(SEQ ID NO 2)和 FVIII LC(野生型人 FVIII 的氨基酸 1649-2332)组成。21 个氨基酸的接头序列源自 FVIII 的 B 结构域并由全长野生型人 FVIII 的氨基酸 741-750 和 1638-1648 组成。

[0094] F8-500- Δ a3 由无 a3 区的 F8-500 组成。在 F8-500- Δ a3 中,将野生型人 FVIII 的氨基酸 1647-1687 从 F8-500 中除去。因此,氨基酸 1645-1648 处的弗林蛋白酶位点已被破坏。然而,合并的弗林蛋白酶和凝血酶位点是由在 F8-500- Δ a 中的 R1645-H1646-P1688-R1689 氨基酸段所产生的。a3 区对于 FVIII 与 vWF 的结合而言是重要的并因此与野生型 FVIII 相比,降低了 F8-500- Δ a3 对 vWF 的亲合力。

[0095] F8-500-His 由具有插入到 F8-500 接头的 His 标签的 F8-500 组成。因此 F8-500-His 的接头序列是 SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR(SEQ ID NO 3)。

[0096] F8-500- Δ a3-His 由无 a3 区、但具有插入到 F8-500 接头的 His 标签的 F8-500 组成。因此,在 F8-500- Δ a3-His 中,野生型人 FVIII 氨基酸 1647-1687 已从 F8-500 中除去并且接头序列是 SFSQNSRHPSHHHHHSQNPPVLKRHR(SEQ ID NO 4)。

[0097] F8-500-Y1680F 和 F8-500-Y1680C 由 F8-500 组成,其中全长野生型人 FVIII 的氨基酸 1680 已从酪氨酸分别变为苯丙氨酸和半胱氨酸。这两个氨基酸置换降低了 FVIII 对 vWF 的亲合力。此外,Y1680C 氨基酸置换引入游离半胱氨酸,其可用作将延长部分与融合蛋白缀合的柄(handle)。

[0098] 可将融合配偶体与融合蛋白的 FVIII 部分的若干位置连接。用于连接融合配偶体的 FVIII 上的位置的非限制性实例是在介于 FVIII HC 和 LC 之间的 B 结构域或 B 结构域衍生的接头中的位置,在 a3 的位置,和在 FVIII LC 的 C-端。

[0099] 实施例 2

编码 FVIII 构架和融合蛋白的表达载体的构建

FVIII 和融合配偶体间的融合都涉及用于扩增融合配偶体的 PCR。将限制位点加入到所用的 PCR 引物的末端。限制酶用于克隆融合配偶体 cDNA 或合成 DNA 为 FVIII cDNA。

[0100] 在 F8-500 的 B 结构域中的融合发生在 aa750 和 aa1638 之间。在 B 结构域内或其

侧翼的限制位点 AvrII、NruI、AgeI 和 MluI 用于插入编码融合配偶体的 DNA。

[0101] 对于在 FVIII 轻链羧基端的融合,修饰 F8-500 编码构建体。通过定点诱变消除内部 BamHI 位点 (aa 604-606) 并将编码柔性 (GGGS)₆接头的 DNA 插入到编码区 3'。将一个新的 BamHI 位点引入编码接头的 DNA 的 3' 端,以便于将 C- 端融合配偶体克隆到 BamHI 位点和 NotI 位点之间。然后,插入融合配偶体 DNA。来自该构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -(GGGS)₆-X。类似于 (GGGS)₆ 接头,将最小 GS- 接头 (BamHI 限制位点) 插入到 F8-500 编码区 3' 端。BamHI 限制位点 (GGATCC) 形成 GS (甘氨酸-丝氨酸) 的两个密码子。来自该构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -GS-X。没有任何接头的情况下与 F8-500 的 C- 端的融合如下进行:通过用延伸引物 PCR 扩增融合物,所述延伸引物在 5' 端带有 F8-500 编码区最后的 109 bp 和在 PCR 产物的 3' 端具有 NotI 限制位点。XbaI 限制位点存在于离 F8-500 终止密码子的 104-109 bp 处。XbaI 限制酶和 NotI 限制酶用于克隆无接头的融合配偶体。来自后面这些构建体的融合蛋白在表 2-12 中称为 F8-500-C2- 连接的 -X。

[0102] 为了在 a3 位置插入融合配偶体编码 DNA 并由此在编码蛋白中用融合配偶体置换 a3,将 SacII 限制位点引入 a3 编码区的 3'。因此,融合配偶体编码 DNA 可通过插入 AgeI 位点和 SacII 位点之间或者 AvrII 位点和 SacII 位点之间而引入。

[0103] hFc (SEQ ID NO 5)

```
htccpcpapeaegepsvfifppkpkdtimisrtpcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqyqs  
tyrvsvitvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepcqvyltppsrdeitknqvsitclvkgfypsdiavewesng  
qpennyktippvldsdgsfflyskitvdksrwqcggrvfscsvmhcalnhhtqksislspgk
```

mFc (SEQ ID NO 6)

```
kpcppckcpapnaegepsvfifppkikdvimislpmvctcvvvdvseddpdvqiswfvnnvevitaqtqthredyq  
stlrsvsalpihqdwmsgkefkckvnnkalpapiertiskpkgsvrappqvylpppeeemtkqvltlcmvtdfmpedlyvewt  
nngktelnykntepvldsdgsyfmysklrvekknwvemsyscsvgheglhnhhtkfsrtpgk
```

人血清白蛋白 (HSA) (SEQ ID NO 7)

```
Dahksevahrfdlgeenfkalvliafaqylqqcpfedhvkivnevtefaktcvadesaencdkslhtlfgdklctvatlr  
etygemadccakqepemecflqhkdnpnlprlvpevdvmctafidneetfikkylieiarnhpyfyapeliffakrykaafec  
cqaadkaadlpkdelrdegkassakqrikcaslqkfgerafkawavarlsqrtpkaefaevsklvtdltkvhtecchgdllcadd  
radiakyicenqdsisskikeccekpilekshciaevendempadipslaadfveskdvcnryaeakdvfgmflyeyarnhpdv  
svvllrlaktyettlekccaaadphcyakvdefkpiveepqnlikqncelfeqigeykfqnailvrytkkvpqvstptfvevsmigk  
vgskcckhpeakmpcaedylsvvinqicvihektpvsvdrvtcceslvnmpcfsalevdelyvpkefnatftfhadictiseker  
qikkqtalvelvkhkpkatkeqlkavmddfaafvekckaddketcfaeegkkivaasqaalg!
```

转铁蛋白 (SEQ ID NO 8)

VPDKTVRWCAVSEHEATKCQSFDRDHMKSVIPSDGPSVACVKKASYLDCIRAIANE
 ADAVTLDAGLVYDAYLAPNNLKPVVAEFYGSKEDEPQTFYAVAVVKKDSGFMNQLRGKKS
 CHTGLGRSAGWNIPIGLLYCDLPEPRKPLEKAVANFFSGSCAPCADGTDFPQLCQLCPGCG
 CSTLNQYFGYSGAFKCLKDGAGDVAFVKHSTIFENLANKADRDQYELLCLDNTRKPVDEYK
 DCHLAQVPSHTTVVARSMG GKEDLIWELLNQAQEHFGKDKSKEFQLFSSPHG-
 KDLLFKDSAAGFLKVPPRMDAKMYL
 GYEVYTAIRNLREGTCPEAPTDECKPVKWCALSHHERLKCDEWSVNSVGKIECVSAETTED
 CIAKIMNGEADAMSLDGGFVYIAGKCGLVPVLAENYNKSDNCEDTPEAGYFAVAVVKKSAS
 DLTWDNLKGKKSCHTAVGRTAGWNIPMGLLYNKINHCRFDEFFSEGCAFGSKKDSLCKLC
 MGSGNLNCEPNNKEGYGYTGAFRCLVEKGDVAFVKHQTVPQNTGGKNPDPWAKNLNEK
 DYELLCLDGRKPVVEYANCHLARAPNHAVVTRKDKEACVHKILRQQHFLFGSNVTDCSGN
 FCLFRSETKDLLFRDDTVCLAKLHNRNTYEKYLGEYVKA VGNLRKCSTSSLLEACTFRFP

hFc γ RI (CD64) (SEQ ID NO 9)

qvdttkavitqppwvsvfgeetvtihcevlhpgssstqwfingtatqtstpsyrtsasvndsgeyrcqrglsgsdpiql
 eihrgwllqvssrvftegeplairchawkdvlvnyvlyymgkafkffhwnsnltlktishngtyhcsngmgkhrytsagisvtvkelf
 papvlnasvtspllegnlvtiscetkdlirpglqlyfsfymgsktlrgmtsseyqiltarredsglywceaafedgnvikrspelelqvlg
 lqlptp

FcRn (SEQ ID NO 10)

aeshlsilyhitavsspapgtapafwvsgwlgpqqylsynslrgeaepcgawvwenqvswywekettdlrkekflie
 afkalggkgpytlqgligcelgpdntsvptakfaingeeffmrfdikqgtwggdwpealalsqrwqqqdkaaankeltflifscphrlre
 hlgrgrniewkeppsmrkarpspgfsvltcsafsfyppeqlrlfmglaagtgqgdfgpnsgdgsfhasssitvksgehhycci
 vqhaglaqplrvelespakss

FcRn-H166K (SEQ ID NO 11)

aeshlsilyhitavsspapgtapafwvsgwlgpqqylsynslrgeaepcgawvwenqvswywekettdlrkekflie
 afkalggkgpytlqgligcelgpdntsvptakfaingeeffmrfdikqgtwggdwpealalsqrwqqqdkaaankeltflifscphrlre
 klgrgrniewkeppsmrkarpspgfsvltcsafsfyppeqlrlfmglaagtgqgdfgpnsgdgsfhasssitvksgehhycci
 vqhaglaqplrvelespakss

LRP-CR5-6 (SEQ ID NO 12)

tcppnqfscasgrcipiswtcdldddcgdrsdasascayptcftltqftcnngrcininwrcdndndcgdnsdeagc
 sh

LRP-CR6-7 (SEQ ID NO 13)

tcftltqftcnngrcininwrcdndndcgdnsdeagcshscsstqfkcnsgrcipehwtodgdndcgdydethan
 ctnqatr

LRP-CR6 (SEQ ID NO 14)

tcftltqftcnngrcininwrcdndndcgdnsdeagcsh

SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC (SEQ ID NO 15)

mdilmtqspssmsvslgdtvsitchasqgissnigwlqkpgkxfmgliyygtnlvdgvpsrfsgsgsgadysltissl
dsedfadyycvqyaqlpytfgggtkleklgggsgggsgggsgggsgnsvqlqsgaelvkpgasvklscasgfnikdtyvhvwkq
rpeqglewigrdpangytkydpkfkgkatitadtssntaylqlssltssedlavyycvrplydyyamdywgqgtsvtvss

接头 -SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC (SEQ ID NO 16)

mdilmtqspssmsvslgdtvsitchasqgissnigwlqkpgkxfmgliyygtnlvdgvpsrfsgsgsgadysltissl
dsedfadyycvqyaqlpytfgggtkleklgggsgggsgggsgggsgnsvqlqsgaelvkpgasvklscasgfnikdtyvhvwkq
rpeqglewigrdpangytkydpkfkgkatitadtssntaylqlssltssedlavyycvrplydyyamdywgqgtsvtvssgggsg
ggsgggsg

