



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103946235 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201280057127. 6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 11. 02

C07K 14/755 (2006. 01)

(30) 优先权数据

11189861. 5 2011. 11. 21 EP

61/563, 188 2011. 11. 23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/071701 2012. 11. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/075926 EN 2013. 05. 30

(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 L. B. 约翰逊 M. P. 科林德

P. L. 诺拜

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 权陆军

权利要求书1页 说明书16页

序列表17页

(54) 发明名称

用于生产因子 VIII 的方法

(57) 摘要

本发明涉及在哺乳动物培养物中生产因子 VIII 多肽的方法。

1. 用于生产因子 VIII 多肽的方法,所述方法包括:
 - a) 在使所述多肽表达的条件下培养能够表达因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞;和
 - b) 在步骤 (a) 期间或步骤 (a) 之后,使所述细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述方法进一步包括在所述细胞的生存力是至少 80% 的时间点,收获因子 VIII 多肽的步骤。
3. 权利要求 1-2 中任一项的方法,其中所述方法进一步包括在 2-3 天后收获因子 VIII 多肽的步骤。
4. 权利要求 1 的方法,其中将所述哺乳动物细胞培养在细胞培养基中,并且其中所述因子 VIII 多肽是人因子 VIII 多肽。
5. 前述权利要求中任一项的方法,其中通过 i) 将所述试剂与因子 VIII 共表达,或 ii) 向培养所述细胞的培养基添加所述试剂,使所述试剂接触所述哺乳动物细胞。
6. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述试剂是特异性结合磷脂酰丝氨酸的蛋白,优选乳凝集素、膜联蛋白 V、抗磷脂抗体或因子 VIII 轻链。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述乳凝集素、膜联蛋白 V 或因子 VIII 轻链以 0.01 至 100 μ M 的浓度添加或共表达。
8. 前述权利要求中任一项的方法,其中使一种、两种、三种或更多种能够结合细胞膜上的磷脂酰丝氨酸的试剂接触所述哺乳动物细胞。
9. 前述权利要求中任一项的方法,其中乳凝集素、膜联蛋白 V、抗脂质抗体或因子 VIII 轻链与正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白一起接触所述哺乳动物细胞。
10. 前述权利要求中任一项的方法,其中所述哺乳动物细胞培养在不含动物来源组分的细胞培养基中,其中所述方法进一步包括分离所述因子 VIII 多肽和将所述因子 VIII 多肽配制到药物组合物中。
11. 前述权利要求中任一项的方法,其中从培养所述哺乳动物细胞的细胞培养基分离所述因子 VIII 多肽,而基本不降低细胞的生存力,其中优选至少 85% 的细胞保持存活。
12. 前述权利要求中任一项的方法,其中在分离所述因子 VIII 多肽后,将相同的细胞用于根据前述权利要求中任一项的方法中。
13. 细胞培养基,其不含血清并且包含:i) 选自乳凝集素、膜联蛋白 V、抗磷脂抗体和因子 VIII 轻链的试剂,和 ii) 正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白。
14. 能够结合磷脂酰丝氨酸的试剂用于提高可以从哺乳动物细胞培养物分离的因子 VIII 的产量的用途。

用于生产因子 VIII 的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用于生产因子 VIII 多肽的方法。

[0002] 发明背景

因子 VIII 是重要的凝血因子。导致因子 VIII 蛋白减少或缺陷的因子 VIII 基因中的突变引起遗传疾病血友病 A, 其特征在于复发性的出血发作。血友病 A 的治疗需要血浆来源或重组的因子 VIII 的静脉输注。

[0003] 尽管血浆来源的因子 VIII 可用于治疗血友病, 但这种方法有多种问题, 包括病毒向患者的传播。因此, 优选施用已重组表达的因子 VIII。

[0004] 难以从细胞培养物获得大量的因子 VIII。已知因子 VIII 以非常低的水平在哺乳动物细胞中表达。也已知因子 VIII 是在无血清或无蛋白培养基中不稳定的蛋白。各种物质的添加已用于改进重组生产的因子 VIII 的产量。例如, 使用高强度的缓冲液提高因子 VIII 的产量。然而, 这种苛刻的处理不允许细胞的后续重新使用。

[0005] 尽管对因子 VIII 调控有所了解, 但在商业制造使用的异源系统中, 因子 VIII 的产量依旧显著低于其他重组蛋白。WO 2008/135501 公开了使用结合因子 VIII 的 C2 结构域的配体 (例如, 正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS)) 获得改进的因子 VIII 产量。然而, 需要进一步提高可以从细胞培养物分离的因子 VIII 的产量的方法和组合物。

发明内容

[0006] 本发明人意外地发现通过使培养细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂, 释放到培养基且随后收获的因子 VIII 的量大幅增加。具体地, 与向细胞基添加结合因子 VIII 的 C2 结构域的试剂 OPLS 时所见的产量相比, 因子 VIII 的产量显著增加。

[0007] 因此, 本发明提供了用于生产因子 VIII 多肽的方法, 所述方法包括:

- a) 在使所述多肽表达的条件下培养能够表达因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞; 和
- b) 在步骤 (a) 期间或步骤 (a) 之后, 使所述细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂。

[0008] 本发明进一步提供了:

- 细胞培养基, 其不含血清并且包含: i) 选自乳凝集素、膜联蛋白 V、抗磷脂抗体和因子 VIII 轻链的试剂, 和 ii) 正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白。

- 能够结合磷脂酰丝氨酸的化合物用于提高可以从哺乳动物细胞培养物分离的因子 VIII 的产量的用途。

[0009] 序列

SEQ ID NO: 1 (人 B- 结构域缺失的因子 VIII):

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFPFNTSVVYKKTLEFVEFT
 DHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDD
 QTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALL
 VCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGY
 VNRSPLGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTL

MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRF
 DDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGR
 KYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRP
 LYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLI
 GPLLICYSVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYL TENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQA
 SNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPF
 SGETVFMSMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKN
 NAIERSFSQNSRHPSQNPPVLKRHQREITR TTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDE
 NQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFEFTDGSFT
 QPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRF
 VKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAH
 GRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTL
 PGLVMAQDQRRIRWYLLSMGSENENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLP
 SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLA
 RLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTY
 RGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPL
 GMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTM
 KVTGVTTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDP
 PLLTRYLRIHQPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY

SEQ ID NO: 2 (人膜联蛋白 V):

MAQVLRGTVTDFPGFDERADAETLRKAMKGLGTDEESIL TLLTSRSNAQRQEISAA
 FKTLFGRDLLDDLKSELTKFEKLIVALMKPSRLYDAYELKHALKGAGTNEKVLTEIIASRTP
 ELRAIKQVYEEYESSLEDDVVGDTSGYYQRMLVLLQANRDPDAGIDEAQVEQDAQALFQ
 AGELKWGTDEEKFITIFGTRSVSHLRKVFDKYMTISGFQIEETIDRETSNLEQLLLAVVKSIR
 SIPAYLAETLYAMKGAGTDDHTLRVMVSRSEIDLFNIRKEFRKNFATSLYSMIKGDTS GDY
 KKALLLLCGEDD

SEQ ID NO: 3 (人乳凝集素):

LDICSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVFPSTCTCLKGYAGNHCETKCV EPLGMEN
 GNIANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLN RAGMVNAWTPSSNDDNPWIQVNLLRRMWV
 TGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFDFIHDVNKKHKEFVGNWNKNVHVNL FETP
 VEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFS
 WNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYK
 VAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHSKKNL FETPILARYVRILPVAWHNRIALRL
 ELLGC

