



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103889445 A

(43) 申请公布日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201280051236. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 10. 18

A61K 38/36 (2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 38/37 (2006. 01)

11185648. 0 2011. 10. 18 EP

A61K 47/36 (2006. 01)

61/548, 606 2011. 10. 18 US

A61P 7/04 (2006. 01)

A61K 47/42 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 04. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2012/070615 2012. 10. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/057167 EN 2013. 04. 25

(71) 申请人 德国杰特贝林生物制品有限公司

地址 德国马尔堡

(72) 发明人 H·梅茨纳 S·措尔纳

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

权利要求书1页 说明书11页

序列表17页 附图1页

(54) 发明名称

硫酸化糖胺聚糖用于改善因子 VIII 的生物利用度的用途

(57) 摘要

本发明涉及包含一种或多种因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖、用于在非静脉内施用后增加因子 VIII 的生物利用度的药物组合物。本发明还涉及因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖组合用于治疗或预防出血障碍,由此因子 VIII 的生物利用度得到增加,以及涉及通过硫酸化糖胺聚糖的共施用增加因子 VIII 的非静脉内施用后生物利用度的方法。

1. 一种用于治疗或预防出血障碍的因子 VIII, 所述治疗或预防包括非静脉内注射所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
2. 一种用于治疗或预防出血障碍的因子 VIII, 所述治疗或预防包括非静脉内注射所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖, 其中, 当以 50IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重的剂量皮下施用因子 VIII 时, 在从注射后 2 小时至注射后 48 小时的期间, 被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%。
3. 根据权利要求 1 或 2 中使用的因子 VIII, 其中同时施用所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
4. 根据权利要求 1 或 2 中使用的因子 VIII, 其中分开地施用所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
5. 根据前述权利要求中任一项使用的因子 VIII, 其中所述硫酸化糖胺聚糖是肝素。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项使用的因子 VIII, 其中所述因子 VIII 与 vonWillebrand 因子缔合, 并且所述硫酸化糖胺聚糖是肝素。
7. 根据前述权利要求中任一项使用的因子 VIII, 其中所述被治疗的受试者是人个体, 并且一次施用的剂量少于 500IU/kg 体重。
8. 根据前述权利要求中任一项使用的因子 VIII, 其中所述非静脉内注射是皮下、经皮肤或肌肉内注射。
9. 一种硫酸化糖胺聚糖, 其用于在出血障碍的治疗或预防中改善因子 VIII 的生物利用度, 其中通过皮下、经皮肤或肌肉内注射施用所述硫酸化糖胺聚糖和所述因子 VIII。
10. 根据权利要求 9 中使用的硫酸化糖胺聚糖, 其中所述硫酸化糖胺聚糖是肝素。
11. 根据权利要求 9 或 10 中使用的硫酸化糖胺聚糖, 其中所述出血障碍是血友病 A。
12. 根据权利要求 9 至 11 中的任一项使用的硫酸化糖胺聚糖, 其中同时施用因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
13. 根据权利要求 9 至 12 中任一项使用的硫酸化糖胺聚糖, 其中分开地施用因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
14. 一种用于治疗或预防出血障碍的药物试剂盒, 其包含因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。
15. 权利要求 14 的药物试剂盒, 其中所述硫酸化糖胺聚糖是肝素。

硫酸化糖胺聚糖用于改善因子 VIII 的生物利用度的用途

[0001] 本发明涉及包含至少一种因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖、用于在非静脉内施用后增加因子 VIII 的生物利用度的药物制剂。本发明还涉及因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖组合用于治疗 and 预防出血障碍的用途,其中因子 VIII 的生物利用度得到增加,以及涉及通过共施用硫酸化糖胺聚糖增加因子 VIII 的非静脉内施用后生物利用度的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 因子 VIII (FVIII)

[0004] FVIII 是哺乳动物肝脏中产生的分子量约 280kDa 的血浆糖蛋白。其为导致血液凝固的凝血反应级联的至关重要的组分。该级联中有一个其中因子 IXa (FIXa) 与活化的因子 VIII (FVIIIa) 一起将因子 X (FX) 转化成活化形式 FXa 的步骤。FVIIIa 在该步骤中充当辅因子,其与钙离子和磷脂一起是使 FIXa 的活性最大化所需要的。最常见的血友病障碍是由被称为血友病 A 的功能性 FVIII 缺乏而引起的。

[0005] 血友病 A 的治疗中的一项重要进展是分离到编码人 FVIII 的完整 2,351 个氨基酸的序列的 cDNA 克隆 (美国专利 No. 4,757,006) 以及提供了人 FVIII 基因 DNA 序列和其重组生产方法。

[0006] 从克隆的 cDNA 确定的人 FVIII 的推导一级氨基酸序列的分析表明,其为从更大的前体多肽加工而成的异二聚体。该异二聚体由约 80kDa 的 C 末端轻链与以金属离子依赖性方式相缔合的约 200kDa N 末端重链组成。(参见 Kaufman, Transfusion Med. Revs. 6:235 (1992) 的综述)。该异二聚体的生理活化通过凝血酶对其蛋白质链的蛋白水解切割发生。凝血酶将重链切割成 90kDa 的蛋白质,随后将其切割成 54kDa 和 44kDa 的片段。凝血酶还将 80kDa 的轻链切割成 72kDa 的蛋白质。正是后一种蛋白质和通过钙离子保持在一起的两个重链片段 (上述 54kDa 和 44kDa) 构成了活性 FVIII。当 44kDa A2 重链片段从该分子上解离下来时或当 72kDa 和 54kDa 结构域被凝血酶、活化的蛋白 C 或 FXa 进一步切割时,发生失活。在血浆中,FVIII 通过与 50 倍摩尔浓度过量的 Von Willebrand 因子蛋白 ("VWF") 缔合而得以稳定,所述因子蛋白似乎抑制上述 FVIII 的蛋白水解破坏。

[0007] FVIII 的氨基酸序列被组织成 3 个结构性结构域:三重 330 个氨基酸的 A 结构域、单个 980 个氨基酸的 B 结构域和二重 150 个氨基酸的 C 结构域。B 结构域与其它蛋白质不具有同源性,并且提供该蛋白质的 25 个潜在天冬酰胺 (N)-连接糖基化位点中的 18 个。B 结构域似乎在凝血中不具有功能,并且可被缺失,该 B 结构域被缺失的 FVIII 分子仍然具有促凝血活性。

[0008] Von Willebrand 因子 (VWF)

[0009] VWF 是存在于哺乳动物血浆中的多聚粘着糖蛋白,其具有多个生理功能。在主要的止血过程中,VWF 充当血小板表面上的特异性受体与细胞外基质的组分例如胶原之间的介质。此外,VWF 还充当促凝血因子 FVIII 的载体和稳定化蛋白。VWF 在内皮细胞和巨核细胞中被合成为 2813 个氨基酸的前体分子。前体多肽 (前 VWF 原) 由 22 个残基的信号肽、741 个残基的前肽和在成熟血浆 VWF 中发现的 2050 个残基的多肽组成 (Fischer 等人, FEBS Lett. 351:345-348, 1994)。在分泌进入血浆后,VWF 以具有不同分子大小的不同种类的形式

循环。这些 VWF 分子由具有 2050 个氨基酸残基的成熟亚基的寡聚体和多聚体组成。VWF 通常可作为一个二聚体至由 50 - 100 个二聚体组成的多聚体形式发现于血浆中 (Ruggeri 等人, Thromb. Haemost. 82:576-584, 1999)。在人循环中人 VWF 的体内半衰期约为 12 小时。