SC 抗 GPIIIa-2-HC-LC (SEQ ID NO 17)

qvqlqsgaelvrpgtsvkiskcasgytftnywlgwvkqrpghglewigdiypgggynkynenfkkgkatitadtssst
aymqllssltssedsavyfcareygnnydyamdswwggtsvtvssgggsgggsgggsgggsgdivmtqaapsvpvtpgesvsiecr
ssrsllhsngntylcwfllqrpqgspqlllyrmsnlasgvpdrfsgsgsgtaftlrisrveaedvgvyycmqhleyptffgsgtkleikr

SC 抗 GPIIIa-2-LC-HC (SEQ ID NO 18)

divmtqaapsvpvtpgesvsiscrssrsllhsngntylcwfllqrpqgspqlllyrmsnlasgvpdrfsgsgsgtaftlrisr
veaedvgvyycmqhleyptffgsgtkleikrgggsgggsgggsgqvlqsgaelvrpgtsvkiskcasgytftnywlgwvk
qrpghglewigdiypgggynkynenfkkgkatitadtssstaymqllssltssedsavyfcareygnnydyamdswwggtsvtvss

ABD035 (SEQ ID NO 19)

laeakvlanreldkygvsdfykrlinkaktvegvealkhilaalp

序列 A (SEQ ID NO 20)

GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPS
EGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGSEPATSGSETPGSPAGSP
TSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSE
GSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSG
SETPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSPAGSPTS
TEEGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGS
APGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTE
EGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE
GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEE
GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSPAGSPTSTEEGSPAGSPTSTEE
GTSTEPSEGSAPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGTSESATPESGPGSEPATSGSETP
GSEPATSGSETPGSPAGSPTSTEEGTSTEPSEGSAPGTSTEPSEGSAPGSEPATSGSETP
GTSESATPESGPGTSTEPSEGSAPG

ELP80 (SEQ ID NO 21)

gvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgv
gvpagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgv
gvpvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgg
gvpvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgv
gvpaggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgg
gvpvgvpgggvpgvgvpgvgvpgagvpgvgvpgggvpgvgvpgvgvpgvgvpgg

额外的 a3 (SEQ ID NO 22)

eitrttlqsdqeeidyddtisvemkkedfdiydedenqspr

GHBP (SEQ ID NO 23)

fsgseataailsrapwslqsvnpqiktnsskepftkcrsperetfchwtdvhhgtnlqpiqlytmtqewtqew
kecpdyvsagencyfnssftsiwipycikltsnggivdekcfvdelvqdpplalnwtllnvstlghadiqvnweapmadiqg
wmvleyelqykevnetkwmmdpilttsvpvysikvdkeyevrvrskqmsgnygefsevhvltlpqmsq

FIX298-342 (SEQ ID NO 24)

iflkfsgyvsqwanvfthkgrsalvlqylrvplvdratclrstkf

FIX47-125 (SEQ ID NO 25)

Ddgdqcesnplnggscddinsyecwcpfglegknceldvtcnikngrceqfcknsadnkvvcsctegyrtan
qksce

vWF1-272 (SEQ ID NO 26)

slscrppmvklvcpadnlraeglectkicqnydiecmsmgcvsgclcppgmvrhenrcvalercpcfhqgkeyap
getvkigntcvordrkwnctdhvcdatcstigmahyltfdgkylfpgccqyvlvqdygcsnpgtfrilvgnkgcshpsvkckkrvti
lveggelstfdgevnvkrpmkdethfevvesgryiillgkalsvvdrlhsisvvlkqtyqekvcglcgnfdgignnditssnlqvee
dpvdfgnskwkvsqcadtr

vWF1-1390 (SEQ ID NO 27)

slscrppmvklvcpadnlraeglectkicqnydiecmsmgcvsgclcppgmvrhenrcvalercpcfhqgkeyap
getvkigntcvordrkwnctdhvcdatcstigmahyltfdgkylfpgccqyvlvqdygcsnpgtfrilvgnkgcshpsvkckkrvti
lveggelstfdgevnvkrpmkdethfevvesgryiillgkalsvvdrlhsisvvlkqtyqekvcglcgnfdgignnditssnlqvee
dpvdfgnskwkvsqcadtrkvpldspatchnnimkqtmvdsscnltsdvfdcnklvdpepyldvcyidtcscsesigdcacfc
dtiaayahvcaqhgvvtwrtatcpqsceernlrengyecewrynsapacqvtoqhpeplacpvqcvegchahcppgkild
ellqtcvdpedcpvcevagrfaagkkvltlpsdpehcqichcdvnlitceacqepgglvppldapvsttlyvediseplhdf

ycsrldivflldgseriseaelevikafvvdmmerrisqkwrvavveyhdgshayiglkdrkrpselmasqvkyagsqvastse
vityltfjqifskidrpeasriaillmasqepqqrmsmfryvvggikkkkvivipvgigphanlkqiriekqapenkafvissvdeleqqr
deivsyldlapeappptlppdmaqvltvgpqlgystlgpkmsmvlvafvlegsdkgieadfnrskfmeeviqmdvgqdsi
hvtvlqysymvtveyqfseagsgdiltqvreyqggrrntglalryisdhsflvsqgdreqapnlvymvtgnpasdeikrlpgdi
qvvpigvgpnanvqelerigwvnapiliqdfellpreapdlvgrccsegeglqiptlspapdcspqldvilldgssfpasyfдемкс
fakafiskanigprltqvsvlqygsitldvpwnvvpakahlsivdmqreggpgsqigdalgfavryltsemhgarpqgaskavvilt
dvsdsvdaadaarsnrvtvpigigdrydaaqirilagpagdsenvklqriedlptmvtlgnstfhlkcsqfvrncmdedgnekrp
gdvwtlpgdchtvtcqpdgqtlkshrvncdrglrpscpnsqspvkveetcgcrwtcpvcvctgssstrhivtfdgqnflktgscsyvifq
nkeqddlevilhgacspgarqgcmksievkhsalsvelhsdmevtvngfrlvsvpyvggnmevrvygaimehevrnfhghiftt
pqmnefqqlspkftasktyglcgicdengandfmirdglttdwktlvqewtvqrpgqtcqpilleeqclvpdsshcqvllplfaech
kv

vWF497-716-R545A (SEQ ID NO 28)

edisepplhdfycsrldivflldgseriseaelevikafvvdmmerrisqkwrvavveyhdgshayiglkdrkrpsel
masqvkyagsqvastsevityltfjqifskidrpeasriaillmasqepqqrmsmfryvvggikkkkvivipvgigphanlkqiriekq
apenkafvissvdeleqqrdeivsyldlapeappptlppdmaqvltvg

vWF 结合蛋白 (SEQ ID NO 29)

npelkdfneeqklcdleinkdenqilmigtlyqnryddveslyskidlimgykdeerankkavnkrmlenkkedletideffsdid
ktrpnnipvledskqeeknhknmaqlksdleaaksdeskrskrsksrntqnhkpasqevseqqkaeydkraerkarfidnq
kikktpvvsleydfekqridnendkklvvsaptkkptsptlylettqvpmptvergtqqqiynapklaglngeshdftlhqsppt
snhthnn

hCG C-端 (SEQ ID NO 30)

sssskapppslpspsrlpgpsdtpilpq

F10AP (SEQ ID NO 31)

svaqatsssgaepdsitwkpdydaadldptenpfdlldfnqtqpergdnnl。

[0104] 实施例 3

FVIII 构架和融合蛋白的瞬时表达

密度为 $0.9-1.1 \times 10^6$ 的 HKB11 细胞用质粒 0.7 mg/l 和转染剂 293Fectin (Invitrogen) 1.4 ml/l 的混合物转染。通过将质粒和转染剂分别稀释在 OPTIMEM (Invitrogen) 中,混合这两种溶液,并将混合物在室温下温育 20 分钟,来制备转染混合物。将混合物加入到细胞悬液中并将悬液在振荡器培养箱中在 36.5°C 和 5% CO₂ 中温育 5 天。将细胞培养收获物在 0.22 μm 膜滤器上过滤。按照实施例 5 所述,从细胞培养收获物中纯化 FVIII 构架和融合蛋白。

[0105] 实施例 4

表达融合蛋白的稳定的细胞

适应无血清的 CHO-DUKX-B11 细胞用编码 F8-500-白蛋白-Δa3 融合蛋白的表达质粒转染。转染后的细胞用二氢叶酸还原酶系统选择并通过有限稀释而克隆。通过 ELISA 和显色活性测定来筛选产生 FVIII 的克隆。选择克隆 JsJH009 用于扩大规模 (upscaling)。将细胞移至生物反应器。按照实施例 5 所述,从细胞培养收获物中纯化 F8-500-白蛋白-Δa3

融合物。

[0106] 实施例 5

FVIII 构架和融合蛋白的纯化

给柱填装树脂 VIIISelect (GE Healthcare), 其尺寸为: 直径 1.6cm 和床高 4cm (8mL); 并将柱用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 (Tween80) + 250mM NaCl, pH7.3 以 500cm/h 平衡。将按照实施例 3 所述制备的培养物滤液上柱, 然后先用平衡缓冲液洗涤柱子, 再用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 1.5M NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 2.5 M NaCl + 6.5M 丙二醇, pH7.3, 以 90cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80, pH7.3 1:10 稀释, 然后上样到填装有 F25-Sepharose 的柱上 (Thim 等, Haemophilia, 2009)。柱尺寸为直径 1.6cm 和床高 2cm, 柱体积 4mL。使用前, 柱子用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 150mM NaCl + 1M 甘油, pH7.3, 以 180cm/h 平衡。上样后, 先用平衡缓冲液洗涤柱子, 再用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 650mM NaCl, pH7.3 洗涤柱子。结合的 FVIII 用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 2.5M NaCl + 50%(v/v) 乙二醇, pH7.3, 以 30cm/h 等度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80, pH7.3 1:15 稀释, 除了缺失 a3 结构域的 FVIII- 变体之外, 其在相同缓冲液中 1:45 稀释。将稀释的合并液上样到填装有 Poros 50HQ (PerSeptive Biosystem) 的柱子上, 柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm, 柱体积 1mL。使用前, 柱子用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 50mM NaCl + 1M 甘油, pH7.3, 以 300cm/h 平衡。柱子用平衡缓冲液洗涤, 然后用从平衡缓冲液至以下溶液的在 5 个柱体积内的线性梯度洗脱: 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 1M NaCl + 1M 甘油, pH7.3。合并含有 FVIII 的流分并将合并液贮存于 -80° 直至使用。典型纯化的收率表见表 11。