SEQ ID NO: 4 (人因子 VIII 轻链):

EITRRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVER
 LWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPQFKKVVVFQEFDTGDSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRA
 EVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMMAPT
 KDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSLGIGLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETGS
 WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQQRIRWYLLSMG
 SNEIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGM
 STFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWI
 KVDLLAPMIIHGKIQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSG
 IKHNIFNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN
 MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYV
 KEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIAL
 RMEVLGCEAQDLY

SEQ ID NO: 5 (人乳凝集素的 C2 结构域的残基 207-364):

CANPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYG
 NDQWLQVDLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFP
 GNWDNHSHKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIRLRELLGC

SEQ ID NO: 6 (人因子 VIII 轻链的 C2 结构域):

CSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPK
 EWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFGQNG
 DSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVLGC

SEQ ID NO:7 :CD33-FLAG- 乳凝集素

MPLLLLLLPLWAGALADYKDDDDKGGGSLDICKSKNPCHNGGLCEEISQEVRGDVF
 PSYTCTCLKGYAGNHCETKCVPEPLGMENGNANSQIAASSVRVTFGLQHWVPELARLNRA
 GMVNAWTPSSNDDNPWIQVNULLRRMWVTGVVTQGASRLASHEYLKAFKVAYSLNGHEFD
 FIHDVNVKHKHEFVGNWNKNAVHVNLFETPVEAQYVRLYPTSCHTACTLRFELLGCELNGCA
 NPLGLKNNSIPDKQITASSSYKTWGLHLFSWNPSYARLDKQGNFNAWVAGSYGNDQWLQV
 DLGSSKEVTGIITQGARNFGSVQFVASYKVAYSNDSANWTEYQDPRTGSSKIFPGNWDNHS
 HKKNLFETPILARYVRILPVAWHNRIRLRELLGC

[0010] 发明详述

本发明源自于预想不到的发现,即,使表达因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂,大幅提高了可从细胞培养基收获的因子 VIII 的产量。本发明因此涉及用于生产因子 VIII 多肽的方法,包括:a) 在使所述多肽表达的条件下培养能够表达因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞;和 b) 在步骤 (a) 期间或步骤 (a) 之后,使所述细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂。

[0011] 因子 VIII 多肽

成熟的人因子 VIII 分子由 2332 个氨基酸组成,其可以分成按 A1-A2-B-A3-C1-C2 顺序

排列的 3 个同源 A 结构域, 2 个同源 C 结构域, 和 B 结构域。由经过源自 B- 结构域的小接头连接的因子 VIII 的重链 (HC) 和轻链 (LC) 组成的因子 VIII 分子 (B 结构域缺失的因子 VIII 或 BDD-FVIII) 保留了全长 (天然) 因子 VIII 的生物活性。

[0012] 如本文使用的“因子 VIII 多肽”包括但不限于因子 VIII, 以及因子 VIII- 相关的多肽, 优选人因子 VIII。

[0013] “因子 VIII 多肽”包括具有如 Toole 等人, *Nature* 1984, 312: 342-347 中描述的氨基酸序列的多肽 (野生型人因子 VIII), 以及源自其他物种的野生型因子 VIII, 例如, 如牛、猪、犬、鼠和鲑鱼因子 VIII。优选地, 所述因子 VIII 多肽是人因子 VIII 多肽。最优选地, 所述人因子 VIII 多肽是 B- 结构域缺失 / 截短的人因子 VIII。

[0014] 因子 VIII- 相关的多肽, 包括变体, 涵盖当在用于因子 VIII 的生物活性的测定中测试时, 显示至少约 10%、至少约 20%、至少约 30%、至少约 40%、至少约 50%、至少约 60%、至少约 70%、至少约 80%、至少约 90%、至少约 100%、至少约 110%、至少约 120%, 和至少约 130% 的在相同细胞类型中产生的野生型因子 VIII 的比活性的那些。

[0015] 用于因子 VIII 的生物活性的测试是本领域中熟知的。例如, 一种技术涉及测试因子 VIII 的样品在钙和磷脂的存在下, 通过因子 IXa 刺激因子 X 的活化的能力。

[0016] B- 结构域缺失的人因子 VIII 的多肽序列在 SEQ ID NO:1 中给出。

[0017] 载体

编码因子 VIII 的核酸分子可以以表达盒的形式提供, 其包含可操作地连接到插入序列的控制序列, 由此允许本发明的多肽在目标细胞中的体内表达。这些表达盒进而典型地提供在载体 (例如质粒, 或重组病毒载体) 中。因此, 用于本发明的多肽可通过将这样的载体递送到细胞中并允许发生从所述载体的转录而获得。

[0018] 哺乳动物宿主细胞

本发明的方法涉及在哺乳动物细胞中生产因子 VIII。可使用适合用于在培养物中生产因子 VIII 的任何哺乳动物宿主细胞。例如, 所述宿主细胞可源自人、鼠或啮齿动物细胞。所述宿主细胞还可用于表达因子 VIII 之外的目标多肽。例如, 可通过将能够结合磷脂酰丝氨酸的多肽与因子 VIII 共表达, 使所述多肽接触表达因子 VIII 的哺乳动物细胞。

[0019] 当使用在其中异源表达多于一种目标多肽, 例如因子 VIII 多肽和能够结合磷脂酰丝氨酸的多肽二者的细胞系时, 这些蛋白可以从单个载体或从两个分离的载体表达。载体中可存在多于一个拷贝的蛋白编码序列。

[0020] 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, 特别是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

[0021] 细胞培养 (物)

在一些实施方式中, 在实施本发明中使用的细胞能够在悬浮培养中生长。如本文使用的, 悬浮 - 感受态细胞是能够悬浮生长而不产生大的、坚固聚集体的那些细胞, 即, 单分散或生长在每个聚集集体中只有少数细胞的松散聚集集体中的细胞。

[0022] 用于实施本发明的细胞可以是粘附细胞 (也称作锚定 - 依赖性 or 连接 - 依赖性细胞)。如本文使用的, 粘附细胞是需要将其本身粘附或锚定至适合表面以用于繁殖和生长的那些细胞。

[0023] 细胞生存力

细胞生存力是基于总细胞样品,确定存活或死亡的细胞。细胞死亡可分成两个不同的事件,坏死和凋亡。坏死是由于疾病或损伤导致的细胞死亡。细胞膨胀,其质膜变为破损的,并且细胞内容物释放到细胞外间隙,在此,它们常常激发炎性反应。坏死过程是不受调控的。另一方面,凋亡是允许细胞在受到凋亡激发刺激时自我破坏的机制。它在细胞不再被需要时,或细胞成为生物健康的威胁时,或出于其他原因而被启动。

[0024] 用于细胞生存力的测试通常涉及观察样品细胞群,并将细胞染色,或施加化学品以显示哪些细胞是存活的,以及哪些是死亡的。有多种用于测量细胞生存力的测试和方法。

[0025] 在大多数正常和存活的真核细胞中,带负电的磷脂:磷脂酰丝氨酸(PS)定位在质膜脂双层的胞质侧。磷脂酰丝氨酸在真核细胞凋亡期间从内层(inner leaflet)重新分布到外层。膜联蛋白V是与磷脂酰丝氨酸(PS)反应的Ca⁺⁺依赖性磷脂结合蛋白。可通过将细胞与荧光标记的膜联蛋白V培育,在流式细胞术中检测凋亡。在坏死的早期,细胞膜变为破损的,并且膜联蛋白V也能够接近这些细胞内层中的PS。