[0010] 人中最常见的遗传性出血障碍是维勒布兰德病 (VWD)。取决于出血症状的严重程度, VWD 可通过利用含 VWF (通常地来源于人血浆, 但重组 VWF 也在开发中) 的浓缩物的替代疗法来治疗。可从人血浆制备 VWF, 如例如 EP0503991 中描述的。在专利 EP0784632 中描述了分离重组 VWF 的方法。

[0011] 已知 VWF 体内稳定 FVIII, 从而起着调节 FVIII 的血浆水平的关键作用, 因此是控制原发性和继发性止血的中心因子。还已知在于 VWD 患者中静脉内施用含 VWF 的药物制剂后, 可观察到在 24 小时内内源性 FVIII:C 达到 1 至 3 个单位 /ml 的增加, 这表明 VWF 对 FVIII 的体内稳定作用。

[0012] 患者总的来说受益于活性成分的特定作用模式, 但目前所有商购可得因子 VIII 制剂是通过静脉内施用来给药的, 这牵涉注射部位感染的风险并且通常是患者希望避免的过程, 尤其是在治疗凝血系统中具有缺陷的儿童中。

[0013] 直至今天, 血友病 A 和 VWD 的标准治疗包括频繁静脉内输注 FVIII 和 VWF 浓缩物的制剂。血友病 B 的治疗需要每周 2 次的因子 IX 施用, 在利用 FVIIa 作为抑制剂的患者的治疗中, 使用每周多次施用 FVIIa 来避免出血。

[0014] 这些替代疗法通常是有效的, 然而, 例如在经历预防性治疗的严重血友病 A 患者中, 因因子 VIII 约 12 小时的短暂血浆半衰期的原因, 必须每周约 3 次地静脉内 (i. v.) 施用因子 VIII。通过使 FVIII 水平高于正常人血浆 1% (对应于 FVIII 水平升高 0.01U/ml), 已经将严重的血友病 A 转变成中度血友病 A。在预防性治疗中, 给药方案被设计成使 FVIII 活性的谷底水平不降至非血友病患者中 FVIII 活性的 2-3% 以下的水平。

[0015] 通过静脉内施用进行的因子 VIII 给药是非常麻烦的, 其伴随着疼痛并且具有造成感染的风险, 特别是这主要是患者自己或由诊断为血友病 A 的儿童的父母在家治疗中进行这一操作。此外, 频繁的静脉内注射不可避免地导致瘢痕形成, 干扰将来的输注。由于严重血友病的预防性治疗始于生命的早期, 儿童通常在 2 岁以前开始, 因此甚至难以将 FVIII 每周 3 次地注射进入这样小的患者的静脉。在有限的时期内, 端口系统的植入可提供另一选择。然而, 在这些情况下, 重复感染可能会发生, 并且端口可在体育运动中引起不便。

[0016] 因此, 存在对避免静脉内输注因子 VIII 的巨大医学需要。

[0017] 皮下施用在例如 W095/01804A1 和 W095/026750 中已被建议用于因子 VIII。然而, 必须施用极高剂量的因子 VIII 才能获得可接受的生物利用度。

[0018] 改善非静脉内施用后生物利用度的另一个方法是使用白蛋白融合的因子 VIII (W02011/020866A2)。

[0019] 高度期望改善非静脉内施用后因子 VIII 的生物利用度。本申请的发明人令人惊讶地发现, 如果将因子 VIII 与硫酸化糖胺聚糖一起施用, 因子 VIII 的生物利用度可得到显著增加。

[0020] 发明概述

[0021] 在第一方面, 本发明因此涉及用于治疗或预防出血障碍的因子 VIII, 所述治疗或预防包括非静脉内注射所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。

[0022] 在另一方面,本发明从而涉及用于治疗或预防出血障碍的因子 VIII,所述治疗或预防包括非静脉内注射所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖,其中,当以 50 至 1000IU/kg 体重的剂量皮下施用因子 VIII 时,在从注射后 2 小时至注射后 48 小时期间,被治疗受试者的因子 VIII 血浆水平持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%。

[0023] 该方面的一个优选方案是用于治疗或预防人个体的血友病 A 的因子 VIII,所述治疗或预防包括通过皮下、经皮肤或肌肉注射施用所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖,其中,当以 50 至 1000IU/kg 体重的剂量皮下施用因子 VIII 时,在从注射后 2 小时至注射后 48 小时期间,该人个体中因子 VIII 的血浆水平持续地比健康人个体中因子 VIII 的正常血浆水平高 2%。

[0024] 本发明的另一个方面是用于治疗或预防人个体的出血障碍的因子 VIII,所述治疗或预防包括通过皮下、经皮或肌肉注射施用所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖,其中在所述人个体中因子 VIII 的相对生物利用度比以相同方式施用但无硫酸化糖胺聚糖的因子 VIII 的生物利用度高至少 20%。

[0025] 该方面的一个优选实施方案是用于治疗或预防人个体中血友病 A 的因子 VIII,所述治疗或预防包括通过皮下、经皮或肌肉注射施用所述因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖,其中所述人个体中因子 VIII 的相对生物利用度比以相同方式施用但无硫酸化糖胺聚糖的因子 VIII 的生物利用度高至少 20%。

[0026] 在第三方面,本发明涉及用于改善因子 VIII 的生物利用度的硫酸化糖胺聚糖。

[0027] 在其它方面,本发明涉及用于改善因子 VIII 的生物利用度的硫酸化糖胺聚糖,其中所述硫酸化糖胺聚糖和所述因子 VIII 通过皮下、经皮或肌肉注射来进行施用。

[0028] 本发明的其它方面是用于治疗或预防出血障碍的药物试剂盒,其中包含因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖。

[0029] 本发明的其它方面是治疗或预防出血障碍的方法,包括给有此需要的受试者施用治疗有效量的因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖以增加因子 VIII 的生物利用度,其中所述施用包括皮下、经皮或肌肉注射。

[0030] 本发明的其它方面是用于增加因子 VIII 的生物利用度的方法,其中通过皮下、皮内或肌肉注射将硫酸化糖胺聚糖与所述因子 VIII 共施用。

[0031] 在本发明的所有方面,因子 VIII 优选为人因子 VIII。优选硫酸化糖胺聚糖是肝素,最优选肝素是未分级分离的肝素。

[0032] 附图概述

[0033] 图 1 描述了实施例 1 的结果。如果共施用硫酸化糖胺聚糖,则 FVIII 的生物利用度增加。如可看到的,硫酸葡聚糖无积极效果。

[0034] 详述

[0035] 本发明涉及出血障碍的治疗和预防。

[0036] 如本文中所用,术语“出血障碍”包括家族性和获得性血友病 A。

[0037] 根据本发明的第一方面,提供了因子 VIII 的治疗性非静脉内应用,其包括硫酸化糖胺聚糖的共施用。

[0038] 因子 VIII 可以是野生型因子 VIII 多肽或可包含突变的因子 VIII 多肽。糖基化或其它翻译后修饰的程度和位置可取决于选择的宿主细胞和宿主细胞环境的性质而变化。

当提及特定氨基酸序列时,这样的序列的翻译后修饰包括在本申请中。

[0039] 术语“因子 VIII”和 FVIII”在本文中可互换使用。“因子 VIII”包括野生型因子 VIII 以及具有野生型因子 VIII 的促凝活性的野生型因子 VIII 衍生物。衍生物相较于野生型因子 VIII 的氨基酸序列可具有缺失、插入和 / 或添加。术语因子 VIII 包括因子 VIII 的蛋白水解加工的形式,例如包含重链和轻链的激活之前的形式。