[0107] 基本上如上所述地纯化具有 HIS- 标签的 FVIII 变体, 然而第二纯化步骤 (F25-sepharose) 替换为装有 2 个柱体积 1M NiSO_4 的螯合 Sepharose FF (GE Healthcare)。柱尺寸为直径 0.5cm 和床高 5cm, 柱体积 1mL。使用之前, 柱子用 30mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 1.5M NaCl, pH7.3, 以 180cm/h 的流速平衡。上样后, 柱子用 30 倍柱体积的平衡缓冲液洗涤, 然后用在 5 个柱体积内到 250mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80 + 1.5M NaCl, pH7.3 的线性梯度洗脱。合并含有 FVIII 的流分并用 20mM 咪唑 + 10mM CaCl_2 + 0.01% 吐温 80, pH7.3 1:30 稀释。最终的纯化步骤 (Poros 50HQ) 如上所述地进行。

[0108] 实施例 6

通过显色测定而测量的细胞培养收获物中的 FVIII:C

在显色 FVIII 测定中, 使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 如下评价细胞培养收获物 (上清液部分) 中的 rFVIII 化合物的 FVIII 活性 (FVIII:C): rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (Coagulation reference, Technoclone) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % BSA, pH 7.3, 含防腐剂) 中稀释。将 50 μl 样品、标准品和缓冲液阴性对照加入到 96 孔微量滴定板 (Spectraplates MB, Perkin Elmer)。所有样品都以 1:100、1:400、1:1600 和 1:6400 稀释再测定。将来自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 按照 5:1:3 (体积比) 混合, 并取 75 μl 加入到孔中。在室温下温育 15 min 之后, 加入 50 μl 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下

温育 5 min, 然后加入 25 μ l 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Envision 微量滴定板读板器 (Perkin Elmer) 上, 测定在 405 nm 处吸光度和在用作参考波长的 620 nm 处的吸光度。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。通过样品活性除以经 ELISA 测得的蛋白质浓度而计算比活。结果见表 1-10。

[0109] 实施例 7

FVIII 构架和融合蛋白的纯化

融化溶于由以下成分组成的缓冲液的按照实施例 5 所述纯化的 F8-500- 白蛋白 - Δ a3 (13 mg, 6.5 mg/ml): 含咪唑 (20 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %)、氯化钠 (500 mM) 和甘油 (1 M) 的水 (pH 7.3)。

[0110] 加入 9 微克来自产脲节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*) 的唾液酸酶 (1.9 U, 在 7 微升缓冲液中)、280 微克唾液酸转移酶 (在 112 微升中, His-ST3Gal-I, 2.5 mg/ml, EC 2.4.99.4, WO 2006102652) 和 59 毫克胞苷一磷酸 *N*-5'-PEG- 甘油 - 神经氨酸 (在 290 微升中, 参见 WO2007/056191), 并用 HCl (1M) 将 pH 调节到 6.9。终体积为 2.7 mL。然后让所得混合物在 22-25 摄氏度 (室温) 下静置 22 小时。

[0111] 糖聚乙二醇化 (glycopegylation) 之后, 混合物用缓冲液 A (含 Tris (25 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %) 和甘油 (1 M) 的水, pH 7.5) 稀释至 50 mL。将稀释混合物上样到 Source30Q 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark, 柱体积 1.1 mL)。然后用缓冲液 A (4 倍柱体积) 洗涤固定化材料, 再用 0-100 % 缓冲液 B (含 Tris (25 mM)、氯化钙 (10 mM)、吐温 80 (0.02 %)、氯化钠 (0.7 M) 和甘油 (1 M) 的水, pH 7.5) 的梯度从柱中洗脱。梯度: 8 CV 5-10 % 缓冲液 B, 13.5 CV 10-100 % 缓冲液 B 和 3 CV 100% 缓冲液 B。

[0112] 将早期洗脱的 2.5 mL 峰流分与 1.2 毫克胞苷一磷酸 *N*-5' 乙酰基 - 神经氨酸 (在 12 微升中) 和 62 微克唾液酸转移酶 (在 52 微升中, MBP-SBD-ST3Gal-III, EC 2.4.99.6, 参见 WO 2006102652) 混合。

[0113] 让所得混合物在 22-25 摄氏度 (室温) 下静置 22 小时, 然后上样到 Superdex200pg 柱 (GE Healthcare Bio-Sciences, Hillerød, Denmark; 柱体积 120 mL)。然后用由以下成分组成的缓冲液洗脱产物: 含 L- 组氨酸 (1.5 g/L)、L- 甲硫氨酸 (55 mg/L)、氯化钙 (250 mg/L)、吐温 80 (0.1 g/L)、氯化钠 (18 g/L) 和蔗糖 (1.5 g/L) 的水, pH 6.9。分离并合并最初的含产物的流分 (12 mL); 产物浓度为大约 0.06 mg/mL。

[0114] 最终, 通过在 Amicon Centriprep YM-50 (截止值: 50 kDa) 中离心而浓缩产物。浓缩后体积为 1.7 mL, 含有 0.35 mg/mL 糖聚乙二醇化的 F8-500- 白蛋白 - Δ a3 (纯度 >90%)。该化合物在表 12 中称为 40K-PEG-0-F8-500- 白蛋白 - Δ a3。

[0115] 实施例 8

通过显色测定而测量的纯化样品中的 FVIII:C

如下在显色 FVIII 测定中, 使用 Coatest SP 试剂 (Chromogenix) 评价纯化 rFVIII 化合物 (按照实施例 5 所公开的方法而分离) 的 FVIII 活性 (FVIII:C): rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如根据 NIBSC 的第 7 届国际 FVIII 标准品而标定的纯化野生型 rFVIII) 在 Coatest 测定缓冲液 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % BSA, pH 7.3, 含防腐剂) 中稀释。将 50 μ l 样品、标准品和缓冲液阴性对照一式两份加入到 96 孔微量滴定板 (Nunc) 中。将来

自 Coatest SP 试剂盒的因子 IXa/ 因子 X 试剂、磷脂试剂和 CaCl_2 按照 5:1:3 (体积比) 混合, 并取 75 μl 加入到孔中。在室温下温育 15 min 之后, 加入 50 μl 因子 Xa 底物 S-2765/ 凝血酶抑制剂 I-2581 混合物并将反应物在室温下温育 10 min, 然后加入 25 μl 1 M 柠檬酸, pH 3。在 Spectramax 微量滴定板读板器 (Molecular Devices) 上, 测定在 415 nm 处吸光度和在用作参考波长的 620 nm 处的吸光度。从所有样品中减去阴性对照值并通过吸光度值对 FVIII 浓度作图的线性回归来制作标定曲线。通过样品活性除以经 HPLC 测得的蛋白质浓度而计算比活。对于 HPLC, 通过对在对应于轻链的色谱图中的峰下面积进行积分而求出样品浓度, 并与野生型 rFVIII 的平行分析中同样的峰的面积进行比较, 其中通过氨基酸分析测定浓度。结果见表 1-10。

[0116] 实施例 9

通过一步法凝血测定而测量的纯化样品中的 FVIII:C

如下在一步法 FVIII 凝血测定中进一步评价 rFVIII 化合物的 FVIII:C : rFVIII 样品和 FVIII 标准品 (例如根据 NIBSC 的第 7 届国际 FVIII 标准品而标定的纯化野生型 rFVIII) 在 HBS/BSA 缓冲液 (20 mM hepes、150 mM NaCl、pH 7.4, 含 1 % BSA) 中稀释至大约 10 U/ml, 再在含 VWF 而缺乏 FVIII 的血浆 (Dade Behring) 中稀释 10 倍。样品随后在 HBS/BSA 缓冲液中稀释。在 ACL300R 或 ACL5000 仪器 (Instrumentation Laboratory) 上, 使用单因子程序, 测定 APTT 凝血时间 (clot time)。含 VWF 而缺乏 FVIII 的血浆 (Dade Behring) 用作测定血浆, 且 SynthASil, (HemosIL™, Instrumentation Laboratory) 用作 aPTT 试剂。在凝血仪器中, 在 37°C, 将稀释的样品或标准品与缺乏 FVIII 的血浆、aPTT 试剂混合。加入 (assed) 氯化钙并用浊度确定血块形成的时间。根据 FVIII 标准品稀释液的血块形成时间的标准曲线来计算样品中的 FVIII:C。结果见表 1-10。

[0117] 实施例 10

在 FVIII 缺陷型和 VWF 缺陷型小鼠中 FVIII 构架和融合蛋白的药代动力学

在 FVIII 缺陷型小鼠 (具有 C57Bl/6 背景的 FVIII 外显子 16 敲出 (KO) 小鼠, 在 Taconic M&B 繁育) 或在 vWF 缺陷型小鼠 (具有 C57Bl/6 背景的 vWF 外显子 4 + 5 KO 小鼠, 在 Charles River, Germany 繁育) 中评价 rFVIII 变体的药代动力学。vWF-KO 小鼠具有 13% 的正常 FVIII:C (参见实施例 6), 而 FVIII-KO 小鼠没有可检测的 FVIII:C。使用近似体重为 25 克, 年龄范围在 16-28 周龄的雄性和雌性的混合群体 (大约 1:1)。小鼠在尾静脉接受 rFVIII (280 IU/kg) 的单次静脉注射。在给药后直到 64 小时的时间点, 使用无包被毛细玻璃管, 从眼窝丛处采血。每只小鼠采 3 份样品, 每一时间点采 2-4 份样品。用柠檬酸钠立即稳定血液并在 4 倍体积 FVIII Coatest SP 缓冲液 (参见实施例 6) 中稀释, 然后在 $4000 \times g$ 离心 5 分钟。将得自稀释血液的血浆在干冰上冷冻并保存于 -80°C 。按照实施例 6 所述, 在显色测定中检测 FVIII:C。通过无房室 (non-compartmental) 法 (NCA), 使用 WinNonlin Pro 4.1 版软件, 进行药代动力学分析。结果见表 12。用融合蛋白的半衰期除以无融合配偶体的 FVIII 构架的半衰期, 求出融合蛋白的延长倍数。

[0118] 实施例 11

与血小板结合的融合蛋白的分析

可通过流式细胞术测定融合蛋白的血小板结合。可纯化外周血血小板, 或可使用全血。血小板可被激活或静止。将血小板与融合蛋白温育 15-30 min。融合蛋白可直接用荧光团

标记或用荧光标记的第二抗体检测。

[0119] 可加入不干扰融合蛋白结合的荧光标记的血小板特异性抗体,以评价与融合蛋白结合的颗粒是否真的是血小板。温育之后,洗涤细胞以除去融合蛋白,然后在流式细胞仪上分析样品。流式细胞仪检测未标记的细胞和与细胞结合的荧光标记的分子,并且因此可用于特异性地分析融合蛋白与血小板(或其它细胞)结合的程度。

[0120] 可例如通过加入过量的未标记抗体(当使用直接标记的融合蛋白时),评价结合特异性。可例如通过加入过量的膜联蛋白 V 或 FVIII,评价 FVIII 部分与血小板的结合。

[0121] 可如下评价通过静止血小板对融合蛋白的内在化:例如通过将血小板与直接标记的融合蛋白一起温育,再与抗体一起温育,所述抗体猝灭来自表面结合(即非内在化的)融合蛋白的信号。然后仅内在化的融合蛋白才可被流式细胞术检测到。可假定被激活的血小板将会在血块形成部位释放内在化融合蛋白。

[0122] 实施例 12

在 GPIIIa 转基因小鼠中 GPIIIa 靶向的融合蛋白的药代动力学

GPIIIa 靶向的融合蛋白与血小板上的人 GPIIb/IIIa (整联蛋白 $\alpha 2\beta 3$) 受体结合,但它不能识别鼠 GPIIb/IIIa,这防止使用野生型小鼠用于药代动力学分析。可在表达人 GPIIIa 的转基因小鼠中分析 GPIIIa 靶向的融合蛋白的药代动力学特性,所述人 GPIIIa 与鼠 GPIIb 关联,这使融合蛋白能够与该受体结合。将融合蛋白经静脉内注射到 GPIIIa 转基因小鼠,并在注射之后的不同时间点(例如 0.5、24、72、288 小时)采血。可通过 ELISA 的方式定量测定注射的融合蛋白(游离的和/或与血小板结合的),或可将融合蛋白放射性标记或荧光标记并检测。

[0123] 表 1. 可构成融合蛋白 FVIII 部分的 BDD FVIII 构架

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (ml/ng)*
F8-500	F8-500	n.a.	n.a.	17.9/17.9
F8-500- $\Delta a3$	F8-500- $\Delta a3$	n.a.	n.a.	13.6/13.8
F8-500-His	F8-500-His	n.a.	n.a.	12.1/8.1
F8-500- $\Delta a3$ -His	F8-500- $\Delta a3$ -His	n.a.	n.a.	n.d./n.d.
F8-500-Y1680F	F8-500-Y1680F	n.a.	n.a.	16.6**/n.d.
F8-500-Y1680C	F8-500-Y1680C	n.a.	n.a.	19.7/n.d.