[0026] 用于检测膜通透性的方法是常见的染料排斥法。荧光DNA-结合探针,如碘化丙啶(PI)和7-氨基放线菌素D(7-AAD),进入死亡细胞并将DNA染色。不需要流式细胞术知识的染料排斥法是使用台盼蓝和血细胞计数器的用于显微镜方法的染料排斥方法。

[0027] 确定生存力的其他方式是基于细胞的ATP含量,这是代谢活细胞的指示。CellTiter-GLO试剂盒将ATP转化为荧光,其与细胞的生存力成正比。这个方法是相对的,并且不可用于研究单个细胞。

[0028] 大规模动物细胞培养广泛用于制药工业和生物技术公司的治疗性蛋白的生产中。经历培养基消耗的细胞将通过凋亡(饥饿诱导的凋亡)死亡,并且只有在高胁迫水平(例如,pH突然下降,或高浓度毒素),细胞才通过坏死死亡。

[0029] FVIII和FVIIIa确实由于其本质而结合到通过暴露于磷脂酰丝氨酸而活化的血小板,并且FVIIIa/FIXa复合物是在这种细胞表面上活化体内的FX。凋亡细胞或来自坏死细胞的膜片段上的磷脂酰丝氨酸也通过FVIII结合。在动物细胞培养物中生产FVIII将导致FVIII结合至死细胞,并且FVIII蛋白因此被“截留”在该处。

[0030] 细胞培养基

术语“细胞培养基”(或简称“培养基”)是指用于哺乳动物细胞生长的营养溶液,其通常提供来自以下类别中的一个或多个的至少一种组分:(1)促成培养基的渗透度的,例如钠、钾、镁和钙的盐;(2)能量来源,通常为碳水化合物的形式,例如葡萄糖;(3)所有必需氨基酸,和通常20种氨基酸的基本组;(4)维生素和/或以低浓度需要的其他有机化合物;和(5)微量元素,其中微量元素定义为通常以非常低的浓度,通常在微摩尔范围需要的无机化合物。营养溶液可任选地补充来自任何以下类别的一种或多种组分:(a)激素和其他生长因子,例如,如胰岛素、转铁蛋白和表皮生长因子;和(b)蛋白和组织的水解物。优选地,所述细胞培养基不包含任何动物来源的组分。

[0031] 在一个实施方式中,所述培养基缺少动物来源的组分并且缺少蛋白(“不含蛋白”)。缺少动物来源的组分和/或蛋白的培养基可来自于商业供应商,例如,如Sigma、JRH Biosciences、Gibco、Hyclone和Gemini。

[0032] 在一个实施方式中,所述细胞培养基不含血清。优选地,所述细胞培养基包含小于0.25体积%的血清。在进一步的实施方式中,所述培养基完全不含蛋白(“不含蛋白”)并

且缺少动物来源的组分。

[0033] 优选地,在本发明的方法中,将能够表达人因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞培养在不含动物来源组分的细胞培养基中,并且通过将结合磷脂酰丝氨酸的试剂,例如乳凝集素,添加到培养基中,使所述细胞接触所述试剂。优选地,在本发明的方法中,将能够表达人因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞培养在不含动物来源组分的细胞培养基中,并且通过将结合磷脂酰丝氨酸的试剂,例如膜联蛋白 V,添加到培养基中,使所述细胞接触所述试剂。关于本发明,所述试剂可以在 0.01 至 100 μM 之间的浓度添加到培养基,例如,如 0.01-50 μM 、0.01-25 μM 、0.01-10 μM ,或 0.01-1 μM 、0.01-0.1 μM 、0.1-100 μM 、0.1-50 μM 、0.1-25 μM 、0.1-10 μM 、0.1-1 μM 、1-100 μM 、1-50 μM 、1-25 μM 、1-10 μM 、10-100 μM 、10-50 μM ,或 10-25 μM 。

[0034] 在本发明的方法中,可通过向培养基中添加结合磷脂酰丝氨酸的一种或多种试剂,使其接触培养细胞。所述细胞培养基还可包含减少因子 VIII 与细胞膜结合和 / 或改进因子 VIII 的稳定性或滴度的额外试剂。例如,可将试剂,例如正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS)、抗凋亡蛋白或肝素,添加到培养基中。

[0035] 在本发明的一个实施方式中,提供了细胞培养基,其不含血清并且包含:i) 选自乳凝集素、膜联蛋白 V、抗磷脂抗体和因子 VIII 轻链的化合物,和 ii) 正磷酸 -L- 丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白,用于在本发明的方法中使用。最优选地,所述培养基不含动物来源的组分并且包含乳凝集素和 OPLS。本发明的不含动物来源组分的培养基可包含因子 VIII 轻链和 OPLS。通常,OPLS 在培养基中的浓度在 1 μM 和 100mM 之间,在 10 μM 和 50mM 之间,在 100 μM 和 50mM 之间,在 1 mM 和 50mM 之间,或在 1 mM 和 30mM 之间。

[0036] 大规模培养条件

本发明特别涉及大规模生产。术语“大规模生产”是指包括至少 100L 的培养容器的生产。然而,在优选的实施方式中,所述规模通常是至少 250L,例如至少 500L,例如至少 1000L 或甚至 5000L 或更多。术语“大规模”可以与术语“工业规模”和“生产规模”交换使用。

[0037] 细胞培养物与结合磷脂酰丝氨酸的试剂的接触

在本发明的一个实施方式中,使结合磷脂酰丝氨酸的一种或多种试剂接触生产因子 VIII 的培养细胞。进一步地,除了结合磷脂酰丝氨酸的试剂之外,还可以使减少因子 VIII 与细胞膜结合和 / 或改进因子 VIII 的稳定性或滴度的一种或多种额外试剂接触培养细胞。

[0038] 能够结合磷脂酰丝氨酸的任何试剂均可用于本发明的方法中。结合磷脂酰丝氨酸的试剂可以是,或可以包含多肽、抗体、抗体片段、多核苷酸、小分子或其他试剂。

[0039] 通常,结合磷脂酰丝氨酸的试剂能够减少因子 VIII 与细胞膜上的磷脂酰丝氨酸的结合。所述试剂可以与因子 VIII 竞争结合磷脂酰丝氨酸。优选的试剂是与不存在所述试剂的情况下所见的结合相比,至少 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% 减少因子 VIII 与细胞膜结合的那些试剂。

[0040] 结合磷脂酰丝氨酸的试剂优选提高从细胞培养物分离的因子 VIII 的产量。典型地,因子 VIII 的产量是从细胞培养基分离的。因此,优选的试剂是与不存在所述试剂的情况下因子 VIII 的产量或释放相比,至少 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% 提高因子 VIII 的产量,或释放到培养基中的因子 VIII 的量的那些试剂。

[0041] 可使用竞争性结合测定鉴定竞争性地结合在细胞膜上的磷脂酰丝氨酸的试剂。这种技术涉及使用未标记和标记的分析物,其竞争细胞膜上的磷脂酰丝氨酸。竞争性结合测定的普通技术是本领域中熟知的。这种测定给出随着目标分析物的浓度增加而降低的信号。可使用竞争性测定方法,通过其与因子 VIII 竞争结合至细胞膜的能力,检测结合磷脂酰丝氨酸的试剂。例如,可通过其在竞争性测定中,至少 50% 降低因子 VIII 与细胞膜结合的能力,鉴定结合磷脂酰丝氨酸并且适合用于本发明方法中的试剂。