[0040] 术语“因子 VIII”包括具有野生型因子 VIII 的生物活性的至少 10%, 优选至少 25%, 更优选至少 50%, 最优选至少 75% 的任何因子 VIII 变体或突变体。测定因子 VIII 的生物活性的适当测试是一阶段或两阶段凝血测定 (Rizza 等人 1982. Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom ed. The Hemophilias. NY Churchill Livingstone 1992) 或生色底物 FVIII: 活性测定 (S. Rosen, 1984. Scand J Haematol 33:139-145, suppl.)。将这些参考资料的内容通过引用并入本文。

[0041] 作为非限定性实例, 因子 VIII 分子包括防止或减少 APC 切割的因子 VIII 突变体 (Amano 1998. Thromb. Haemost. 79:557-563)、白蛋白融合的 FVIII 分子 (W02011/020866A2)、FVIII-Fc 融合分子 (W004/101740A)、进一步稳定 A2 结构域的因子 VIII 突变体 (W097/40145)、导致表达增加的 FVIII 突变体 (Swaroop 等人 1997. JBC 272:24121-24124)、免疫原性降低的因子 VIII 突变体 (Lollar 1999. Thromb. Haemost. 82:505-508)、从不同地表达的重链和轻链重建的 FVIII (Oh 等人 1999. Exp. Mol. Med. 31:95-100)、减少对受体的结合 (从而导致 FVIII 样 HSPG (硫酸乙酰肝素蛋白聚糖) 和 / 或 LRP (低密度脂蛋白受体相关蛋白) 的分解代谢) 的 FVIII 突变体 (Ananyeva 等人 2001. TCM, 11:251-257)、二硫键稳定化的 FVIII 变体 (Gale 等人, 2006. J. Thromb. Hemost. 4:1315-1322)、具有改善的分泌性质的 FVIII 突变体 (Miao 等人, 2004. Blood 103:3412-3419)、辅因子比活性增加的 FVIII 突变体 (Wakabayashi 等人, 2005. Biochemistry 44:10298-304)、具有改善的生物合成和分泌、降低的 ER 伴侣蛋白相互作用、改善的 ER-Golgi 转运、活化增强或对失活的抗性增强和半衰期改善的 FVIII 突变体 (由 Pipe 2004. Sem. Thromb. Hemost. 30:227-237 概述的), 以及具有 B 结构域全部或部分的缺失的 FVIII 突变体 (参见例如 W02004/067566A1、W002/102850A2、W000/24759A1 和美国专利 No. 4, 868, 112)。特别优选作为“单链”FVIII 分子的 FVIII 分子。单链 FVIII 具有 B 结构域全部或部分的缺失以及酸性 $\alpha 3$ 区域全部或部分的缺失, 从而缺失了 Arg1648 处的切割位点 (其通常在分泌过程中被切割)。单链 FVIII 分子公开于例如 W02004/067566A1; US2002/132306A1; Krishnan 等人 (1991) European Journal of Biochemistry 第 195 卷, no. 3, 第 637-644 页; Herlitschka 等人 (1998) Journal of Biotechnology, 第 61 卷, no. 3, 第 165-173 页; Donath 等人 (1995) Biochem. J., 第 312 卷, 第 49-55 卷中。

[0042] 将所有这些因子 VIII 突变体和变体通过引用整体并入本文。

[0043] 人因子 VIII 的成熟野生型形式的氨基酸序列示于 SEQ ID NO:2 中。提及特定序列的氨基酸位置时意指所述氨基酸在 FVIII 野生型蛋白中的位置, 并且不排除在所提及的序列中其它位置处突变例如缺失、插入和 / 或取代的存在。例如, 提及 SEQ ID NO:2 的“Glu2004”处的突变时, 不排除在被修饰的同源物中, SEQ ID NO:2 的位置 1 至 2332 处的一个或多个氨基酸不存在。编码 SEQ ID NO:2 的 DNA 序列示于 SEQ ID NO:1 中。

[0044] 术语“糖胺聚糖”, 如本文中所用, 是指特别地包含氨基己糖单位的低聚糖或多糖。

硫酸化糖胺聚糖包括但不限于硫酸软骨素、硫酸皮肤素、硫酸角质素、肝素和硫酸乙酰肝素。优选地，硫酸化糖胺聚糖是肝素，最优选硫酸化糖胺聚糖选自未分级分离的肝素。

[0045] 术语“肝素”包括未分级分离的肝素和具有更低分子量的肝素。在一个实施方案中，按照本发明使用的肝素是“未分级分离的肝素”，其可具有约 8kDa 至约 30kDa，优选约 10kDa 至约 20kDa，最优选约 12kDa 至约 16kDa，例如约 15kDa 的平均分子量。在另一个实施方案中，按照本发明使用的肝素是低分子量肝素 (LMWH)。LMWH 是平均分子量小于 8000Da 的肝素或肝素盐，对于所述肝素或肝素盐，所有链的至少 60% 具有小于 8000Da 的平均分子量。优选地，按照本发明使用的 LMWH 的分子量为约 2kDa 至约 8kDa，更优选约 3kDa 至约 6kDa，最优选约 4kDa 至约 5kDa，例如约 4.5kDa。LMWH 可通过多聚肝素的分级分离或解聚合的各种方法来获得。LMWH 的实例包括但不限于阿地肝素钠 (Normiflo)、舍托肝素 (Sandoparin)、依诺肝素 (Lovenox 和克赛)、帕肝素 (Fluxum)、亭扎肝素 (Innohep 和洛集帕林)、达肝素 (法安明)、瑞肝素 (诺易平) 和纳屈肝素 (Fraxiparin)。

[0046] 术语“肝素”还包括通过裂解和分离而衍生自天然肝素或通过合成途径产生的肝素分子的小分子量片段。已有例如合成地制造的并且其结构来源于肝素的商购可得的硫酸化戊糖。其可以磺达肝素钠获得。

[0047] 硫酸软骨素包括例如硫酸软骨素 A (软骨素 -4- 硫酸)、硫酸软骨素 C (软骨素 -6- 硫酸)、硫酸软骨素 D (软骨素 -2, 6- 硫酸) 和硫酸软骨素 E (软骨素 -4, 6- 硫酸)。

[0048] 硫酸皮肤素 (先前称为硫酸软骨素 B) 是商购可得的另一种硫酸化糖胺聚糖。

[0049] 硫酸角质素是另一种硫酸化的糖胺聚糖。硫酸角质素的结构描述于例如 Funderburgh (2000) Glycobiology 第 10 卷 no. 10 第 951-958 页。

[0050] 硫酸乙酰肝素是与肝素不同的 N- 硫酸化多糖 (参见, 例如, Gallagher, J. T., Lyon, M. (2000). "Molecular structure of Heparan Sulfate and interactions with growth factors and morphogens". In Iozzo, M, V.. Proteoglycans: structure, biology and molecular interactions. Marcel Dekker Inc. New York, New York. 第 27 - 59 页; 和 Gallagher, J. T. Walker, A. (1985). "Molecular distinctions between Heparan Sulphate and Heparin: Analysis of sulphation patterns indicates Heparan Sulphate and 肝素 are separate families of N-sulphated polysaccharides". Biochem. J. 230 (3): 665 - 74)。

[0051] 在本发明的一个实施方案中，被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平在从注射后 5 小时至注射后 8 小时的期间持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%，优选高 5%，更优选高 8%，最优选高 10%。将如下文实施例 1 中所示测定血浆水平。

[0052] 在本发明的一个实施方案中，被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平在从注射后 4 小时至注射后 16 小时的期间持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%，优选高 5%，更优选高 8%，最优选高 10%。