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定(高值可代表 ELISA 检测不良)

表 2. 与 FcRn 相互作用的融合蛋白

名称	FYIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比值 (sd/ng)*
F8-500-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 B 结构域中	19.5**/n.d. 14.1**/n.d.
F8-500-hFc(IgG1)-His	F8-500-His	hFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-hFc(IgG1)	F8-500-Y1680F	hFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-hFc(IgG1)	F8-500-Y1680C	hFc	在 B 结构域中	
F8-500-hFc(IgG1)-Δa3	F8-500-Δa3	hFc	在 a3s 位置	6.0**/n.d. 28.5**/n.d.
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 LC 的 C 端	16.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的 GS-hFc(IgG1)	F8-500	hFc	在 LC 的 C 端	14.4**/n.d.
F8-500-C2 连接的 hFc(IgG1) (F8-500-hFc-LC)	F8-500	hFc	在 LC 的 C 端	13.4**/n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 hFc(IgG1) (F8-500-Y1680F-hFc-LC)	F8-500-Y1680F	hFc	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 hFc(IgG1) (F8-500-Y1680C-hFc-LC)	F8-500-Y1680C	hFc	在 LC 的 C 端	
F8-500-mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 B 结构域中	18.5**/n.d. 13.5**/n.d.
F8-500-mFc(IgG2A)-His	F8-500-His	mFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680F	mFc	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680C	mFc	在 B 结构域中	
F8-500-mFc(IgG2A)-Δa3	F8-500-Δa3	mFc	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 LC 的 C 端	15.5**/n.d.
F8-500-C2 连接的 GS-mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 LC 的 C 端	15.2**/n.d.
F8-500-C2 连接的 mFc(IgG2A)	F8-500	mFc	在 LC 的 C 端	12.9**/n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680F	mFc	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 mFc(IgG2A)	F8-500-Y1680C	mFc	在 LC 的 C 端	
F8-500-白蛋白	F8-500	HSA	在 B 结构域中	14.7/n.d.
F8-500-白蛋白-His	F8-500-His	HSA	在 B 结构域中	8.1/8.2
F8-500-白蛋白-S127P	F8-500	HSA	在 B 结构域中	12.5**/n.d.
F8-500-Y1680F-白蛋白	F8-500-Y1680F	HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-白蛋白	F8-500-Y1680C	HSA	在 B 结构域中	
F8-500-白蛋白-Δa3	F8-500-Δa3	HSA	在 a3s 位置	2.0/n.d.
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-白蛋白	F8-500	HSA	在 LC 的 C 端	22.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的 GS-白蛋白	F8-500	HSA	在 LC 的 C 端	17.7**/n.d.
F8-500-C2 连接的白蛋白 (F8-500-白蛋白-LC)	F8-500	HSA	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的白蛋白 (F8-500-Y1680F-白蛋白-LC)	F8-500-Y1680F	HSA	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的白蛋白 (F8-500-Y1680C-白蛋白-LC)	F8-500-Y1680C	HSA	在 LC 的 C 端	
F8-500-转铁蛋白	F8-500	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-转铁蛋白-His	F8-500-His	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-转铁蛋白	F8-500-Y1680F	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-转铁蛋白	F8-500-Y1680C	转铁蛋白	在 B 结构域中	
F8-500-转铁蛋白-Δa3	F8-500-Δa3	转铁蛋白	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的转铁蛋白 (F8-500-转铁蛋白-LC)	F8-500	转铁蛋白	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的转铁蛋白 (F8-500-Y1680F-转铁蛋白-LC)	F8-500-Y1680F	转铁蛋白	在 LC 的 C 端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的转铁蛋白 (F8-500-Y1680C-转铁蛋白-LC)	F8-500-Y1680C	转铁蛋白	在 LC 的 C 端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 3. 与免疫球蛋白相互作用的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (mU/ng)*
F8-500-hFcγRI	F8-500	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	22.2/20.0
F8-500-hFcγRI-His	F8-500-His	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	11.6/4.9
F8-500-Y1680F- hFcγRI	F8-500-Y1680F	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C- hFcγRI	F8-500-Y1680C	hFcγRI (CD64)	在 B 结构域中	
F8-500- hFcγRI-Δa3	F8-500-Δa3	hFcγRI (CD64)	在 a3s 位置	5.3/n.d.
F8-500-C2- 连接的 -hFcγRI (F8-500-hFcγRI-LC)	F8-500	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2- 连接的-hFcγRI (F8-Y1680F-500-hFc γRI-LC)	F8-500-Y1680F	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2- 连接的- hFcγRI (F8-500-Y1680C-hFc γRI-LC)	F8-500-Y1680C	hFcγRI (CD64)	在 LC 的 C-端	
F8-500-FcRn	F8-500	FcRn	在 B 结构域中	27.2**/n.d.
F8-500-FcRn-H166K	F8-500	FcRn	在 B 结构域中	20.8**/n.d.

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 4. 具有降低与清除受体的相互作用的能力的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (mU/ng)*
F8-500-LRP-CR5-6	F8-500	LRP CR5-6	在 B 结构域中	14.2/n.d.
F8-500-LRP-CR3-6-His	F8-500-His	LRP CR3-6	在 B 结构域中	
F8-500-LRP-CR6-7	F8-500	LRP CR6-7	在 B 结构域中	9.3**/n.d.
F8-500-LRP-CR6	F8-500	LRP CR6	在 B 结构域中	8.9**/n.d.

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 5. 与血小板结合的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (ml/ng) *
F8-500-抗 GPIIIa-1-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-1-IC-1C	在 B 结构域中	29.3** /n.d.
F8-500-接头-抗 GPIIIa-1-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-1-IC-1C	在 B 结构域中	40.3** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	22.5** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	-
F8-500-接头-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	45.9** /n.d.
F8-500-Δa3-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-His	F8-500-Δa3-His	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	-
F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-Δa3	F8-500-Δa3	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 a3s 位置	28.2** /n.d.
F8-500-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C (F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-IC-1C	在 1C 的 C-端	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4C	在 B 结构域中	28.3** /n.d.
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4C	在 B 结构域中	95.4** /n.d.
F8-500-接头-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-His	F8-500-His	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4C	在 B 结构域中	47.5** /n.d.
F8-500-Δa3-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-His	F8-500-Δa3-His	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4C	在 B 结构域中	81.4** /n.d.
F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2- (1C-4C)	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-Δa3	F8-500-Δa3	SC 抗 GPIIIa-2- 1C-4C	在 a3s 位置	29.2** /n.d.
F8-500-C2 连接的 (GGG)6-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C (F8-500-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-1C)	F8-500	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	在 1C 的 C-端	22.4** /n.d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的 -SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C (F8-500-Y1680F-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 -GS-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C (F8-500-Y1680C-SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 GPIIIa-2-1C-4C	在 1C 的 C-端	16.6** /n.d.