[0042] 用于本发明方法的膜联蛋白 V (膜联蛋白 A5 或血管抗凝 α 蛋白) 可以是天然发生的膜联蛋白 V 多肽或仍能够结合磷脂酰丝氨酸的其片段或变体。所述变体多肽可以是物种同源物,例如哺乳动物同源物 (通常为人、灵长类或小鼠、大鼠或其他啮齿动物同源物)。优选地,膜联蛋白 V 是人膜联蛋白 V。适合的人膜联蛋白 V 多肽可包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列,由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成,或基本由 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列组成。适合的膜联蛋白 V 序列可以是能够结合磷脂酰丝氨酸的此序列的片段或变体。例如,膜联蛋白 V 的变体可以是其取代、缺失或添加变体或片段。

[0043] 优选地,天然发生的膜联蛋白 V 的片段或变体能够与因子 VIII 竞争细胞膜上的结合位点。通常,所述片段或变体保留至少一个细胞膜结合结构域。所述片段或变体还可保留形成阻断因子 VIII 与细胞膜结合的蛋白-蛋白复合体所需的至少一个蛋白结合结构域。

[0044] 用于本发明方法的乳凝集素可以是天然发生的乳凝集素多肽或仍能够结合磷脂酰丝氨酸的其片段或变体。所述变体多肽可以是物种同源物,例如哺乳动物同源物 (通常为人、灵长类或小鼠、大鼠或其他啮齿动物同源物)。优选地,所述乳凝集素是人乳凝集素。适合的人乳凝集素多肽可包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列,由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成,或基本由 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列组成。适合的乳凝集素序列可以是能够结合磷脂酰丝氨酸的此序列的片段或变体。例如,乳凝集素的变体可以是其取代、缺失或添加变体或片段。

[0045] 用于本发明方法的因子 VIII 轻链可以包含因子 VIII 的结构域 A3-C1-C2。因子 VIII 轻链可通过重组表达编码因子 VIII 结构域 A3-C1-C2 的核酸产生。可选地,或额外地,因子 VIII 轻链可通过在因子 VIII 多肽的 B-A3 连接点的蛋白水解加工产生。

[0046] 因子 VIII 轻链的片段或变体也可以用于本发明的方法中,前提是所述片段或变体仍能够结合磷脂酰丝氨酸。通常,所述片段或变体能够与因子 VIII 竞争细胞膜上的结合位点。通常,所述片段或变体保留至少一个细胞膜结合结构域。例如,所述片段或变体可包含结构域 C2。最优选地,所述片段或变体包含结构域 C1 和 C2。具体地,所述片段或变体包含由 SEQ ID NO: 6 (人因子 VIII 的氨基酸 2173-2332) 所示的 C2 结构域序列,或包含多至 20,多至 10,多至 5,或多至 2 个氨基酸取代和 / 或缺失的该 C2 结构域的变体。所述片段或变体可包含人因子 VIII C2 结构域的氨基酸序列 2303-2332,或包含 1、2、3、4、5、6 或 7 个氨基酸取代和 / 或缺失的该序列的变体。

[0047] 适合用于本发明方法的抗磷脂抗体包括结合一种或多种磷脂,包括磷脂酰丝氨酸的任何抗体。抗磷脂抗体可结合磷脂酰丝氨酸和一种或多种其他磷脂,包括但不限于两性磷脂、脂双层磷脂、磷酸甘油、磷脂酸、磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、二磷脂酰甘油或鞘磷脂。通常,抗磷脂抗体能够竞争、减少或抑制因子 VIII 与细胞膜的结合。

[0048] 所述抗体可以是人、小鼠、大鼠、山羊、兔、豚鼠、鸡、绵羊或马抗体。优选地,所述抗

磷脂抗体是人、人源化、嵌合、大鼠或小鼠抗体。

[0049] 适合的抗磷脂抗体序列可以是能够结合磷脂酰丝氨酸的此序列的片段或变体。例如,天然发生的抗磷脂抗体的变体可以是其取代、缺失或添加变体或片段。

[0050] 如上文讨论的多肽及其变体和片段可以通过从核酸分子表达而提供。因此,本发明还涉及包含核酸序列的多核苷酸,所述核酸序列编码膜联蛋白 V、乳凝集素、因子 VIII 轻链,或抗磷脂抗体,或其任何衍生物、片段或变体。

[0051] 所述试剂可以提供在培养基中,在足以降低或抑制因子 VIII 与细胞膜结合的浓度。通常,所述试剂能够提高因子 VIII 在培养细胞周围的培养基中的浓度。优选地,通过向细胞培养基添加浓度在 0.001 和 1000 μM 之间,在 0.01 和 500 μM 之间,在 0.01 和 100 μM 之间,在 0.01 和 10 μM 之间,或在 0.1 和 100 μM 之间的结合磷脂酰丝氨酸的试剂,使所述试剂接触培养细胞。

[0052] 在培养表达因子 VIII 的细胞的时期中,或在培养表达因子 VIII 的细胞的时期后但在从培养基分离因子 VIII 之前,向细胞培养基添加结合磷脂酰丝氨酸的试剂。通常,在从培养基分离因子 VIII 之前,将表达因子 VIII 的细胞培养至少 6 小时,至少 12 小时,至少 24 小时,至少 48 小时,至少 4 天或至少 10 天。结合磷脂酰丝氨酸的试剂可以在细胞初始接触培养基时的同时,或基本同时,或在不同于细胞初始接触培养基的时间,与培养细胞接触。所述试剂可以重复地向培养基添加,例如在有规律的间隔后添加,或者每次使新鲜培养基接触培养细胞。可以添加所述试剂,之后立即从培养基分离因子 VIII。

[0053] 表达因子 VIII 的培养细胞可接触一种或多种,两种或更多种,三种或更多种,四种或更多种结合磷脂酰丝氨酸的试剂。例如,在本发明的方法中可使用选自膜联蛋白 V、乳凝集素、因子 VIII 轻链和抗磷脂抗体的两种试剂。

[0054] 培养基中的因子 VIII 多肽的量可以通过本领域中熟知的技术测量。因子 VIII 多肽可以是标记的,例如使用放射性同位素、放射性核苷酸,荧光部分,例如 GFP,酶、亲和标签,例如生物素、组氨酸或 GST,表位标签,抗体或多核苷酸。如果因子 VIII 是标记的,则可以通过分离并检测培养基中标记的因子 VIII 来计算产量,例如通过本领域中已知的光谱、光化学、放射化学、生物化学、免疫化学、化学或电化学的方式。

[0055] 如果没有标记,可以如下文所述,使用本领域中熟知的技术从培养基分离因子 VIII。因子 VIII 多肽的纯化可包括在抗因子 VIII 抗体柱上的亲和层析和通过蛋白水解切割的活化。

[0056] 一方面,本发明由此涉及用于生产因子 VIII 多肽的方法,所述方法包括:

- a) 在使所述多肽表达的条件下培养能够表达因子 VIII 多肽的哺乳动物细胞;和
- b) 在步骤 (a) 期间或步骤 (a) 之后,使所述细胞接触结合磷脂酰丝氨酸的试剂。

[0057] 在一个实施方式中,所述方法进一步包括在所述细胞的生存力是至少 80%,优选至少 85%,最优选至少 90%,且最优选至少 95% 的时间点,收获因子 VIII 多肽的步骤。

[0058] 在另一个实施方式中,所述方法进一步包括在 2-3 天后,或在 2-4 天后,例如,如在 2 天后,或在 3 天后或在 4 天后,收获因子 VIII 多肽的步骤。