[0053] 在本发明的另一个实施方案中，被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平在从注射后 3 小时至注射后 24 小时的期间持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%，优选高 4%，更优选高 6%，最优选高 8%。

[0054] 在本发明的另一个实施方案中，被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平在从注射后 2 小时至注射后 32 小时的期间持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%，

优选高 3%，更优选高 4%，最优选高 5%。

[0055] 在本发明的另一个实施方案中，被治疗的受试者中因子 VIII 的血浆水平在从注射后 1 小时至注射后 48 小时的期间持续地比健康受试者的因子 VIII 正常血浆水平高 2%，优选高 3%，更优选高 4%，最优选高 5%。

[0056] 优选地，当以如下剂量通过皮下注射施用因子 VIII（例如 FVIII）时获得上述血浆水平：少于 1,000IU/kg 体重，或少于 800IU/kg 体重，或少于 600IU/kg 体重，或少于 400IU/kg 体重，例如约 10IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重，或约 20IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重，或约 30IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重，或约 40IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重，或约 75IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重，或约 100IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重，或约 50IU/kg 体重至约 200IU/kg 体重。

[0057] 在一个实施方案中，因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖包含在相同组合物中。可通过单次注射等给患者施用所述包含这两种组分的组合物。

[0058] 在另一个实施方案中，因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖不存在于相同组合物中。例如，可以以分开的剂型在所述药物制剂中提供这两种组分中的每一种。

[0059] 如果两种组分不存在于相同组合物中，则可分开地施用分开的组合物，或在即将施用之前将它们混合，以便因子 VIII 和硫酸化糖胺聚糖被同时施用。如果存在分开的施用，则可以以例如时间错开的方式相继进行施用。一般而言，优选通过单次施用（例如注射）同时施用这两种组分。下面论述不同的施用途径。它们在作适当变动的情形下适用于上述情况。

[0060] 可将药物制剂的组分溶解在常规生理相容性缓冲水溶液中，可任选地向所述缓冲液中添加药物赋形剂来提供药物制剂。药物制剂的组分可以已包含所有必需药物、生理上相容的赋形剂，并且可被溶解在注射用水中来提供药物制剂。

[0061] 这样的药物载体和赋形剂以及适当的药物制剂的制备在本领域是公知的（参见例如“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”，Frokjaer 等人，Taylor&Francis(2000) 或“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第 3 版，Kibbe 等人，Pharmaceutical Press(2000)）。在某些实施方案中，药物组合物包含至少一种添加剂，例如填料、填充剂、缓冲剂、稳定剂或赋形剂。标准药物配制技术对于本领域技术人员来说是公知的（参见，例如，2005Physicians’ Desk **Reference®**, Thomson Healthcare:Montvale,NJ, 2004;Remington:The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版，Gennaro 等人，Eds.Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA, 2000)。适当的药物添加剂包括例如糖，如甘露醇、山梨醇、乳糖、蔗糖、海藻糖或其它糖类，氨基酸如组氨酸、精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸或其它氨基酸，实现等渗条件的添加剂如氯化钠或其它盐，稳定剂如聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20、聚乙二醇、丙二醇、氯化钙等，生理 pH 缓冲剂例如 Tris（羟甲基）氨基甲烷等。在某些实施方案中，药物组合物可包含 pH 缓冲剂和湿润剂或乳化剂。在其它实施方案中，药物组合物可包含防腐剂或稳定剂。具体地，可以以冻干或稳定的可溶性

形式配制包含因子 VIII 的药物制剂。可通过本领域已知的多种方法对因子 VIII 进行冷冻干燥。此外,如果硫酸化糖胺聚糖和因子 VIII 包含在相同的组合物中,则还可以以冻干的形式或以稳定的可溶性形式提供这样的组合物。冻干的制剂可在使用前通过添加一种或多种药学上可接受的稀释剂例如无菌注射用水或无菌生理盐水溶液或适当的缓冲液进行重建。

[0062] 本发明的药物制剂中包含的组合物可通过任何药学上适当的装置递送至个体。各种递送系统是已知的,并且可用于通过任何方便的途径施用组合物。优选地,通过非静脉内注射向个体递送本发明的药物制剂中包含的组合物。更优选,本发明的组合物被配制来用于皮下、肌内、腹膜内、脑内、肺内、鼻内、皮内或经皮肤施用,最优选用于根据常规方法进行皮下、肌内或经皮肤施用。制剂可通过输注或通过单次快速推注来连续施用。一些制剂包括缓慢释放系统。

[0063] 以治疗上有效的剂量(意指足以产生期望的效果,防止或减轻待治疗的病况或适应症的严重度或扩散,而未达到将产生不可耐受的有害副作用的剂量)给患者施用本发明的药物制剂的组合物。确切剂量取决于许多因素,例如适应症、配方、施用模式,并且必须针对每一个相应适应征在临床前和临床试验中进行测定。

[0064] 在因子 VIII 的情形下,一次施用的剂量可以选择成:注射后 2 小时至注射后 48 小时期间,被治疗的受试者中因子 VIII 血浆水平持续高于健康受试者中因子 VIII 的正常血浆水平 2%,优选高于 3%,更优选高于 4%,最优选高于 5%。

[0065] 优选地,一次施用的因子 VIII 的剂量低于 1,000IU/kg 体重,或低于 800IU/kg 体重,或低于 600IU/kg 体重,或低于 400IU/kg 体重,例如为约 10IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重、或约 20IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重、或约 30IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重、或约 40IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重、或约 75IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重、或约 100IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重、或约 50IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重或约 50IU/kg 体重至约 200IU/kg 体重的剂量。

[0066] 因子 VIII 可以本身与硫酸化糖胺聚糖一起施用。或者,因子 FVIII 可以结合 vWF(即称为 FVIII/vWF 复合物)与硫酸化糖胺聚糖一起施用。

[0067] 施用的硫酸化糖胺聚糖的量通常在约 0.001 至 100mg/mL 所施用产品,约 0.01 至约 10mg/mL 所施用产品,约 0.05 至约 1mg/mL 所施用产品的范围内。

[0068] 如本文中所用,术语“生物利用度”是指可在皮下、静脉内或皮内施用后,在预定的时间直至终时间点血浆中被检测到的因子 VIII(例如因子 VIII 或 FVIII 相关制剂)的施用剂量的比例。通常地,通过如下过程在测试动物内测量生物利用度:施用 10IU/kg 至 1000IU/kg(例如,以 400IU/kg 体重)的制剂剂量;在施用后预定的时间点获得血浆样品;和使用生色测定或凝固测定(或任何生物测定)、免疫测定或其等同测定中的一种或多种测定来测量样品中因子 VIII(例如因子 VIII 或因子 VIII 相关多肽)的含量。生物利用度表示为施用后的时间(x 轴)下血浆中因子 VIII 的浓度或活性(y 轴)的曲线下面积(AUC),直至施用后预定的终时间点。优选地,该预定的时间点为施用后 48 小时。最优选地,如下

文实施例 1 中所示测定生物利用度。测试制剂的相对生物利用度是指测试制剂的 AUC 与按照和所述测试制剂相同的剂量和方式(例如静脉内、皮下或皮内)施用的参照制剂的 AUC 之间的比率。