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 6. 与血清白蛋白相互作用的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (μl/ng)*
F8-500-ABD035	F8-500	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-ABD035-His	F8-500-His	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	8.3/a.d.
F8-500-Y1680F-ABD035	F8-500-Y1680F	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-ABD035	F8-500-Y1680C	白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-ABD035-Δa3	F8-500-Δa3	白蛋白结合肽 ABD035	在 a3s 位置	4.0/0.5
F8-500-C2-连接的-ABD035 (F8-500-ABD035-1C)	F8-500	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-ABD035 (F8-500-Y1680F-ABD035-1C)	F8-500-Y1680F	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-ABD035 (F8-500-Y1680C-ABD035-1C)	F8-500-Y1680C	白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-4XABD035	F8-500	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	14.8/a.d.
F8-500-4XABD035-His	F8-500-His	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-4X ABD035	F8-500-Y1680F	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-4X ABD035	F8-500-Y1680C	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 B 结构域中	
F8-500-4X ABD035-Δa3	F8-500-Δa3	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-4X ABD035-1C)	F8-500	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-Y1680F-4X ABD035-1C)	F8-500-Y1680F	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-4X ABD035 (F8-500-Y1680C-4X ABD035-1C)	F8-500-Y1680C	4 X 白蛋白结合肽 ABD035	在 1C 的 C-端	
F8-500-SC 抗 HSA	F8-500	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 HSA-His	F8-500-His	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680F-SC 抗 HSA	F8-500-Y1680F	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-SC 抗 HSA	F8-500-Y1680C	SC 抗 HSA	在 B 结构域中	
F8-500-SC 抗 HSA-Δa3	F8-500-Δa3	SC 抗 HSA	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-SC 抗 HSA-1C)	F8-500	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-Y1680F-SC 抗 HSA-1C)	F8-500-Y1680F	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-SC 抗 HSA (F8-500-Y1680C-SC 抗 HSA-1C)	F8-500-Y1680C	SC 抗 HSA	在 1C 的 C-端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 7. 保护分子避免清除受体的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (sl/ng)*
F8-500-Seq A	F8-500	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Seq A-His	F8-500-His	序列 A	在 B 结构域中	19.2**/n.d.
F8-500-Y1680F-Seq A	F8-500-Y1680F	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-Seq A	F8-500-Y1680C	序列 A	在 B 结构域中	
F8-500-Seq A- $\Delta a3$	F8-500- $\Delta a3$	序列 A	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-Seq A (F8-500-Seq A-IC)	F8-500	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的 Seq A (F8-500-Y1680F-Seq A-IC)	F8-500-Y1680F	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 Seq A (F8-500-Y1680C-Seq A-IC)	F8-500-Y1680C	序列 A	在 IC 的 C-端	
F8-500-ELP80	F8-500	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-ELP80-His	F8-500-His	ELP80	在 B 结构域中	13.6**/n.d.
F8-500-Y1680F-ELP80	F8-500-Y1680F	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-ELP80	F8-500-Y1680C	ELP80	在 B 结构域中	
F8-500-ELP80- $\Delta a3$	F8-500- $\Delta a3$	ELP80	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-ELP80	F8-500	ELP80	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2 连接的-ELP80	F8-500-Y1680F	ELP80	在 IC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的-ELP80	F8-500-Y1680C	ELP80	在 IC 的 C-端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 8. 具有经调节的 vWF 亲和力的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合 配偶体	融合配偶体 的位置	比活 ($\mu\text{U}/\text{ng}$)*
F8-500-额外的 $\alpha 3$	F8-500	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	10.0**/n.d.
F8-500-额外的 $\alpha 3$ -His	F8-500-His	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	7.7**/n.d.
F8-500-Y1680F-额外的 $\alpha 3$	F8-500-Y1680F	$\alpha 3$	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-额外的 $\alpha 3$	F8-500-Y1680C	额外的 $\alpha 3$	在 B 结构域中	
F8-500- 额外的 $\alpha 3$ - $\Delta \alpha 3$	F8-500- $\Delta \alpha 3$	额外的 $\alpha 3$	在 $\alpha 3s$ 位置	
F8-500-C2 连接的-额外的 $\alpha 3$ (F8-500-额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2- 连接的-额外的 $\alpha 3$ (F8-500-Y1680F- 额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500-Y1680F	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的 额外的 $\alpha 3$ (F8-500-Y1680C-额外的 $\alpha 3$ -LC)	F8-500-Y1680C	额外的 $\alpha 3$	在 LC 的 C-端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 9. 其它融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合配偶体	融合配偶体的位置	比活 (ml/ng)*
F8-500-GHBP	F8-500	生长激素结合蛋白	在 B 结构域中	22.8**/n.d.
F8-GHBP-His	F8-500-His	生长激素结合蛋白	在 B 结构域中	7.6/4.5
F8-500-FIX298-342	F8-500	FIX 的 AS 298-342	在 B 结构域中	12.3**/n.d.
F8-500-FIX47-125	F8-500	FIX 的 AS 47-125	在 B 结构域中	18.0/n.d.
F8-500-FIX47-125-His	F8-500-His	FIX 的 AS 47-125	在 B 结构域中	14.4/13.3
F8-500-vWF1-272	F8-500	vWF 的 AS 1-272	在 B 结构域中	44.5**/n.d.
F8-500-vWF1-1390	F8-500	vWF 的 AS 1-1390	在 B 结构域中	16.0**/n.d.
F8-500-vWF497-716-R545A	F8-500	vWF 的 AS 497-716	在 B 结构域中	11.5/8.8
F8-500-vWF497-716-R545A-His	F8-500-His	vWF 的 AS 497-716	在 B 结构域中	236.9**/n.d.
F8-500-vWF 结合蛋白	F8-500	vWF 结合蛋白	在 B 结构域中	19.8**/n.d.
F8-500-hCG C-端-His	F8-500-His	hCG b-链的 28 个 C-端 AS	在 B 结构域中	11.4/n.d.
F8-500-hCG C-端- Δ a3	F8-500- Δ a3	hCG b-链的 28 个 C-端 AS	在 a3s 位置	18.2/n.d.
F8-500-F10AP	F8-500	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	22.5**/n.d.
F8-500-F10AP-His	F8-500-His	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	16.8/n.d.
F8-500-Y1680F-F10AP	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	
F8-500-Y1680C-F10AP	F8-500-Y1680C	hFX 的活化肽	在 B 结构域中	
F8-500-F10AP- Δ a3	F8-500- Δ a3	hFX 的活化肽	在 a3s 位置	
F8-500-C2-连接的-F10AP (F8-500-F10AP-LC)	F8-500	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680F-C2-连接的-F10AP (F8-500-Y1680F-F10AP-LC)	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2-连接的-F10AP (F8-500-Y1680C-F10AP-LC)	F8-500-Y1680F	hFX 的活化肽	在 LC 的 C-端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 10. 具有经调节的脂质亲和力的融合蛋白

名称	FVIII 部分	融合 配偶体	融合配 偶体的 位置	比活 ($\mu\text{U}/\text{ng}$)*
F8-500-额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-额外的 C2-His	F8-500-His	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-Y1680F-额外的 C2	F8-500-Y1680F	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500-Y1680C-额外的 C2	F8-500-Y1680C	额外的 C2	在 B 结 构域中	
F8-500- 额外的 C2- Δa3	F8-500- Δa3	额外的 C2	在 a3s 位置	
F8-500-C2 连接的-(GGGS) ₆ - 额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 LC 的 C-端	8.3**/n. d.
F8-500-C2 连接的-GS- 额外的 C2	F8-500	额外的 C2	在 LC 的 C-端	7.7**/n. d.
F8-500-Y1680F-C2 连接的- 额外的 C2	F8-500-Y1680F	额外的 C2	在 LC 的 C-端	
F8-500-Y1680C-C2 连接的- 额外的 C2	F8-500-Y1680C	额外的 C2	在 LC 的 C-端	

* 显色测定 / 凝血测定

** 在细胞培养收获物中测定 (高的值可代表 ELISA 检测不良)

表 11. 实施例 5 所述的纯化过程的典型收率

样品	体积/mL	活性/ $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	收率%	
			步骤	总计
培养物滤液	1650	17	100	100
步骤 1: 流出液 (flow thru)	1650	3.5	21	-
步骤 1: 洗脱液合并液	14	1021	51	51
步骤 2: 流出液	133	19	17	-
步骤 2: 洗脱液合并液	8	820	45	23
步骤 3: 流出液	117	0.9	2	-
步骤 3: 洗脱液合并液	1.5	3000	69	16

表 12. FVIII 构架和融合蛋白在 FVIII 缺陷型或 vWF 缺陷型小鼠中的体内半衰期

名称	在 PV111 缺陷型小鼠中的半衰期(h)*	在 PV111 缺陷型小鼠中的延长倍数*	在 xW ^h 缺陷型小鼠中的半衰期(h)*	在 xW ^h 缺陷型小鼠中的延长倍数*
FR-500	4.5/n.d.	n.d.	n.d./0.3	n.d.
FR-500-Δ ₂₃	0.2/0.3	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-His	n.d.	n.d.	0.1/0.1	n.d.
FR-500-Δ ₂₃ -His	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-Y168R	0.5/n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-Y168R ⁺	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-His-(125I)-Δ ₂₃	0.7/n.d.	2.3/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的 -(GGG)5'-at-(1gg23)	9.9/n.d.	2.2/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的 -(GGG)5'-at-(1gg23)	15.9/n.d.	3.5/n.d.	n.d./1.1	n.d/1
FR-500-1125I1	7.8/9.1	1.7/1.1	n.d.	n.d.
FR-500-1125I1-His	6.7/8.0	7/7	1.6/0.6	16/8
FR-500-1125I1-Δ ₂₃	1.4/n.d.	4.7/n.d.	n.d.	n.d.
40K-PEG-0- FR-500-1125I1-Δ ₂₃	12.0/n.d.	40/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的-(GGG)5'-1125I1	n.d/9.6	n.d./1.1	n.d.	n.d.
FR-500-C2 重组的-(5'-1125I1)	8.0/n.d.	1.8/n.d.	n.d./0.8	n.d/3
FR-500-McyRI	9.2/9.7	2.0/1.1	n.d.	n.d.
FR-500-His-γ81-His	10/n.d.	2.2/n.d.	1.7/1.2	17/12
FR-500-McyRI-Δ ₂₃	0.2/n.d.	0.7/n.d.	n.d.	n.d.
FR-500-180-C88-6	8.2/8.3	1.4/0.7	n.d.	n.d.
FR-500-ARXNS-His	10.3/-	7/7	n.d./0.8	n.d/8
FR-6889-His	n.d.	n.d.	0.1/0.2	1/2
FR-500-FIX47-125-His	5.3/5.3	7/7	n.d.	n.d.
FR-500-FIX47-His	n.d.	n.d.	1.0/0.8	10/8

* 显色测定 /ELISA。

CPCH1562663D 序 列 表

<110> 诺沃—诺迪斯克有限公司

<120> 因子 VIII 融合蛋白

<130> 7920

<160> 31

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> 人类 (homo sapiens)

<400> 1

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr

1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro

20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys

35 40 45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro

50 55 60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val

65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val

85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala

100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val

115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn

130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser

145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu

165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu

180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp

195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser

210	215	220
Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg		
225	230	235
Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His		240
	245	250
Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu		255
	260	265
Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile		270
	275	280
Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly		285
	290	295
Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met		300
305	310	315
Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg		320
	325	330
Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp		335
	340	345
Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe		350
	355	360
Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His		365
	370	375
Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu		380
385	390	395
Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro		400
	405	410
Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr		415
	420	425
Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile		430
	435	440
Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile		445
	450	455
Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile		460
465	470	475
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys		480
	485	490
His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys		495
	500	505
Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys		510
	515	520
		525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala		
530	535	540
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp		
545	550	555 560
Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe		
	565	570 575
Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln		
	580	585 590
Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe		
	595	600 605
Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser		
	610	615 620
Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu		
625	630	635 640
Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr		
	645	650 655
Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro		
	660	665 670
Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp		
	675	680 685
Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala		
	690	695 700
Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu		
705	710	715 720
Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala		
	725	730 735
Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg		
	740	745 750
Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys		
	755	760 765
Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn		
	770	775 780
Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro		
785	790	795 800
His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe		
	805	810 815
Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser		
	820	825 830
Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val		

835	840	845
Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly		
850	855	860
Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser		
865	870	875
Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala		880
885	890	895
Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His		
900	905	910
Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro		
915	920	925
Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp		
930	935	940
Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp		
945	950	955
Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys		
965	970	975
Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys		
980	985	990
Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala		
995	1000	1005
Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu		
1010	1015	1020
Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu		
1025	1030	1035
Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp		
1040	1045	1050
Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr		
1055	1060	1065
Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly		
1070	1075	1080
Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys		
1085	1090	1095
Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His		
1100	1105	1110
Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln		
1115	1120	1125
Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe		
1130	1135	1140