[0059] 在另一个实施方式中,将所述哺乳动物细胞培养在细胞培养基中,其中所述因子 VIII 多肽是人因子 VIII 多肽。

[0060] 在另一个实施方式中,通过 i) 将所述试剂与因子 VIII 共表达,或 ii) 向培养细

胞的培养基添加所述试剂,使所述试剂接触所述哺乳动物细胞。所述细胞可以是瞬时转化或稳定转化的细胞。

[0061] 在另一个实施方式中,所述试剂是特异性结合磷脂酰丝氨酸的蛋白,优选乳凝集素、膜联蛋白 V、抗脂质抗体或因子 VIII 轻链。

[0062] 在另一个实施方式中,乳凝集素、膜联蛋白 V 或因子 VIII 轻链以 0.01 至 100 μ M 的浓度添加或共表达。

[0063] 在另一个实施方式中,使一种、两种、三种或更多种能够结合细胞膜上的磷脂酰丝氨酸的试剂接触所述哺乳动物细胞。

[0064] 在另一个实施方式中,乳凝集素、膜联蛋白 V、抗脂质抗体或因子 VIII 轻链与正磷酸-L-丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白一起接触所述哺乳动物细胞。

[0065] 在另一个实施方式中,所述哺乳动物细胞培养在不含动物来源组分的细胞培养基中。可选地,本发明的方法进一步包括分离因子 VIII 多肽和任选地将因子 VIII 多肽配制到药物组合物中。

[0066] 在另一个实施方式中,从培养所述哺乳动物细胞的细胞培养基分离因子 VIII 多肽,而基本不降低细胞的生存力,其中优选至少 75%,或 80%,或 85% 或 90% 的细胞保持存活。

[0067] 在另一个实施方式中,在分离因子 VIII 多肽后,将相同的细胞用于根据前述权利要求中任一项的方法中。

[0068] 本发明的另一方面涉及细胞培养基,其不含血清并且包含:i) 选自乳凝集素、膜联蛋白 V、抗磷脂抗体和因子 VIII 轻链的试剂,和 ii) 正磷酸-L-丝氨酸 (OPLS) 或抗凋亡蛋白。

[0069] 本发明的另一方面涉及能够结合磷脂酰丝氨酸的试剂用于提高可以从哺乳动物细胞培养物分离的因子 VIII 的产量的用途。

实施例

[0070] 结合测定

方法

通过使用 125 I-BDD-FVIII 和未标记的 BDD-FVIII 的同源竞争测定研究纯化的 B-结构域缺失的因子 VIII (BDD-FVIII) (由 J. Karlsson 和 L. Thim, Novo Nordisk A/S 惠赠) 对 HEK293 细胞的细胞膜的亲和力。将细胞在 PBS + 1% BSA 中清洗一次。将 5×10^5 个细胞分配到微滴定孔,并将平板冷却至 4°C。在细胞表面的封闭期间,检测 BDD-FVIII 的结合。在 4°C,与膜联蛋白 V (0.5 μ M, Sigma)、正磷酸-L-丝氨酸 (20 mM, Sigma)、肝素 (100 μ g mL⁻¹, Leo Pharmaceuticals) 和受体相关蛋白 (RAP) 0.5 μ M (H. H. Petersen, Novo Nordisk A/S 惠赠) 中的任一者同时添加恒定浓度的 125 I-FVIII (0.5 nM) 以防止内吞。

[0071] 将平板在温和振荡下在 4°C 培育 2 小时。在离心后,除去未结合 (非膜连接的) 125 I-FVIII,并将细胞在冰冷的测定缓冲液 (10 mM HEPES、150 mM NaCl、4 mM KCl、11 mM 葡萄糖、5 mM CaCl₂、1 mg ml⁻¹ BSA, pH 7.4) 中清洗 2 次。在 γ -计数器上计数表面结合的 125 I-FVIII。将试验一式三份地进行两次。在 12000x 过量的未标记的 BDD 因子 VIII 的存在下,评估非特异性结合。

[0072] 在测定细胞膜相互作用的有效抑制剂的尝试中,测试了已知任一其特异性作用的

四种蛋白:1) 封闭磷脂酰丝氨酸(膜联蛋白 V),2) 与因子 FVIII 的 C2 结构域相互作用(OPLS),3) 与促进内化随后降解的受体,例如 LRP(脂蛋白受体相关蛋白)和 HSPGs(硫酸肝素蛋白聚糖)相互作用(RAP,肝素)。

[0073] 结果

结果显示在下表 2 中。

	总结合的 %	标准差
0.5nM125I-FVIII	95,9	2,5
非特异性结合	11,9	0,7
膜联蛋白 V500nM	28,5	3,1
OPLS20mM	68,4	5,2
肝素 100ug/mL	86,8	7,7
RAP500nM	106,6	6,9

表 2。

[0074] 膜联蛋白 V 使膜连接的 FVIII 减少 ~70%,并且正磷酸-L-丝氨酸(OPLS)使膜连接的 FVIII 减少 ~30%。肝素显示小但不显著的作用。RAP 显示没有作用。

[0075] 因为膜联蛋白 V 能够最有效地减少膜结合,本发明人继续研究了也可抑制 FVIII 在细胞表面上的 PS 结合的其他化合物。这描述在下一个试验中。

[0076] *FVIII 膜位移细胞培养*

方法

将稳定表达 BDD-FVIII 的 CHO DUKX B11 细胞以高密度 (8×10^6 个细胞/mL) 设置在 50mL 滤管(TPP,瑞士)中的无血清培养基中。向培养基添加下述添加剂(乳凝集素、因子 VIII 轻链和 / 或 OPLS),并将细胞培育 24 小时,随后测定培养液和膜结合部分。

[0077] 结果

结果显示在下表 3A 和 3B 中。

	上清液		洗液	
	平均值	标准差	平均值	标准差
对照	3829	464	2342	559
20mM OPLS	6347	2070	1691	542
F8 LC 1.38 μ M	9733	660	1919	881
F8 LC 1.38 μ M / 20mM OPLS	13625	1025	382	45

表3A

	上清液		洗液	
	平均值	标准差	平均值	标准差
对照	3829	464	2342	559
20mM OPLS	6347	2070	1691	542
乳凝集素 0.15 μ M	8085	1546	1406	215
乳凝集素 0.15 μ M / 20mM OPLS	8489	1439	1138	193

表3B

[0078] 通过添加 OPLS,培养基中的 FVIII 活性从 4000 mU/mL 提高到 6000 mU/mL,且膜上的活性没有成比例下降。这可以说明所添加的 OPLS 的稳定化作用。乳凝集素的添加进一

步增加了培养基中的 FVIII 的量,并且还观察到膜结合 FVIII 的减少。当添加两种化合物(乳凝集素和 OPLS)时,与仅添加乳凝集素相比,仅看到小的增加。与对照培养相比,流体相中的 FVIII 的量增加了 2.2 倍。

[0079] 在向培养基添加 FVIII LC 时,观察到类似的趋势。然而,流体相中 FVIII 产量的增加与乳凝集素的添加相比显著更高。这可能是由于所添加的 FVIII LC 浓度高得多,这导致更完全地从细胞膜竞争 FVIII。在这种情况下,FVIII LC 和 OPLS 的添加甚至进一步地有助于流体相 FVIII 部分,并且整体改进高于 3 倍。

[0080] 共表达试验

细胞培养

将 HEK293 细胞保持在补充 50 U/mL 青霉素和 50 ug/mL 链霉素的商购 FreeStyle 培养基中。细胞在振动器中作为悬浮细胞生长,并在 37°C,5% CO₂ 和 95% 相对湿度条件下培育。