[0069] 根据本发明,因子 VIII 的生物利用度(当与硫酸化糖胺聚糖共施用)高于当单独施用因子 VIII 的生物利用度。优选地,生物利用度增加至少 20%,更优选至少 50%,更优选至少 75%,最优选至少 100%。优选地,当以如下剂量通过皮下注射施用因子 VIII 时获得生物利用度的增加:少于 1,000IU/kg 体重,或少于 800IU/kg 体重,或少于 600IU/kg 体重,或少于 400IU/kg 体重,例如约 10IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重,或约 20IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重,或约 30IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重,或约 40IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重,或约 75IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重,或约 100IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 1,000IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 800IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 700IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 600IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 500IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 400IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 300IU/kg 体重,或约 50IU/kg 体重至约 200IU/kg 体重。

[0070] 可单独施用本发明的药物组合物,或可将其与其它治疗剂结合施用。可掺入这些试剂作为相同药物的部分。

实施例

[0071] 实施例 1: 在血友病 A 模型中评估 s. c. 施用的 FVIII 和各种添加剂的生物利用度

[0072] 材料和动物模型

[0073] 实验中使用的因子 VIII 是 B 结构截短的单链重组因子 VIII(在下文中称为“rFVIII”)。因子 VIII 通过直接将 Asn764 与 Thr1653 融合获得。其已在细胞培养细胞中表达并且从细胞培养基中纯化。

[0074] 使用的其它试剂概述于表 1 中。

[0075] 表 1

[0076]

化合物种类	化合物的类型和/或来源
未分级分离的肝素	肝素钠-25000-ratiopharm
低分子量肝素	达肝素(来自 Pfizer 的 Fragmin®)
硫酸葡聚糖	Ca. 500 kDa
硫酸戊聚糖	磺达肝素钠(来自 SKB 的 Arixtra®)
N-乙酰基脱-O-硫酸化肝素	来自 Sigma-Aldrich 的 N-乙酰基-脱-O-硫酸化肝素钠 (Sigma 产品编号. A6039) CAS 编号 133686-69-8
硫酸软骨素	来自牛气管的硫酸软骨素 A 钠盐, 获自 Sigma-Aldrich (Sigma 产品编号. C9819) CAS 编号 39455-18-0

[0077] 将因子 VIII 敲除小鼠用作血友病 A 的动物模型。这些小鼠缺乏外显子 16 和 17,

从而不表达 FVIII (Bi L. 等人, Nature genetics, 1995, 第 10 卷 (1), 119-121; Bi L. 等人, Blood, 1996, Vol88(9), 3446-3450)。这样可以通过定量 ko 小鼠血浆中的 FVIII 活性来分析处理后的 FVIII 水平。

[0078] 方法

[0079] 为了评估血管外注射是否可能是 rFVIII (人) 改善疗法的一个选择, 选用血管外疗法的一个典型代表 - 皮下注射。进行的非临床药代动力学研究的设计描述于下面的表 2 和 3 中。在血友病 A 模型中, 在单次静脉内或皮下注射 rFVIII 与各种添加剂 (表 2 中详细描述的处理组) 后测定因子 VIII 活性的血浆水平。

[0080] 在各种不同添加剂存在的情况下用相同剂量的 FVIII (生色底物 (CS) 活性测定) 处理对应组。对于单次施用, 在给重量约 25g 的 FVIII 敲除 (ko) 小鼠皮下施用前, 将针对每一个处理组的各种不同组分于 200 μ L 的体积 (对于所有组使用相同体积) 中混合在一起。处理组概述于表 2 中。

[0081] 在短期麻醉下, 抽取血液样品, 使用柠檬酸钠抗凝达到 10% 的柠檬酸盐血, 加工成血浆, 于 -70°C 贮存以用于测定 FVIII 活性。取样时间点详述于表 3 中。通过标准的基于 aPTT 的方法 (Behring Coagulation Timer) 进行血浆内 FVIII 活性的定量。将动物保持在标准居住条件。

[0082] 表 2: 处理组

[0083]

编号	处理	FVIII (CS 活性测定)/添加剂 剂量	体积 [mL/kg]	方案	途径	N
1	rFVIII	400 IU/kg	8	单次注射 (t=0)	s. c.	25
2	rFVIII / 未分级分离的肝素	400 IU/kg / 5 U/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	25
3	rFVIII / 硫酸葡聚糖 (约 500kDa)	400 IU/kg / 400 µg/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	25
4	rFVIII / 法安明	400 IU/kg / 5 U/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	20
5	rFVIII / 磺达肝素	400 IU/kg / 10 µg/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	20
6	rFVIII / N-乙酰基脱-O-硫酸化 肝素	400 IU/kg / 10 µg/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	20
7	rFVIII / 硫酸软骨素	400 IU/ kg / 10 µg/mL 所施用产品	8	单次注射	s. c.	20

[0084] 结果

[0085] 结果概述于表 3 和图 1 中。在各种硫酸化糖胺聚糖存在的情况下将 400IU/kg rFVIII 皮下注射进入 FVIII ko 小鼠内导致了 FVIII 活性的血浆水平相较于单独施用 FVIII 或施用 FVIII+ 硫酸葡聚糖时有显著升高。对于肝素共施用的增加特别强。

[0086] 表 3. 以正常人血浆中 FVIII 活性的百分比表示的 FVIII 活性

[0087]

时间点(h)	rFVIII 400 IU/kg s. c.	rFVIII 400 IU/kg / 未分级分离的肝素 5 U/mL (40 U/kg) s. c.	rFVIII 400 IU/kg / 硫酸葡聚糖 400 μg/ml s. c.	rFVIII 400 IU/kg / 法安明 5 U/mL (40 U/kg) s. c.
0.5	1.02 ± 0.85	2.90 ± 2.70	0 ± 0	3.41 ± 0.61
2	13.04 ± 3.90	15.16 ± 4.12	0.98 ± 1.49	10.65 ± 6.38
5	1.15 ± 1.28	26.66 ± 5.74	2.57 ± 2.67	15.19 ± 7.12
8	2.32 ± 2.27	15.56 ± 4.22	0.64 ± 0.64	21.13 ± 8.92
16	4.82 ± 2.35	12.08 ± 2.35	0.84 ± 1.26	13.19 ± 3.58
24	9.72 ± 8.09	14.10 ± 3.76	0.85 ± 0.89	10.21 ± 3.26
32	2.48 ± 2.20	10.84 ± 5.31	0.92 ± 1.30	5.23 ± 2.83
48	1.15 ± 1.72	7.02 ± 1.24	1.47 ± 1.14	4.71 ± 1.74
AUC 0-48h (hx 正常 SHP 的%)	202.0	598.4	50.0	475.9

[0088] 峰值加以灰色阴影。

[0089]

时间点(h)	rFVIII 400 IU/kg/ Fondaparinux (10 μg/mL) s. c.	rFVIII 400 IU/kg/ N-乙酰基脱-O-硫酸化 肝素(10 μg/mL) s. c.	rFVIII 400 IU/kg/ 硫酸软骨素 (10 μg/mL) s. c.
0.5	7.21 ± 6.77	8.24 ± 11.87	1.98 ± 4.12
2	20.81 ± 11.42	23.37 ± 8.39	16.83 ± 7.22
5	13.01 ± 8.96	16.75 ± 5.08	11.59 ± 5.28
8	18.03 ± 4.70	28.73 ± 9.39	22.59 ± 7.10
16	8.79 ± 5.67	7.69 ± 5.31	3.86 ± 2.76
24	9.61 ± 5.66	10.49 ± 2.12	8.95 ± 2.25
32	3.81 ± 2.13	4.11 ± 1.99	2.83 ± 1.67
48	6.55 ± 2.93	4.73 ± 1.37	7.11 ± 2.86
AUC (hx 正常 SHP 的%)	435.7	499.6	391.7