Leu Ser	Glu Lys Asn Lys Val	Val Val Gly Lys Gly	Glu Phe Thr
1145	1150	1155	
Lys Asp	Val Gly Leu Lys Glu	Met Val Phe Pro Ser	Ser Arg Asn
1160	1165	1170	
Leu Phe	Leu Thr Asn Leu Asp	Asn Leu His Glu Asn	Asn Thr His
1175	1180	1185	
Asn Gln	Glu Lys Lys Ile Gln	Glu Glu Ile Glu Lys	Lys Glu Thr
1190	1195	1200	
Leu Ile	Gln Glu Asn Val Val	Leu Pro Gln Ile His	Thr Val Thr
1205	1210	1215	
Gly Thr	Lys Asn Phe Met Lys	Asn Leu Phe Leu Leu	Ser Thr Arg
1220	1225	1230	
Gln Asn	Val Glu Gly Ser Tyr	Asp Gly Ala Tyr Ala	Pro Val Leu
1235	1240	1245	
Gln Asp	Phe Arg Ser Leu Asn	Asp Ser Thr Asn Arg	Thr Lys Lys
1250	1255	1260	
His Thr	Ala His Phe Ser Lys	Lys Gly Glu Glu Glu	Asn Leu Glu
1265	1270	1275	
Gly Leu	Gly Asn Gln Thr Lys	Gln Ile Val Glu Lys	Tyr Ala Cys
1280	1285	1290	
Thr Thr	Arg Ile Ser Pro Asn	Thr Ser Gln Gln Asn	Phe Val Thr
1295	1300	1305	
Gln Arg	Ser Lys Arg Ala Leu	Lys Gln Phe Arg Leu	Pro Leu Glu
1310	1315	1320	
Glu Thr	Glu Leu Glu Lys Arg	Ile Ile Val Asp Asp	Thr Ser Thr
1325	1330	1335	
Gln Trp	Ser Lys Asn Met Lys	His Leu Thr Pro Ser	Thr Leu Thr
1340	1345	1350	
Gln Ile	Asp Tyr Asn Glu Lys	Glu Lys Gly Ala Ile	Thr Gln Ser
1355	1360	1365	
Pro Leu	Ser Asp Cys Leu Thr	Arg Ser His Ser Ile	Pro Gln Ala
1370	1375	1380	
Asn Arg	Ser Pro Leu Pro Ile	Ala Lys Val Ser Ser	Phe Pro Ser
1385	1390	1395	
Ile Arg	Pro Ile Tyr Leu Thr	Arg Val Leu Phe Gln	Asp Asn Ser
1400	1405	1410	
Ser His	Leu Pro Ala Ala Ser	Tyr Arg Lys Lys Asp	Ser Gly Val
1415	1420	1425	
Gln Glu	Ser Ser His Phe Leu	Gln Gly Ala Lys Lys	Asn Asn Leu

1430	1435	1440
Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu		
1445	1450	1455
Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys		
1460	1465	1470
Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr		
1475	1480	1485
Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys		
1490	1495	1500
Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu		
1505	1510	1515
Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile		
1520	1525	1530
Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg		
1535	1540	1545
Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp		
1550	1555	1560
Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu		
1565	1570	1575
Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys		
1580	1585	1590
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His		
1595	1600	1605
Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu		
1610	1615	1620
Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln		
1625	1630	1635
Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr		
1640	1645	1650
Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile		
1655	1660	1665
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp		
1670	1675	1680
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr		
1685	1690	1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser		
1700	1705	1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro		
1715	1720	1725

Gln Phe	Lys Lys Val Val Phe	Gln Glu Phe Thr Asp	Gly Ser Phe
1730	1735	1740	
Thr Gln	Pro Leu Tyr Arg Gly	Glu Leu Asn Glu His	Leu Gly Leu
1745	1750	1755	
Leu Gly	Pro Tyr Ile Arg Ala	Glu Val Glu Asp Asn	Ile Met Val
1760	1765	1770	
Thr Phe	Arg Asn Gln Ala Ser	Arg Pro Tyr Ser Phe	Tyr Ser Ser
1775	1780	1785	
Leu Ile	Ser Tyr Glu Glu Asp	Gln Arg Gln Gly Ala	Glu Pro Arg
1790	1795	1800	
Lys Asn	Phe Val Lys Pro Asn	Glu Thr Lys Thr Tyr	Phe Trp Lys
1805	1810	1815	
Val Gln	His His Met Ala Pro	Thr Lys Asp Glu Phe	Asp Cys Lys
1820	1825	1830	
Ala Trp	Ala Tyr Phe Ser Asp	Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His
1835	1840	1845	
Ser Gly	Leu Ile Gly Pro Leu	Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu
1850	1855	1860	
Asn Pro	Ala His Gly Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu
1865	1870	1875	
Phe Phe	Thr Ile Phe Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu
1880	1885	1890	
Asn Met	Glu Arg Asn Cys Arg	Ala Pro Cys Asn Ile	Gln Met Glu
1895	1900	1905	
Asp Pro	Thr Phe Lys Glu Asn	Tyr Arg Phe His Ala	Ile Asn Gly
1910	1915	1920	
Tyr Ile	Met Asp Thr Leu Pro	Gly Leu Val Met Ala	Gln Asp Gln
1925	1930	1935	
Arg Ile	Arg Trp Tyr Leu Leu	Ser Met Gly Ser Asn	Glu Asn Ile
1940	1945	1950	
His Ser	Ile His Phe Ser Gly	His Val Phe Thr Val	Arg Lys Lys
1955	1960	1965	
Glu Glu	Tyr Lys Met Ala Leu	Tyr Asn Leu Tyr Pro	Gly Val Phe
1970	1975	1980	
Glu Thr	Val Glu Met Leu Pro	Ser Lys Ala Gly Ile	Trp Arg Val
1985	1990	1995	
Glu Cys	Leu Ile Gly Glu His	Leu His Ala Gly Met	Ser Thr Leu
2000	2005	2010	
Phe Leu	Val Tyr Ser Asn Lys	Cys Gln Thr Pro Leu	Gly Met Ala

2015	2020	2025
Ser Gly His Ile Arg Asp Phe	Gln Ile Thr Ala Ser	Gly Gln Tyr
2030	2035	2040
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu	Ala Arg Leu His Tyr	Ser Gly Ser
2045	2050	2055
Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys	Glu Pro Phe Ser Trp	Ile Lys Val
2060	2065	2070
Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile	Ile His Gly Ile Lys	Thr Gln Gly
2075	2080	2085
Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser	Leu Tyr Ile Ser Gln	Phe Ile Ile
2090	2095	2100
Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys	Lys Trp Gln Thr Tyr	Arg Gly Asn
2105	2110	2115
Ser Thr Gly Thr Leu Met Val	Phe Phe Gly Asn Val	Asp Ser Ser
2120	2125	2130
Gly Ile Lys His Asn Ile Phe	Asn Pro Pro Ile Ile	Ala Arg Tyr
2135	2140	2145
Ile Arg Leu His Pro Thr His	Tyr Ser Ile Arg Ser	Thr Leu Arg
2150	2155	2160
Met Glu Leu Met Gly Cys Asp	Leu Asn Ser Cys Ser	Met Pro Leu
2165	2170	2175
Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile	Ser Asp Ala Gln Ile	Thr Ala Ser
2180	2185	2190
Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe	Ala Thr Trp Ser Pro	Ser Lys Ala
2195	2200	2205
Arg Leu His Leu Gln Gly Arg	Ser Asn Ala Trp Arg	Pro Gln Val
2210	2215	2220
Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu	Gln Val Asp Phe Gln	Lys Thr Met
2225	2230	2235
Lys Val Thr Gly Val Thr Thr	Gln Gly Val Lys Ser	Leu Leu Thr
2240	2245	2250
Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe	Leu Ile Ser Ser Ser	Gln Asp Gly
2255	2260	2265
His Gln Trp Thr Leu Phe Phe	Gln Asn Gly Lys Val	Lys Val Phe
2270	2275	2280
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe	Thr Pro Val Val Asn	Ser Leu Asp
2285	2290	2295
Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr	Leu Arg Ile His Pro	Gln Ser Trp
2300	2305	2310

Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325

Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 2

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 21 个氨基酸的 FVIII B 结构域接头

<400> 2

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
 1 5 10 15

Lys Arg His Gln Arg
 20

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> F8-500-His 接头

<400> 3

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
 1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 20 25

<210> 4

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> F8-500- α a3 His 接头

<400> 4

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser His His His His His His
 1 5 10 15

Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg
 20 25

<210> 5

<211> 224

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hFc

<400> 5

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Glu Pro Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 20 25 30
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 35 40 45
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 50 55 60
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val
 65 70 75 80
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 85 90 95
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 100 105 110
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 115 120 125
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 130 135 140
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 145 150 155 160
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 165 170 175
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 180 185 190
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 195 200 205
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

<210> 6

<211> 226

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> mFc

<400> 6

Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Ala Glu Gly Glu
 1 5 10 15
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile
 20 25 30
 Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp
 35 40 45
 Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val Leu
 50 55 60
 Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Gln Ser Thr Leu Arg
 65 70 75 80
 Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys
 85 90 95
 Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 100 105 110
 Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr
 115 120 125
 Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu
 130 135 140
 Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp
 145 150 155 160
 Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val
 165 170 175
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu
 180 185 190
 Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His
 195 200 205
 Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro
 210 215 220

Gly Lys

225

<210> 7

<211> 585

<212> PRT

<213> 人类

<400> 7

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu
 1 5 10 15
 Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln

	20		25		30
Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu					
35		40		45	
Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys					
50		55		60	
Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu					
65		70		75	80
Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro					
	85		90		95
Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu					
100		105		110	
Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His					
115		120		125	
Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg					
130		135		140	
Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg					
145		150		155	160
Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala					
	165		170		175
Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser					
180		185		190	
Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu					
195		200		205	
Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro					
210		215		220	
Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys					
225		230		235	240
Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp					
	245		250		255
Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser					
260		265		270	
Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His					
275		280		285	
Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser					
290		295		300	
Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala					
305		310		315	320
Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg					
	325		330		335

Thr	Lys	Cys	Gln	Ser	Phe	Arg	Asp	His	Met	Lys	Ser	Val	Ile	Pro	Ser
20				25				30							
Asp	Gly	Pro	Ser	Val	Ala	Cys	Val	Lys	Lys	Ala	Ser	Tyr	Leu	Asp	Cys
35				40				45							
Ile	Arg	Ala	Ile	Ala	Ala	Asn	Glu	Ala	Asp	Ala	Val	Thr	Leu	Asp	Ala
50				55				60							
Gly	Leu	Val	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Leu	Ala	Pro	Asn	Asn	Leu	Lys	Pro	Val
65				70				75				80			
Val	Ala	Glu	Phe	Tyr	Gly	Ser	Lys	Glu	Asp	Pro	Gln	Thr	Phe	Tyr	Ala
85				90				95							
Val	Ala	Val	Val	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Phe	Gln	Met	Asn	Gln	Leu	Arg
100				105				110							
Gly	Lys	Lys	Ser	Cys	His	Thr	Gly	Leu	Gly	Arg	Ser	Ala	Gly	Trp	Asn
115				120				125							
Ile	Pro	Ile	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Asp	Leu	Pro	Glu	Pro	Arg	Lys	Pro
130				135				140							
Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Ala	Asn	Phe	Phe	Ser	Gly	Ser	Cys	Ala	Pro	Cys
145				150				155				160			
Ala	Asp	Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Gln	Leu	Cys	Gln	Leu	Cys	Pro	Gly	Cys
165				170				175							
Gly	Cys	Ser	Thr	Leu	Asn	Gln	Tyr	Phe	Gly	Tyr	Ser	Gly	Ala	Phe	Lys
180				185				190							
Cys	Leu	Lys	Asp	Gly	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Lys	His	Ser	Thr
195				200				205							
Ile	Phe	Glu	Asn	Leu	Ala	Asn	Lys	Ala	Asp	Arg	Asp	Gln	Tyr	Glu	Leu
210				215				220							
Leu	Cys	Leu	Asp	Asn	Thr	Arg	Lys	Pro	Val	Asp	Glu	Tyr	Lys	Asp	Cys
225				230				235				240			
His	Leu	Ala	Gln	Val	Pro	Ser	His	Thr	Val	Val	Ala	Arg	Ser	Met	Gly
245				250				255							
Gly	Lys	Glu	Asp	Leu	Ile	Trp	Glu	Leu	Leu	Asn	Gln	Ala	Gln	Glu	His
260				265				270							
Phe	Gly	Lys	Asp	Lys	Ser	Lys	Glu	Phe	Gln	Leu	Phe	Ser	Ser	Pro	His
275				280				285							
Gly	Lys	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Asp	Ser	Ala	His	Gly	Phe	Leu	Lys	Val
290				295				300							
Pro	Pro	Arg	Met	Asp	Ala	Lys	Met	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Val	Thr
305				310				315				320			
Ala	Ile	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Gly	Thr	Cys	Pro	Glu	Ala	Pro	Thr	Asp