[0081] 细胞以 3×10^5 个细胞/ml 的密度接种,并每 3-4 天继代。对于转染试验,将细胞培养物放大培养,直到达到目标密度。通过 Cedex (Innovartis) 分析评估活细胞和总细胞浓度。所述仪器使用用于自动细胞计数的图像分析软件,并且基于活细胞排斥台盼蓝的能力鉴定活细胞。

[0082] 瞬时转染

按照制造商的推荐,通过 293fectin 将质粒 DNA 转染到 HKB11 细胞中。在温和离心上清培养物后,在指定日收获条件培养物。将细胞沉淀重新悬浮在包含 0.5M NaCl 的 FreeStyle 培养基中,并且在温和离心后,获取代表连接至细胞膜的 FVIII 的样品。在分析前,将样品在 -80°C 贮存。

[0083] 因子 VIII 活性和抗原分析

通过两阶段显色测定 (Coamatic 因子 VIII 分析试剂盒,Chromogenix) 测量 FVIII 凝集活性。使用来自 Affinity Biologicals 的多克隆抗体 (F8C-EIA) 进行因子 VIII:Ag 测定。两个测定均按照制造商的说明完成,并且使用内部 B- 结构域缺失的亲纯化的因子 VIII 作为标准品。

共表达构建体	样品类型	收获日		
		3	4	5
		coa (mU/ml)		
乳凝集素	洗液	640 +/-116	3575 +/-558	3510 +/-46
	上清液	5448 +/-122	1044 +/-425	327 +/-13
hGH- 乳凝集素	洗液	1220 +/-482	3424 +/-239	4325 +/-930
	上清液	3611 +/-216	844 +/-502	298 +/-42
hGH- 乳凝集素-C1C2	洗液	1456 +/-27	3120 +/-6	4117 +/-281
	上清液	2929 +/-1054	1340 +/-203	556 +/-84
hFc- 乳凝集素-C1C2	洗液	2116 +/-173	3368 +/-159	3868 +/-284
	上清液	1566 +/-95	429 +/-52	595 +/-91
pcDNA3.1 (空载体)	洗液	3082 +/- 409	5023 +/- 414	6319 +/-600
	上清液	621 +/-69	413 +/-57	506 +/-16

表 4A :编码 F8 的表达质粒在 HKB11 细胞中瞬时表达,并且共表达指定的质粒。在使用 pcDNA3.1 转染时,仅表达 F8。coa 值以 mU/ml 给出。试验进行一式两份。

共表达构建体	样品类型	收获日		
		3	4	5
		FVIII ELISA (ng/ml)		
乳凝集素	洗液	67 +/-0	278 +/-37	287 +/-33
	上清液	530 +/-113	270 +/-54	108 +/-119
hGH-乳凝集素	洗液	150 +/-82	277 +/-14	327 +/-45
	上清液	605 +/-243	262 +/-97	132 +/-52
hGH-乳凝集素-C1C2	洗液	156 +/-13	268 +/-6	294 +/-18
	上清液	540 +/-42	221 +/-13	122 +/-4
hFc-乳凝集素-C1C2	洗液	182 +/-6	258 +/-3	308 +/-9
	上清液	302 +/-11	148 +/-27	112 +/-0
pcDNA3.1 (空载体)	洗液	268 +/-34	449 +/-26	446 +/-38
	上清液	116 +/-129	129 +/-132	120 +/-120

表 4B :如表 4A 相同的试验。FVIII ELISA 数值以 ng/ml 给出。试验进行一式两份。

共表达构建体	细胞计数和生存力	收获日		
		3	4	5
乳凝集素	细胞计数	1,54 +/-0,082	1,17-0,062	1,29 +/-0,186
	生存力	91 +/-0,1	81 +/-0,2	66 +/-4,9
hGH-乳凝集素	细胞计数	1,56 +/-0,016	1,31 +/-0,202	1,49 +/-0,076
	生存力	92 +/-1,7	83 +/-1,3	68 +/-3,4
hGH-乳凝集素-C1C2	细胞计数	1,92 +/-0,14	1,38 +/-0,235	1,53 +/-0,030
	生存力	91	82	62
hFc-乳凝集素-C1C2	细胞计数	1,66 +/-0,010	1,54 +/-0,006	1,33 +/-0,098
	生存力	91 +/-0,2	84 +/-0,8	65 +/-2,4
pcDNA3.1 (空载体)	细胞计数	1,85 +/-0,023	1,41 07-0,053	1,53 +/-0,047
	生存力	94 +/-0,8	85 +/-1,3	67 +/-0,3

表 4C :如表 4A 相同的试验。细胞计数以 10^6 个细胞 /ml 给出,且生存力以活细胞占总细胞的 % 给出。试验进行一式两份。

[0084] 结果

编码 F8 的表达质粒在 HKB11 细胞中与乳凝集素,以及融合至人生长激素 C-末端的乳凝集素 (hGH-乳凝集素) 瞬时共表达。F8 还与 hGH-乳凝集素 C1C2 (融合至 hGH 的 C-末端的乳凝集素的 C1C2 结构域) 和 hFc-乳凝集素 C1C2 (融合至人 Fc 的 C-末端的乳凝集素的 C1C2 结构域) 共表达。根据其可能有助于提高乳凝集素或其结构域的表达的能力,选择融合伴侣。发现在 HKB11 细胞上,F8 通过乳凝集素和 hGH-乳凝集素,在第 3 天有效地位移,并且通过 hGH-乳凝集素 C1C2 和 hFc-乳凝集素 C1C2 也较低程度地位移 (表 4A 和 4B)。然而,在第 4 天,当细胞的生存力从第 3 天的 ~90% 降低至 ~80% 时,乳凝集素共表达不再能保

持上清液中的 F8, 并且 F8 主要定位在细胞表面, 与单独表达 F8 时相当。(表 4A、4B 和 4C)。

[0085] 结论

这些结果显示, 在第 3 天, 与乳凝集素 (或融合至 N- 末端融合伴侣的乳凝集素, 或与 N- 末端融合伴侣在一起的乳凝集素的 C1C2 结构域) 的共表达能够将 F8 从定位在细胞膜上改变为定位在上清液中。本发明人认为这是乳凝集素封闭 HKB11 细胞上的 PS 结合位点, 并且由此阻止 F8 结合至相同的位点的结果。因而, F8 有效地转移到上清液中。结果还显示在第 4 天, 与乳凝集素的共表达不再具有对 F8 定位的任何影响。本发明人认为这是相对低的生存力 ~80% 的结果, 这可能与 PS 结合位点的数量 (乳凝集素的表达量能够屏蔽的位点数量) 增加相关。并且因此, 在第 4 天, 细胞上可能有 F8 可以结合的自由 PS 结合位点。

[0086] 表 5: 稳定转染乳凝集素 (SEQ ID No 7) 和 FVIII 编码质粒的克隆。“COA”是 FVIII 活性的量度 (这种类型的显色测定 (例如 COATEST SPFVIII 测定 # 82408663, 来自 Chromogenix) 是本领域中熟知的)。因此, 上清液中高水平的 COA 表示上清液中存在高比例的 FVIII。“洗液”中测量的 COA 水平等于在使用用于释放结合或连接至细胞膜的 FVIII 的高盐培养基清洗细胞时, 提取的 FVIII 的量。因此, 低“洗液”COA 水平表示连接至细胞膜的 FVIII 不多。已选择 8 个克隆用于进一步的表征 (表 6)。