[0090] 峰值加以灰色阴影。

[0001]

序列表

<110> CSL Behring GmbH
 <120> 硫酸糖胺聚糖用于改善凝血因子的生物利用度的用途
 <130> A182
 <150> EP 11185648.0
 <151> 2011-10-18
 <150> US 61/548606
 <151> 2011-10-18
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6996
 <212> DNA
 <213> 人 (homo sapiens)
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(6996)
 <400> 1
 gcc acc aga aga tac tac ctg ggt gca gtg gaa ctg tca tgg gac tat 48
 Ala Thr Arg Arg Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15
 atg caa agt gat ctc ggt gag ctg cct gtg gac gca aga ttt cct cct 96
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 aga gtg cca aaa tct ttt cca ttc aac acc tca gtc gtg tac aaa aag 144
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 act ctg ttt gta gaa ttc acg gat cac ctt ttc aac atc gct aag cca 192
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 agg cca ccc tgg atg ggt ctg cta ggt cct acc atc cag gct gag gtt 240
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 tat gat aca gtg gtc att aca ctt aag aac atg gct tcc cat cct gtc 288
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 agt ctt cat gct gtt ggt gta tcc tac tgg aaa gct tct gag gga gct 336
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 gaa tat gat gat cag acc agt caa agg gag aaa gaa gat gat aaa gtc 384
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125
 ttc cct ggt gga agc cat aca tat gtc tgg cag gtc ctg aaa gag aat 432
 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 ggt cca atg gcc tct gac cca ctg tgc ctt acc tac tca tat ctt tct 480
 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160
 cat gtg gac ctg gta aaa gac ttg aat tca ggc ctc att gga gcc cta 528
 His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 cta gta tgt aga gaa ggg agt ctg gcc aag gaa aag aca cag acc ttg 576
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

[0002]

cac aaa ttt ata cta ctt ttt gct gta ttt gat gaa ggg aaa agt tgg His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp 195 200 205	624
cac tca gaa aca aag aac tcc ttg atg cag gat agg gat gct gca tct His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser 210 215 220	672
gct cgg gcc tgg cct aaa atg cac aca gtc aat ggt tat gta aac agg Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg 225 230 235 240	720
tct ctg cca ggt ctg att gga tgc cac agg aaa tca gtc tat tgg cat Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His 245 250 255	768
gtg att gga atg gcc acc act cct gaa gtg cac tca ata ttc ctc gaa Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu 260 265 270	816
ggt cac aca ttt ctt gtg agg aac cat cgc cag gcg tcc ttg gaa atc Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile 275 280 285	864
tgc cca ata act ttc ctt act gct caa aca ctc ttg atg gac ctt gga Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly 290 295 300	912
cag ttt cta ctg ttt tgt cat atc tct tcc cac caa cat gat gcc atg Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met 305 310 315 320	960
gaa gct tat gtc aaa gta gac agc tgt cca gag gaa ecc caa cta cga Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg 325 330 335	1008
atg aaa aat aat gaa gaa gcg gaa gac tat gat gat gat ctt act gat Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp 340 345 350	1056
tct gaa atg gat gtg gtc agg ttt gat gat gac aac tct cct tcc ttt Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe 355 360 365	1104
atc caa att cgc tca gtt gcc aag aag cat cct aaa act tgg gta cat Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His 370 375 380	1152
tac att gct gct gaa gag gag gac tgg gac tat gct ccc tta gtc ctc Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu 385 390 395 400	1200
gcc ccc gat gac aga agt tat aaa agt caa tat ttg aac aat gcc cct Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro 405 410 415	1248
cag cgg att ggt agg aag tac aaa aaa gtc cga ttt atg gca tac aca Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr 420 425 430	1296
gat gaa ace ttt aag act cgt gaa gct att cag cat gaa tca gga atc Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile 435 440 445	1344
ttg gga cct tta ctt tat ggg gaa gtt gga gac aca ctg ttg att ata Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile 450 455 460	1392
ttt aag aat caa gca agc aga cca tat aac atc tac cct cac gga atc Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile 465 470 475 480	1440
act gat gtc cgt cct ttg tat tca agg aga tta cca aaa ggt gta aaa Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys 485 490 495	1488

[0003]

cat ttg aag gat ttt cca att ctg cca gga gaa ata ttc aaa tat aaa His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys 500 505 510	1536
tgg aca gtg act gta gaa gat ggg cca act aaa tca gat cct cgg tgc Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys 515 520 525	1584
ctg acc cgc tat tac tct agt ttc gtt aat atg gag aga gat cta gct Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala 530 535 540	1632
tca gga ctc att ggc cct ctc ctc atc tgc tac aaa gaa tct gta gat Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp 545 550 555 560	1680
caa aga gga aac cag ata atg tca gac aag agg aat gtc atc ctg ttt Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe 565 570 575	1728
tct gta ttt gat gag aac cga agc tgg tac ctc aca gag aat ata caa Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln 580 585 590	1776
cgc ttt ctc ccc aat cca gct gga gtg cag ctt gag gat cca gag ttc Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe 595 600 605	1824
caa gcc tcc aac atc atg cac agc atc aat ggc tat gtt ttt gat agt Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser 610 615 620	1872
ttg cag ttg tca gtt tgt ttg cat gag gtg gca tac tgg tac att cta Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu 625 630 635 640	1920
agc att gga gca cag act gac ttc ctt tct gtc ttc ttc tct gga tat Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr 645 650 655	1968
acc ttc aaa cac aaa atg gtc tat gaa gac aca ctc acc cta ttc cca Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro 660 665 670	2016
ttc tca gga gaa act gtc ttc atg tgg atg gaa aac cca ggt cta tgg Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp 675 680 685	2064
att ctg ggg tgc cac aac tca gac ttt cgg aac aga ggc atg acc gcc Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala 690 695 700	2112
tta ctg aag gtt tct agt tgt gac aag aac act ggt gat tat tac gag Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu 705 710 715 720	2160
gac agt tat gaa gat att tca gca tac ttg ctg agt aaa aac aat gcc Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala 725 730 735	2208
att gaa cca aga agc ttc tcc cag aat tca aga cac cgt agc act agg Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg 740 745 750	2256
caa aag caa ttt aat gcc acc aca att cca gaa aat gac ata gag aag Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys 755 760 765	2304
act gac cct tgg ttt gca cac aga aca cct atg cct aaa ata caa aat Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn 770 775 780	2352
gtc tcc tct agt gat ttg ttg atg ctc ttg cga cag agt cct act cca Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro 785 790 795 800	2400