	325	330	335
Glu Cys Lys Pro Val Lys Trp Cys Ala Leu Ser His His Glu Arg Leu			
	340	345	350
Lys Cys Asp Glu Trp Ser Val Asn Ser Val Gly Lys Ile Glu Cys Val			
	355	360	365
Ser Ala Glu Thr Thr Glu Asp Cys Ile Ala Lys Ile Met Asn Gly Glu			
	370	375	380
Ala Asp Ala Met Ser Leu Asp Gly Gly Phe Val Tyr Ile Ala Gly Lys			
385	390	395	400
Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu Asn Tyr Asn Lys Ser Asp Asn			
	405	410	415
Cys Glu Asp Thr Pro Glu Ala Gly Tyr Phe Ala Val Ala Val Val Lys			
	420	425	430
Lys Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys Gly Lys Lys Ser			
	435	440	445
Cys His Thr Ala Val Gly Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly			
	450	455	460
Leu Leu Tyr Asn Lys Ile Asn His Cys Arg Phe Asp Glu Phe Phe Ser			
465	470	475	480
Glu Gly Cys Ala Pro Gly Ser Lys Lys Asp Ser Ser Leu Cys Lys Leu			
	485	490	495
Cys Met Gly Ser Gly Leu Asn Leu Cys Glu Pro Asn Asn Lys Glu Gly			
	500	505	510
Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Lys Gly Asp			
	515	520	525
Val Ala Phe Val Lys His Gln Thr Val Pro Gln Asn Thr Gly Gly Lys			
	530	535	540
Asn Pro Asp Pro Trp Ala Lys Asn Leu Asn Glu Lys Asp Tyr Glu Leu			
545	550	555	560
Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Glu Glu Tyr Ala Asn Cys			
	565	570	575
His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Thr Arg Lys Asp Lys			
	580	585	590
Glu Ala Cys Val His Lys Ile Leu Arg Gln Gln Gln His Leu Phe Gly			
	595	600	605
Ser Asn Val Thr Asp Cys Ser Gly Asn Phe Cys Leu Phe Arg Ser Glu			
	610	615	620
Thr Lys Asp Leu Leu Phe Arg Asp Asp Thr Val Cys Leu Ala Lys Leu			
625	630	635	640

His Asp Arg Asn Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Glu Glu Tyr Val Lys
 645 650 655
 Ala Val Gly Asn Leu Arg Lys Cys Ser Thr Ser Ser Leu Leu Glu Ala
 660 665 670
 Cys Thr Phe Arg Arg Pro
 675
 <210> 9
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 9
 Gln Val Asp Thr Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val
 1 5 10 15
 Ser Val Phe Gln Glu Glu Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val Leu His
 20 25 30
 Leu Pro Gly Ser Ser Ser Thr Gln Trp Phe Leu Asn Gly Thr Ala Thr
 35 40 45
 Gln Thr Ser Thr Pro Ser Tyr Arg Ile Thr Ser Ala Ser Val Asn Asp
 50 55 60
 Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Arg Gly Leu Ser Gly Arg Ser Asp Pro
 65 70 75 80
 Ile Gln Leu Glu Ile His Arg Gly Trp Leu Leu Leu Gln Val Ser Ser
 85 90 95
 Arg Val Phe Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Ala Trp
 100 105 110
 Lys Asp Lys Leu Val Tyr Asn Val Leu Tyr Tyr Arg Asn Gly Lys Ala
 115 120 125
 Phe Lys Phe Phe His Trp Asn Ser Asn Leu Thr Ile Leu Lys Thr Asn
 130 135 140
 Ile Ser His Asn Gly Thr Tyr His Cys Ser Gly Met Gly Lys His Arg
 145 150 155 160
 Tyr Thr Ser Ala Gly Ile Ser Val Thr Val Lys Glu Leu Phe Pro Ala
 165 170 175
 Pro Val Leu Asn Ala Ser Val Thr Ser Pro Leu Leu Glu Gly Asn Leu
 180 185 190
 Val Thr Leu Ser Cys Glu Thr Lys Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu
 195 200 205
 Gln Leu Tyr Phe Ser Phe Tyr Met Gly Ser Lys Thr Leu Arg Gly Arg
 210 215 220

Asn Thr Ser Ser Glu Tyr Gln Ile Leu Thr Ala Arg Arg Glu Asp Ser
 225 230 235 240
 Gly Leu Tyr Trp Cys Glu Ala Ala Thr Glu Asp Gly Asn Val Leu Lys
 245 250 255
 Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Leu Gln Leu Pro Thr
 260 265 270
 Pro
 <210> 10
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人类
 <400> 10
 Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser
 1 5 10 15
 Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro
 20 25 30
 Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys
 35 40 45
 Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu
 50 55 60
 Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys
 65 70 75 80
 Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys
 85 90 95
 Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu
 100 105 110
 Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly
 115 120 125
 Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln
 130 135 140
 Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro
 145 150 155 160
 His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp
 165 170 175
 Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly
 180 185 190
 Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205
 Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly

210	215	220
Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu		
225	230	235
Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His		240
	245	250
Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys		255
	260	265
Ser Ser		270
<210> 11		
<211> 274		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> FcRn-H166K		
<400> 11		
Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr His Leu Thr Ala Val Ser Ser		
1	5	10
Pro Ala Pro Gly Thr Pro Ala Phe Trp Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro		15
	20	25
Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys		30
	35	40
Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu		45
	50	55
Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys		60
65	70	75
Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys		80
	85	90
Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu		95
	100	105
Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly		110
	115	120
Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln		125
	130	135
Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro		140
145	150	155
His Arg Leu Arg Glu Lys Leu Glu Arg Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp		160
	165	170
Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys Ala Arg Pro Ser Ser Pro Gly		175
	180	185
		190

Phe Ser Val Leu Thr Cys Ser Ala Phe Ser Phe Tyr Pro Pro Glu Leu
 195 200 205
 Gln Leu Arg Phe Leu Arg Asn Gly Leu Ala Ala Gly Thr Gly Gln Gly
 210 215 220
 Asp Phe Gly Pro Asn Ser Asp Gly Ser Phe His Ala Ser Ser Ser Leu
 225 230 235 240
 Thr Val Lys Ser Gly Asp Glu His His Tyr Cys Cys Ile Val Gln His
 245 250 255
 Ala Gly Leu Ala Gln Pro Leu Arg Val Glu Leu Glu Ser Pro Ala Lys
 260 265 270

Ser Ser

<210> 12

<211> 79

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LRP-CR5-6

<400> 12

Thr Cys Pro Pro Asn Gln Phe Ser Cys Ala Ser Gly Arg Cys Ile Pro
 1 5 10 15
 Ile Ser Trp Thr Cys Asp Leu Asp Asp Asp Cys Gly Asp Arg Ser Asp
 20 25 30
 Glu Ser Ala Ser Cys Ala Tyr Pro Thr Cys Phe Pro Leu Thr Gln Phe
 35 40 45
 Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile Asn Ile Asn Trp Arg Cys Asp Asn
 50 55 60
 Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Ala Gly Cys Ser His
 65 70 75

<210> 13

<211> 83

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> LRP-CR6-7

<400> 13

Thr Cys Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile
 1 5 10 15
 Asn Ile Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser
 20 25 30

Asp Glu Ala Gly Cys Ser His Ser Cys Ser Ser Thr Gln Phe Lys Cys
 35 40 45
 Asn Ser Gly Arg Cys Ile Pro Glu His Trp Thr Cys Asp Gly Asp Asn
 50 55 60
 Asp Cys Gly Asp Tyr Ser Asp Glu Thr His Ala Asn Cys Thr Asn Gln
 65 70 75 80
 Ala Thr Arg
 <210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> LRP-CR6
 <400> 14
 Thr Cys Phe Pro Leu Thr Gln Phe Thr Cys Asn Asn Gly Arg Cys Ile
 1 5 10 15
 Asn Ile Asn Trp Arg Cys Asp Asn Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser
 20 25 30
 Asp Glu Ala Gly Cys Ser His
 35
 <210> 15
 <211> 243
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC
 <400> 15
 Met Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
 20 25 30
 Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Met Gly Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Tyr Gly Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Leu Pro
 85 90 95

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Lys Leu Gly Gly Gly Gly
 100 105 110
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Gln Leu
 115 120 125
 Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu
 130 135 140
 Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Val His Trp
 145 150 155 160
 Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp
 165 170 175
 Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala
 180 185 190
 Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser
 195 200 205
 Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Leu
 210 215 220
 Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 225 230 235 240

Val Ser Ser

<210> 16

<211> 258

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 接头-SC 抗 GPIIIa-1-HC-LC

<400> 16

Met Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Met Ser Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Thr Val Ser Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser
 20 25 30
 Asn Ile Gly Trp Leu Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Phe Met Gly Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Tyr Gly Thr Asn Leu Val Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Asp
 65 70 75 80
 Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Ala Gln Leu Pro
 85 90 95
 Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Lys Leu Gly Gly Gly Gly

100	105	110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Gln Leu		
115	120	125
Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu		
130	135	140
Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Val His Trp		
145	150	155
Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp		
165	170	175
Pro Ala Asn Gly Tyr Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala		
180	185	190
Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser		
195	200	205
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Pro Leu		
210	215	220
Tyr Asp Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr		
225	230	235
Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly		
245	250	255

Gly Ser

<210> 17

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SC 抗 GPIIIa-2-HC-LC

<400> 17

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr		
1	5	10
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		
20	25	30
Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		
85	90	95

Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser
 145 150 155 160
 Ser Arg Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe
 165 170 175
 Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser
 180 185 190
 Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly
 210 215 220
 Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 245

<210> 18

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> SC 抗 GPIIIa-2-LC-HC

<400> 18

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Arg Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Cys Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115 120 125
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
 145 150 155 160
 Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 165 170 175
 Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Asn Lys Tyr Asn Glu Asn Phe
 180 185 190
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 195 200 205
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 210 215 220
 Ala Arg Glu Tyr Gly Asn Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Ser Trp Gly Gln
 225 230 235 240
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 19