第一次筛选			
克隆名称	COA (mU/ml), 上清液	COA (mU/ml), 洗液	COA (mU/ml), 总计
CS282_F4	12405	1099	13504
CS282_F184	11733	1022	12755
CS282_F120	11420	1070	12490
CS282_F223	11498	716	12214

CS282_F258	11458	716	12174
CS282_F167	10638	982	11619
CS282_F130	10715	895	11610
CS282_F143	10365	1050	11415
CS282_F194	10405	854	11259
CS282_F66	10135	781	10916
CS282_F43	10018	895	10912
CS282_F263	10755	0	10755
CS282_F133	10600	0	10600
CS282_F257	9518	994	10511
CS282_F118	9633	668	10301
CS282_F205	9555	743	10298
CS282_F53	9403	696	10099
CS282_F138	9940	0	9940
CS282_F100	8678	1248	9926
CS282_F209	9288	608	9896
CS282_F137	9213	668	9881
CS282_F245	9135	689	9824
CS282_F92	9020	641	9661
CS282_F12	8755	809	9564
CS282_F24	8793	743	9536
CS282_F33	8718	724	9442
CS282_F321	8375	1011	9386
CS282_F18	8565	798	9363
CS282_F127	8640	641	9281
CS282_F333	8263	909	9172
CS282_F325	8300	826	9126
CS282_F278	8000	781	8781
CS282_F29	8000	641	8641
CS282_F303	7775	752	8527
CS282_F132	8490	0	8490
CS282_F59	8338	0	8338
CS282_F240	7663	608	8271
CS282_F271	8263	0	8263
CS282_F259	7475	662	8137
CS282_F281	7400	641	8041
CS282_F288	7925	0	7925

CS282_F81	7775	0	7775
CS282_F36	6808	724	7532
CS282_F113	7475	0	7475
CS282_F72	7215	0	7215
CS282_F39	7178	0	7178
CS282_F78	7105	0	7105
CS282_F276	6845	0	6845
CS282_F247	6185	608	6793
CS282_F254	6405	0	6405

[0087] 表 6 :从表 5 选择 8 个克隆。克隆“1C9”是对照,其中细胞已稳定转染单独的 FVIII 且没有转染乳凝集素。存在于上清液中的 FVIII 的量在使用乳凝集素质粒稳定转染的克隆中显著增加。根据最后两列,上清液中存在的活性 FVIII (使用 COA 活性测定)不如 FVIII 抗原(使用标准 FVIII ELISA 测量)那样多。可以通过添加稳定剂,例如 OPLS,改进这个比例。

克隆	COA (上清) mU/ml	COA (洗液) mU/ml	COA 总计 mU/ml	ELISA (上清) ng/ml	ELISA (洗液) ng/ml	ELISA 总计 ng/ml	乳凝集素 ELISA OD450	比例 COA (上清)/ COA (洗液)	比例 ELI (上清)/ ELI (洗液)
F4	32164	15684	47847	10015	595	10610	2.11	2.05	16
F59	29453	15197	38650	3794	761	4555	1.57	1.54	5.0
F120	22963	12635	35598	4033	814	4848	1.88	1.82	5.0
F133	22963	12635	35598	4033	814	4848	1.63	1.82	5.0
F167	27137	15271	42408	6509	709	7218	2.31	1.78	9.2
F184	23042	14670	37712	4916	780	5696	2.04	1.57	6.3
F223	23619	15109	38728	6175	718	6893	1.89	1.58	8.6
F263	24480	15346	39826	6778	630	1877	1.92	1.60	10
1C9	5195	10196	15391	649	771	1420	0.02	0.51	0.8

[0088] 稳定细胞系产生

使用质粒 #2140 转染稳定表达 BDD-FVIII 的细胞系 1C9。#2140 编码融合构建体,其由继之以乳凝集素的 FLAG 表位组成,并且还带有新霉素抗性基因。将 1C9 细胞电穿孔,并使用 500 ug/ml G418 选择。转染和选择在无血清培养基 B-CM208 中进行。

[0089] 筛选

在三周的选择后,通过有限稀释克隆细胞并转入 24 孔板。从这些 24 孔板中的 50 个克隆收集上清液和“洗液”样品。从表格可见(50 个克隆),所有克隆显示表达在上清液中的 FVIII 比在洗液部分中的更多。通过使用添加 0.55 M NaCl 的 B-CM208 溶液处理细胞,制备洗液部分。

[0090] 在表格中(10 个克隆),这些克隆的一些和 1C9 克隆已在摇瓶中的 30 ml 培养基中生长几周的一段时间。所显示的是 COA 活性和 ELISA 产量的平均值。还显示了来自针对 FLAG- 表位的 ELISA 测定的结果。可见,如所预期的,来自 1C9 克隆的上清液在 FLAG ELISA 中没有显示任何反应。还可见,已使用 G418 稳定选择的其他克隆表达不同水平的 FLAG 表位。因此,本发明人观察到 FLAG- 乳凝集素表达与 FVIII 在上清液中的定位增加之间的相

关性。

[0091] 方法：

FLAG ELISA

将上清液或洗液样品施加到抗-FLAG 高敏感性 M2 包被的 96 孔板 (Cat. P2973-1EA, SIGMA)。在培育 60 分钟后,将平板在 PBS 中清洗,并添加针对乳凝集素的抗体 (Cat. H00004240-D01P, ABNOVA)。在另培育 60 分钟后,清洗平板,并使用 HRP 缀合的抗兔抗体显色,并读取 450 nm 的吸光度。

[0001]

序列表

<110> Novo Nordisk A/S

<120> 用于生产因子VIII的方法

<130> 8458

<160> 7

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1445

<212> PRT

<213> 智人(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

[0002]

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
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320
 Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

[0003]

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

[0004]

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 Gln Asn
 740 745 750
 Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
 755 760 765
 Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 770 775 780
 Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 785 790 795 800
 Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 805 810 815
 Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
 820 825 830
 Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe

[0005]

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

[0006]

Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu
 1070 1075 1080

Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr
 1085 1090 1095

Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
 1100 1105 1110

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu
 1115 1120 1125

Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly
 1130 1135 1140

His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
 1145 1150 1155

Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn
 1160 1165 1170

Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu
 1175 1180 1185

Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg
 1190 1195 1200

Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr
 1205 1210 1215

Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr
 1220 1225 1230

Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 1235 1240 1245

Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg
 1250 1255 1260

Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu
 1265 1270 1275

[0007]

Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met
1280 1285 1290

Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr
1295 1300 1305

Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
1310 1315 1320

His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn
1325 1330 1335

Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
1340 1345 1350

Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met
1355 1360 1365

Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
1370 1375 1380

Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
1385 1390 1395

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro
1400 1405 1410

Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
1415 1420 1425

Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp
1430 1435 1440

Leu Tyr
1445

<210> 2
<211> 320
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp

[0008]

1	5	10	15
Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly	20	25	30
Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala	35	40	45
Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp	50	55	60
Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu	65	70	75
Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu	85	90	95
Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu	100	105	110
Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val	115	120	125
Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp	130	135	140
Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn	145	150	155
Arg Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala	165	170	175
Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu	180	185	190
Lys Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys	195	200	205
Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr	210	215	220
Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val	225	230	235
			240

[0009]

Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr
 245 250 255

Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val
 260 265 270

Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe
 275 280 285

Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr
 290 295 300

Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Glu Asp Asp
 305 310 315 320

<210> 3
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Leu Asp Ile Cys Ser Lys Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Leu Cys Glu
 1 5 10 15

Glu Ile Ser Gln Glu Val Arg Gly Asp Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys
 20 25 30

Thr Cys Leu Lys Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val
 35 40 45