[0004]

cat ggg cta tcc tta tct gat ctc caa gaa gcc aaa tat gag act ttt His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe 805 810 815	2448
tct gat gat cca tca cct gga gca ata gac agt aat aac agc ctg tct Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser 820 825 830	2496
gaa atg aca cac ttc agg cca cag ctc cat cae agt ggg gac atg gta Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val 835 840 845	2544
ttt acc cct gag tca ggc ctc caa tta aga tta aat gag aaa ctg ggg Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly 850 855 860	2592
aca act gca gca aca gag ttg aag aaa ctt gat ttc aaa gtt tct agt Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser 865 870 875 880	2640
aca tca aat aat ctg att tca aca att cca tca gac aat ttg gca gca Thr Ser Asn Asn Thr Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala 885 890 895	2688
ggc act gat aat aca agt tcc tta gga ccc cca agt atg cca gtt cat Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His 900 905 910	2736
tat gat agt caa tta gat acc act cta ttt ggc aaa aag tca tct ccc Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro 915 920 925	2784
ctt act gag tet ggt gga cct ctg agc ttg agt gaa gaa aat aat gat Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp 930 935 940	2832
tca aag ttg tta gaa tca ggt tta atg aat agc caa gaa agt tca tgg Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp 945 950 955 960	2880
gga aaa aat gta tgc tca aca gag agt ggt agg tta ttt aaa ggg aaa Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys 965 970 975	2928
aga get cat gga cct gct ttg ttg act aaa gat aat gcc tta ttc aaa Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys 980 985 990	2976
gtt agc atc tct ttg tta aag aca aac aaa act tcc aat aat tca gca Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala 995 1000 1005	3024
act aat aga aag act cac att gat ggc cca tca tta tta att gag Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu 1010 1015 1020	3069
aat agt cca tca gtc tgg caa aat ata tta gaa agt gac act gag Asn Ser Pro Ser Val Trp Glu Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu 1025 1030 1035	3114
ttt aaa aaa gtg aca cct ttg att cat gac aga atg ctt atg gac Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp 1040 1045 1050	3159
aaa aat get aca get ttg agg cta aat cat atg tca aat aaa act Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr 1055 1060 1065	3204
act tca tca aaa aac atg gaa atg gtc caa cag aaa aaa gag ggc Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly 1070 1075 1080	3249
ccc att cca cca gat gca caa aat cca gat atg tgc ttc ttt aag Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys 1085 1090 1095	3294

[0005]

atg cta ttc ttg cca gaa tca gca agg tgg ata caa agg act cat Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His 1100 1105 1110	3339
gga aag aac tct ctg aac tct ggg caa ggc ccc agt cca aag caa Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln 1115 1120 1125	3384
tta gta tcc tta gga cca gaa aaa tct gtg gaa ggt cag aat ttc Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe 1130 1135 1140	3429
ttg tct gag aaa aac aaa gtg gta gta gga aag ggt gaa ttt aca Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr 1145 1150 1155	3474
aag gac gta gga ctc aaa gag atg gtt ttt cca age agc aga aac Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn 1160 1165 1170	3519
cta ttt ctt act aac ttg gat aat tta cat gaa aat aat aca cac Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His 1175 1180 1185	3564
aat caa gaa aaa aaa att cag gaa gaa ata gaa aag aag gaa aca Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr 1190 1195 1200	3609
tta atc caa gag aat gta gtt ttg cct cag ata cat aca gtg act Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr 1205 1210 1215	3654
ggc act aag aat ttc atg aag aac ctt ttc tta ctg agc act agg Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg 1220 1225 1230	3699
caa aat gta gaa ggt tca tat gac ggg gca tat gct cca gta ctt Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu 1235 1240 1245	3744
caa gat ttt agg tca tta aat gat tca aca aat aga aca aag aaa Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys 1250 1255 1260	3789
cac aca gct cat ttc tca aaa aaa ggg gag gaa gaa aac ttg gaa His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu 1265 1270 1275	3834
ggc ttg gga aat caa acc aag caa att gta gag aaa tat gca tgc Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys 1280 1285 1290	3879
acc aca agg ata tct cct aat aca agc cag cag aat tti gtc acg Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr 1295 1300 1305	3924
caa cgt agt aag aga get ttg aaa caa ttc aga ctc cca cta gaa Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu 1310 1315 1320	3969
gaa aca gaa ctt gaa aaa agg ata att gtg gat gac acc tca acc Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr 1325 1330 1335	4014
cag tgg tcc aaa aac atg aaa cat ttg acc ccg agc acc ctc aca Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr 1340 1345 1350	4059
cag ata gac tac aat gag aag gag aaa ggg gcc att act cag tct Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser 1355 1360 1365	4104
ccc tta tca gat tgc ctt acg agg agt cat agc atc cct caa gca Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala 1370 1375 1380	4149

[0006]

aat aga tct cca tta ccc att gca aag gta tca tca ttt cca tct Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser 1385 1390 1395	4194
att aga cct ata tat ctg acc agg gtc cta ttc caa gac aac tct Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser 1400 1405 1410	4239
tct cat ett cca gca gca tct tat aga aag aaa gat tct ggg gtc Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val 1415 1420 1425	4284
caa gaa agc agt cat ttc tta caa gga gcc aaa aaa aat aac ctt Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu 1430 1435 1440	4329
tct tta gcc att cta acc ttg gag atg act ggt gat caa aga gag Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu 1445 1450 1455	4374
ggt ggc tcc ctg ggg aca agt gcc aca aat tca gtc aca tac aag Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys 1460 1465 1470	4419
aaa gtt gag aac act gtt ctc ccg aaa cca gac ttg ccc aaa aca Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr 1475 1480 1485	4464
tct ggc aaa gtt gaa ttg ctt cca aaa gtt cae att tat cag aag Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys 1490 1495 1500	4509
gac cta ttc cct acg gaa act agc aat ggg tct cct ggc cat ctg Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu 1505 1510 1515	4554
gat ctc gtg gaa ggg agc ctt ctt cag gga aca gag gga gcg att Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile 1520 1525 1530	4599
aag tgg aat gaa gca aac aga cct gga aaa gtt ccc ttt ctg aga Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg 1535 1540 1545	4644
gta gca aca gaa agc tct gca aag act ccc tcc aag cta ttg gat Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp 1550 1555 1560	4689
cct ctt gct tgg gat aac cac tat ggt act cag ata cca aaa gaa Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu 1565 1570 1575	4734
gag tgg aaa tcc caa gag aag tca cca gaa aaa aca gcl ttt aag Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys 1580 1585 1590	4779
aaa aag gat acc att ttg tcc ctg aac gct tgt gaa agc aat cat Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His 1595 1600 1605	4824
gca ata gca gca ata aat gag gga caa aat aag ccc gaa ata gaa Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu 1610 1615 1620	4869
gtc acc tgg gca aag caa ggt agg act gaa agg ctg tgc tct caa Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln 1625 1630 1635	4914
aac cca cca gtc ttg aaa cgc cat caa egg gaa ata act cgt act Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr 1640 1645 1650	4959
act ctt cag tca gat caa gag gaa att gac tat gat gat acc ata Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile 1655 1660 1665	5004

[0007]

tca gtt gaa atg aag aag gaa gat ttt gac att tat gat gag gat Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp 1670 1675 1680	5049
gaa aat cag agc ccc cgc agc ttt caa aag aaa aca cga cac tat Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr 1685 1690 1695	5094
ttt att gct gca gtg gag agg ctc tgg gat tat ggg atg agt agc Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser 1700 1705 1710	5139
tcc cca cat gtt cta aga aac agg gct cag agt ggc agt gtc cct Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro 1715 1720 1725	5184
cag ttc aag aaa gtt gtt ttc cag gaa ttt act gat ggc tcc ttt Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe 1730 1735 1740	5229
act cag ccc tta tac cgt gga gaa cta aat gaa cat ttg gga ctc Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu 1745 1750 1755	5274
ctg ggg cca tat ata aga gca gaa gtt gaa gat aat atc atg gta Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val 1760 1765 1770	5319
act ttc aga aat cag gcc tct cgt ccc tat tcc ttc tat tct agc Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser 1775 1780 1785	5364
ctt att tct tat gag gaa gat cag agg caa gga gca gaa cct aga Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg 1790 1795 1800	5409
aaa aac ttt gtc aag cct aat gaa acc aaa act tac ttt tgg aaa Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys 1805 1810 1815	5454
gtg caa cat cat atg gca ccc act aaa gat gag ttt gac tgc aaa Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys 1820 1825 1830	5499
gcc tgg gct tat ttc tct gat gtt gac ctg gaa aaa gat gtg cac Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His 1835 1840 1845	5544
tca ggc ctg att gga ccc ctt ctg gtc tgc cac act aac aca ctg Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu 1850 1855 1860	5589
aac cct gct cat ggg aga caa gtg aca gta cag gaa ttt gct ctg Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu 1865 1870 1875	5634
ttt ttc acc atc ttt gat gag acc aaa agc tgg tac ttc act gaa Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu 1880 1885 1890	5679
aat atg gaa aga aac tgc agg gct ccc tgc aat atc cag atg gaa Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu 1895 1900 1905	5724
gat ccc act ttt aaa gag aat tat cgc ttc cat gca atc aat ggc Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly 1910 1915 1920	5769
tac ata atg gat aca cta cct ggc tta gta atg gct cag gat caa Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1925 1930 1935	5814
agg att cga tgg tat ctg ctc agc atg ggc agc aat gaa aac atc Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1940 1945 1950	5859