<211> 46

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> ABD035

<400> 19

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

<210> 20

<211> 865

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 序列 A

<400> 20

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu

1 5 10 15

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu

20 25 30

Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu

35 40 45

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr

50 55 60

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro

65 70 75 80

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro

85 90 95

Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala

100 105 110

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro

115 120 125

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro

130 135 140

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala

145 150 155 160

Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu

165 170 175

Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro

180 185 190

Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr

195 200 205

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro

210 215 220

Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro

225 230 235 240

Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr

245 250 255

Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro

260 265 270

Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro

275 280 285

Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu

290 295 300

Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly			
305	310	315	320
Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro			
	325	330	335
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr			
	340	345	350
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu			
	355	360	365
Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro			
	370	375	380
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Thr			
385	390	395	400
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr			
	405	410	415
Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro			
	420	425	430
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro			
	435	440	445
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro			
	450	455	460
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro			
465	470	475	480
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr			
	485	490	495
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro			
	500	505	510
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu			
	515	520	525
Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala			
	530	535	540
Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro			
545	550	555	560
Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro			
	565	570	575
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro			
	580	585	590
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro			
	595	600	605
Glu Ser Gly Pro Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro			

610	615	620
Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr		
625	630	635
Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr		
645	650	655
Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro		
660	665	670
Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu		
675	680	685
Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr		
690	695	700
Ser Thr Glu Glu Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr Ser Thr Glu Glu		
705	710	715
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Thr Ser Glu		
725	730	735
Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro		
740	745	750
Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Gly Pro		
755	760	765
Gly Ser Glu Pro Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Glu Pro		
770	775	780
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Ser Pro Ala Gly Ser Pro Thr		
785	790	795
Ser Thr Glu Glu Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro		
805	810	815
Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro Gly Ser Glu Pro		
820	825	830
Ala Thr Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser Glu Ser Ala Thr Pro		
835	840	845
Glu Ser Gly Pro Gly Thr Ser Thr Glu Pro Ser Glu Gly Ser Ala Pro		
850	855	860

Gly

865

<210> 21

<211> 400

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> ELP80

<400> 21

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly

1 5 10 15

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val

20 25 30

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

35 40 45

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly

50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val

65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

85 90 95

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val

100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro

115 120 125

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

130 135 140

Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly

145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly

165 170 175

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val

180 185 190

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

195 200 205

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

210 215 220

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val

225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly

245 250 255

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

260 265 270

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro

275 280 285

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly

290 295 300

His Trp Thr Asp Glu Val His His Gly Thr Lys Asn Leu Gly Pro Ile

50	55	60
Gln Leu Phe Tyr Thr Arg Arg Asn Thr Gln Glu Trp Thr Gln Glu Trp		
65	70	75
Lys Glu Cys Pro Asp Tyr Val Ser Ala Gly Glu Asn Ser Cys Tyr Phe		80
	85	90
Asn Ser Ser Phe Thr Ser Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr		95
	100	105
Ser Asn Gly Gly Thr Val Asp Glu Lys Cys Phe Ser Val Asp Glu Ile		110
	115	120
Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile Ala Leu Asn Trp Thr Leu Leu Asn Val		125
	130	135
Ser Leu Thr Gly Ile His Ala Asp Ile Gln Val Arg Trp Glu Ala Pro		140
145	150	155
Arg Asn Ala Asp Ile Gln Lys Gly Trp Met Val Leu Glu Tyr Glu Leu		160
	165	170
Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Thr Lys Trp Lys Met Met Asp Pro Ile		175
	180	185
Leu Thr Thr Ser Val Pro Val Tyr Ser Leu Lys Val Asp Lys Glu Tyr		190
	195	200
Glu Val Arg Val Arg Ser Lys Gln Arg Asn Ser Gly Asn Tyr Gly Glu		205
	210	215
Phe Ser Glu Val Leu Tyr Val Thr Leu Pro Gln Met Ser Gln		220
225	230	235

<210> 24

<211> 45

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FIX298-342

<400> 24

Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr Val Ser Gly Trp Ala Arg Val

1	5	10	15
---	---	----	----

Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro

20	25	30
----	----	----

Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg Ser Thr Lys Phe

35	40	45
----	----	----

<210> 25

<211> 80

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> FIX47-125

<400> 25

Asp	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser
1				5					10					15	
Cys	Lys	Asp	Asp	Ile	Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe
			20					25					30		
Glu	Gly	Lys	Asn	Cys	Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly
		35					40					45			
Arg	Cys	Glu	Gln	Phe	Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys
	50					55					60				
Ser	Cys	Thr	Glu	Gly	Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu
65					70					75				80	

<210> 26

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> vWF1-272

<400> 26

Ser	Leu	Ser	Cys	Arg	Pro	Pro	Met	Val	Lys	Leu	Val	Cys	Pro	Ala	Asp
1				5					10					15	
Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr
			20					25					30		
Asp	Leu	Glu	Cys	Met	Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro
		35					40					45			
Pro	Gly	Met	Val	Arg	His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Cys
	50					55				60					
Pro	Cys	Phe	His	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys
65				70					75					80	
Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Cys	Arg	Asp	Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr
			85					90					95		
Asp	His	Val	Cys	Asp	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr
		100						105				110			
Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr
		115					120					125			
Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile
	130						135					140			

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys			
145	150	155	160
Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly			
	165	170	175
Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val			
	180	185	190
Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser			
	195	200	205
Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr			
	210	215	220
Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln			
225	230	235	240
Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val			
	245	250	255
Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg			
	260	265	270

<210> 27

<211> 1390

<212> PRT

<213> 人类

<400> 27

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp			
1	5	10	15
Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr			
	20	25	30
Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro			
	35	40	45
Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys			
	50	55	60
Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys			
65	70	75	80
Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr			
	85	90	95
Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr			
	100	105	110
Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr			
	115	120	125
Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile			
	130	135	140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys			
145	150	155	160
Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly			
	165	170	175
Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val			
	180	185	190
Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser			
	195	200	205
Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr			
	210	215	220
Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln			
225	230	235	240
Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val			
	245	250	255
Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg			
	260	265	270
Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met			
	275	280	285
Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val			
	290	295	300
Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val			
305	310	315	320
Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys			
	325	330	335
Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly			
	340	345	350
Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu			
	355	360	365
Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn			
	370	375	380
Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu			
385	390	395	400
Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro			
	405	410	415
Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp			
	420	425	430
Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys			
	435	440	445
Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys			

450	455	460
Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu		
465	470	475
Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val		480
	485	490
Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu		495
	500	505
Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala		510
	515	520
Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu		525
	530	535
Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp		540
545	550	555
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu		560
	565	570
Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala		575
	580	585
Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys		590
	595	600
Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser		605
	610	615
Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly		620
625	630	635
Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His		640
	645	650
Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn		655
	660	665
Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp		670
	675	680
Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro		685
	690	695
Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu		700
705	710	715
Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val		720
	725	730
Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn		735
	740	745
Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly		750
	755	760
		765

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr			
770	775	780	
Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln			
785	790	795	800
Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly			
	805	810	815
Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly			
	820	825	830
Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro			
	835	840	845
Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro			
	850	855	860
Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly			
865	870	875	880
Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg			
	885	890	895
Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu			
	900	905	910
Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp			
	915	920	925
Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe			
	930	935	940
Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile			
945	950	955	960
Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr			
	965	970	975
Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu			
	980	985	990
Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly			
	995	1000	1005
Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His			
	1010	1015	1020
Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr			
	1025	1030	1035
Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg			
	1040	1045	1050
Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr			
	1055	1060	1065
Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser			

1070	1075	1080
Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val		
1085	1090	1095
Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val		
1100	1105	1110
Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp		
1115	1120	1125
Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro		
1130	1135	1140
Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg		
1145	1150	1155
Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val		
1160	1165	1170
Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro Cys Val Cys Thr		
1175	1180	1185
Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp Gly Gln Asn Phe		
1190	1195	1200
Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe Gln Asn Lys Glu		
1205	1210	1215
Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly		
1220	1225	1230
Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala		
1235	1240	1245
Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly		
1250	1255	1260
Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn		
1265	1270	1275
Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly		
1280	1285	1290
His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln		
1295	1300	1305
Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly		
1310	1315	1320
Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly		
1325	1330	1335
Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val		
1340	1345	1350
Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu Glu Gln Cys		
1355	1360	1365

Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu
 1370 1375 1380
 Phe Ala Glu Cys His Lys Val
 1385 1390
 <210> 28
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> vWF497-716-R545A
 <400> 28
 Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
 1 5 10 15
 Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
 20 25 30
 Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
 35 40 45
 Ala Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 50 55 60
 Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 65 70 75 80
 Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 85 90 95
 Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 100 105 110
 Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu Leu Met Ala Ser
 115 120 125
 Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 130 135 140
 Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 145 150 155 160
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 165 170 175
 Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 180 185 190
 Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 195 200 205
 Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly
 210 215 220

<210> 29

<211> 269

<212> PRT

<213> 人类

<400> 29

Asn Pro Glu Leu Lys Asp Phe Asn Glu Glu Glu Gln Leu Lys Cys Asp

1 5 10 15

Leu Glu Leu Asn Lys Leu Glu Asn Gln Ile Leu Met Leu Gly Lys Thr

20 25 30

Phe Tyr Gln Asn Tyr Arg Asp Asp Val Glu Ser Leu Tyr Ser Lys Leu

35 40 45

Asp Leu Ile Met Gly Tyr Lys Asp Glu Glu Arg Ala Asn Lys Lys Ala

50 55 60

Val Asn Lys Arg Met Leu Glu Asn Lys Lys Glu Asp Leu Glu Thr Ile

65 70 75 80

Ile Asp Glu Phe Phe Ser Asp Ile Asp Lys Thr Arg Pro Asn Asn Ile

85 90 95

Pro Val Leu Glu Asp Glu Lys Gln Glu Glu Lys Asn His Lys Asn Met

100 105 110

Ala Gln Leu Lys Ser Asp Thr Glu Ala Ala Lys Ser Asp Glu Ser Lys

115 120 125

Arg Ser Lys Arg Ser Lys Arg Ser Leu Asn Thr Gln Asn His Lys Pro

130 135 140

Ala Ser Gln Glu Val Ser Glu Gln Gln Lys Ala Glu Tyr Asp Lys Arg

145 150 155 160

Ala Glu Glu Arg Lys Ala Arg Phe Leu Asp Asn Gln Lys Ile Lys Lys

165 170 175

Thr Pro Val Val Ser Leu Glu Tyr Asp Phe Glu His Lys Gln Arg Ile

180 185 190

Asp Asn Glu Asn Asp Lys Lys Leu Val Val Ser Ala Pro Thr Lys Lys

195 200 205

Pro Thr Ser Pro Thr Thr Tyr Thr Glu Thr Thr Thr Gln Val Pro Met

210 215 220

Pro Thr Val Glu Arg Gln Thr Gln Gln Gln Ile Ile Tyr Asn Ala Pro

225 230 235 240

Lys Gln Leu Ala Gly Leu Asn Gly Glu Ser His Asp Phe Thr Thr Thr

245 250 255

His Gln Ser Pro Thr Thr Ser Asn His Thr His Asn Asn

260 265

<210> 30

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> hCG C-端

<400> 30

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg

1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln

20 25

<210> 31

<211> 50

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> F10AP

<400> 31

Ser Val Ala Gln Ala Thr Ser Ser Ser Gly Glu Ala Pro Asp Ser Ile

1 5 10 15

Thr Trp Lys Pro Tyr Asp Ala Ala Asp Leu Asp Pro Thr Glu Asn Pro

20 25 30

Phe Asp Leu Leu Asp Phe Asn Gln Thr Gln Pro Glu Arg Gly Asp Asn

35 40 45

Asn Leu

50