Glu Pro Leu Gly Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala
 50 55 60

Ala Ser Ser Val Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro
 65 70 75 80

Glu Leu Ala Arg Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro
 85 90 95

Ser Ser Asn Asp Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg
 100 105 110

[0010]

Met Trp Val Thr Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser
 115 120 125

His Glu Tyr Leu Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His
 130 135 140

Glu Phe Asp Phe Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val
 145 150 155 160

Gly Asn Trp Asn Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro
 165 170 175

Val Glu Ala Gln Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala
 180 185 190

Cys Thr Leu Arg Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala
 195 200 205

Asn Pro Leu Gly Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr
 210 215 220

Ala Ser Ser Ser Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn
 225 230 235 240

Pro Ser Tyr Ala Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val
 245 250 255

Ala Gly Ser Tyr Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser
 260 265 270

Ser Lys Glu Val Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly
 275 280 285

Ser Val Gln Phe Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser
 290 295 300

Ala Asn Trp Thr Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile
 305 310 315 320

Phe Pro Gly Asn Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu
 325 330 335

Thr Pro Ile Leu Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His

[0011]

	340		345		350
Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys					
	355		360		
<210>	4				
<211>	684				
<212>	PRT				
<213>	智人				
<400>	4				
Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr					
1	5		10		15
Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr					
	20		25		30
Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg					
	35		40		45
His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser					
	50		55		60
Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro					
65	70		75		80
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr					
	85		90		95
Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly					
	100		105		110
Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg					
	115		120		125
Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr					
	130		135		140
Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys					
145	150		155		160
Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala					
	165		170		175

[0012]

Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp
 180 185 190

Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
 195 200 205

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr
 210 215 220

Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser
 225 230 235 240

Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 245 250 255

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala
 260 265 270

Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
 275 280 285

Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn
 290 295 300

Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
 305 310 315 320

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
 325 330 335

Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
 340 345 350

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
 355 360 365

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile
 370 375 380

Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 385 390 395 400

[0013]

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr
 405 410 415
 Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
 420 425 430
 Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 435 440 445
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
 450 455 460
 Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly
 465 470 475 480
 Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 485 490 495
 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
 500 505 510
 Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met
 515 520 525
 Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala
 530 535 540
 Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 545 550 555 560
 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn
 565 570 575
 Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
 580 585 590
 Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr
 595 600 605
 Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr
 610 615 620
 Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp

[0014]

625					630					635				640	
Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg
				645					650					655	
Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg
			660					665					670		
Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr				
		675					680								
<210>	5														
<211>	158														
<212>	PRT														
<213>	智人														
<400>	5														
Cys	Ala	Asn	Pro	Leu	Gly	Leu	Lys	Asn	Asn	Ser	Ile	Pro	Asp	Lys	Gln
1				5					10					15	
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Tyr	Lys	Thr	Trp	Gly	Leu	His	Leu	Phe	Ser
			20					25					30		
Trp	Asn	Pro	Ser	Tyr	Ala	Arg	Leu	Asp	Lys	Gln	Gly	Asn	Phe	Asn	Ala
		35					40					45			
Trp	Val	Ala	Gly	Ser	Tyr	Gly	Asn	Asp	Gln	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Leu
	50					55					60				
Gly	Ser	Ser	Lys	Glu	Val	Thr	Gly	Ile	Ile	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	Asn
65					70					75					80
Phe	Gly	Ser	Val	Gln	Phe	Val	Ala	Ser	Tyr	Lys	Val	Ala	Tyr	Ser	Asn
				85					90					95	
Asp	Ser	Ala	Asn	Trp	Thr	Glu	Tyr	Gln	Asp	Pro	Arg	Thr	Gly	Ser	Ser
			100					105					110		
Lys	Ile	Phe	Pro	Gly	Asn	Trp	Asp	Asn	His	Ser	His	Lys	Lys	Asn	Leu
		115					120					125			
Phe	Glu	Thr	Pro	Ile	Leu	Ala	Arg	Tyr	Val	Arg	Ile	Leu	Pro	Val	Ala
	130					135					140				

[0015]

Trp His Asn Arg Ile Ala Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys
145 150 155

<210> 6
<211> 153
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
1 5 10 15

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
20 25 30

Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro
35 40 45

Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr
50 55 60

Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
65 70 75 80

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
85 90 95

Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
100 105 110

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
115 120 125

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
130 135 140

Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys
145 150

<210> 7
<211> 392
<212> PRT
<213> 人工序列

[0016]

<220>

<223> FLAG-乳凝集素

<400> 7

Met Pro Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Gly Gly Gly Ser Leu Asp Ile Cys
20 25 30

Ser Lys Asn Pro Cys His Asn Gly Gly Leu Cys Glu Glu Ile Ser Gln
35 40 45

Glu Val Arg Gly Asp Val Phe Pro Ser Tyr Thr Cys Thr Cys Leu Lys
50 55 60

Gly Tyr Ala Gly Asn His Cys Glu Thr Lys Cys Val Glu Pro Leu Gly
65 70 75 80

Met Glu Asn Gly Asn Ile Ala Asn Ser Gln Ile Ala Ala Ser Ser Val
85 90 95

Arg Val Thr Phe Leu Gly Leu Gln His Trp Val Pro Glu Leu Ala Arg
100 105 110

Leu Asn Arg Ala Gly Met Val Asn Ala Trp Thr Pro Ser Ser Asn Asp
115 120 125

Asp Asn Pro Trp Ile Gln Val Asn Leu Leu Arg Arg Met Trp Val Thr
130 135 140

Gly Val Val Thr Gln Gly Ala Ser Arg Leu Ala Ser His Glu Tyr Leu
145 150 155 160

Lys Ala Phe Lys Val Ala Tyr Ser Leu Asn Gly His Glu Phe Asp Phe
165 170 175

Ile His Asp Val Asn Lys Lys His Lys Glu Phe Val Gly Asn Trp Asn
180 185 190

Lys Asn Ala Val His Val Asn Leu Phe Glu Thr Pro Val Glu Ala Gln
195 200 205

[0017]

Tyr Val Arg Leu Tyr Pro Thr Ser Cys His Thr Ala Cys Thr Leu Arg
 210 215 220

Phe Glu Leu Leu Gly Cys Glu Leu Asn Gly Cys Ala Asn Pro Leu Gly
 225 230 235 240

Leu Lys Asn Asn Ser Ile Pro Asp Lys Gln Ile Thr Ala Ser Ser Ser
 245 250 255

Tyr Lys Thr Trp Gly Leu His Leu Phe Ser Trp Asn Pro Ser Tyr Ala
 260 265 270

Arg Leu Asp Lys Gln Gly Asn Phe Asn Ala Trp Val Ala Gly Ser Tyr
 275 280 285

Gly Asn Asp Gln Trp Leu Gln Val Asp Leu Gly Ser Ser Lys Glu Val
 290 295 300

Thr Gly Ile Ile Thr Gln Gly Ala Arg Asn Phe Gly Ser Val Gln Phe
 305 310 315 320

Val Ala Ser Tyr Lys Val Ala Tyr Ser Asn Asp Ser Ala Asn Trp Thr
 325 330 335

Glu Tyr Gln Asp Pro Arg Thr Gly Ser Ser Lys Ile Phe Pro Gly Asn
 340 345 350

Trp Asp Asn His Ser His Lys Lys Asn Leu Phe Glu Thr Pro Ile Leu
 355 360 365

Ala Arg Tyr Val Arg Ile Leu Pro Val Ala Trp His Asn Arg Ile Ala
 370 375 380

Leu Arg Leu Glu Leu Leu Gly Cys
 385 390