[0008]

cat tct att cat ttc agt gga cat gtg ttc act gta cga aaa aaa His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys 1955 1960 1965	5904
gag gag tat aaa atg gca ctg tac aat ctc tat cca ggt gtt ttt Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1970 1975 1980	5949
gag aca gtg gaa atg tta cca tcc aaa gct gga att tgg cgg gtg Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1985 1990 1995	5994
gaa tgc ctt att ggc gag cat cta cat gct ggg atg agc aca ctt Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2000 2005 2010	6039
ttt ctg gtg tac agc aat aag tgt cag act ccc ctg gga atg gct Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2015 2020 2025	6084
tct gga cac att aga gat ttt cag att aca gct tca gga caa tat Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2030 2035 2040	6129
gga cag tgg gcc cca aag ctg gcc aga ctt cat tat tcc gga tca Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2045 2050 2055	6174
atc aat gcc tgg agc acc aag gag ccc ttt tct tgg atc aag gtg Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2060 2065 2070	6219
gat ctg ttg gca cca atg aitt att cac ggc atc aag acc cag ggt Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly 2075 2080 2085	6264
gcc cgt cag aag ttc tcc agc etc tac atc tct cag ttt atc atc Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 2090 2095 2100	6309
atg tat agt ctt gat ggg aag aag tgg cag act tat cga gga aat Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn 2105 2110 2115	6354
tcc act gga acc tta atg gtc ttc ttt ggc aat gtg gat tca tct Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser 2120 2125 2130	6399
ggg ata aaa cac aat att ttt aac cct cca aitt att gct cga tac Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr 2135 2140 2145	6444
atc cgt ttg cac cca act cat tat agc att cgc agc acf ctt cgc Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg 2150 2155 2160	6489
atg gag ttg atg ggc tgt gat tta aat agt tgc agc atg cca ttg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu 2165 2170 2175	6534
gga atg gag agt aaa gca ata tca gat gca cag att act gct tca Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser 2180 2185 2190	6579
tcc tac ttt ace aat atg ttt gcc acc tgg tct cct tca aaa gct Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala 2195 2200 2205	6624
cga ctt cac ctc caa ggg agg agt aat gcc tgg aga cct cag gtg Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val 2210 2215 2220	6669
aat aat cca aaa gag tgg ctg caa gtg gac ttc cag aag aca atg Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met 2225 2230 2235	6714

[0009]

aaa gtc aca gga gta act act cag gga gta aaa tct ctg ctt acc 6759
 Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2240 2245 2250
 agc atg tat gtg aag gag ttc ctc atc tcc agc agt caa gat ggc 6804
 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
 2255 2260 2265
 cat cag tgg act ctc ttt ttt cag aat ggc aaa gta aag gtt ttt 6849
 His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
 2270 2275 2280
 cag gga aat caa gac tcc ttc aca cct gtg gtg aac tct cta gac 6894
 Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
 2285 2290 2295
 cca ccg tta ctg act cgc tac ctt cga att cac ccc cag agt tgg 6939
 Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
 2300 2305 2310
 gtg cac cag att gcc ctg agg atg gag gtt ctg ggc tgc gag gca 6984
 Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
 2315 2320 2325
 cag gac ctc tac 6996
 Gln Asp Leu Tyr
 2330

<210> 2
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

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

[0010]

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
 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

[0011]

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

[0012]

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

[0013]

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

[0014]

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

[0015]

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		

[0016]

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

[0017]

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		

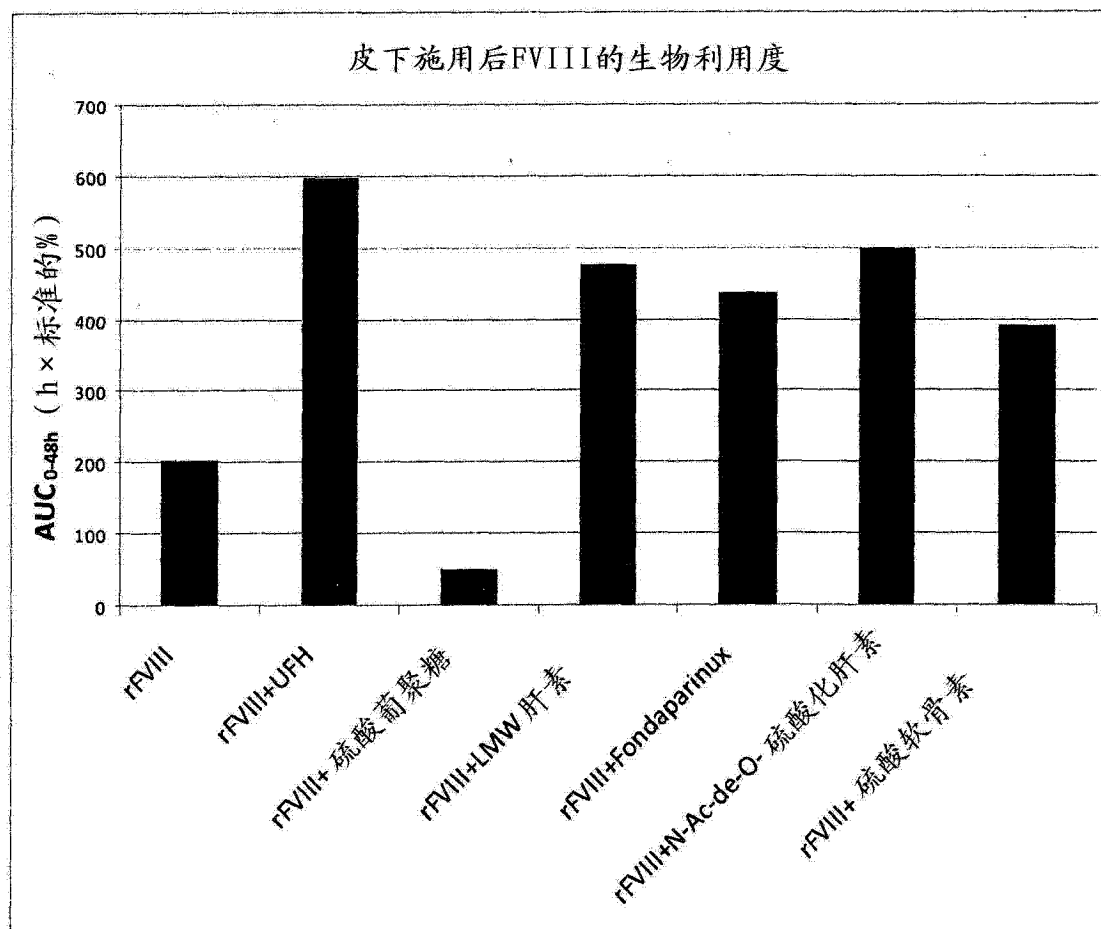


图 1