



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112661863 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(21) 申请号 202011589444.5

(22) 申请日 2013.11.20

(30) 优先权数据

61/728,662 2012.11.20 US

(62) 分案原申请数据

201380066354.X 2013.11.20

(71) 申请人 奥普科生物制品有限公司

地址 以色列水牛城

(72) 发明人 O·赫什科维茨 A·巴尔伊兰

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 左路 林晓红

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书67页

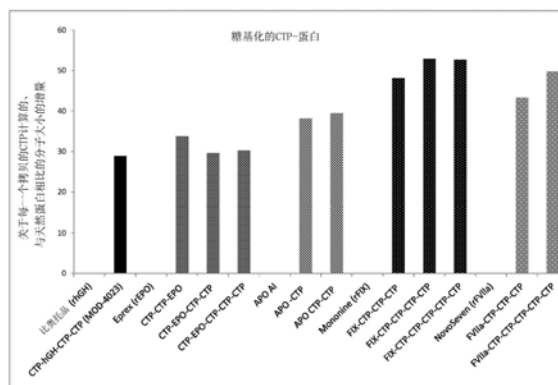
序列表74页 附图8页

(54) 发明名称

通过连接至促性腺激素羧基端肽来增加多肽的流体动力学体积的方法

(57) 摘要

本发明涉及绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)或其片段用于修饰多肽或其片段从而增加所述多肽或其片段的流体动力学体积的用途。



1. 一种增加重组人生长激素 (hGH) 多肽的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法, 所述方法包括:

(a) 将1个绒毛膜促性腺激素羧基端肽 (CTP) 单元重组连接至所述hGH的氨基末端, 且将2个CTP单元重组连接至所述hGH的羧基末端; 和

(b) 在宿主细胞中表达所述重组CTP修饰的多肽, 其中表达包括糖基化所述CTP单元; 其中所述CTP修饰的多肽可选地包括连接至所述CTP修饰的多肽的氨基末端的信号肽, 且

其中所述糖基化的CTP单元递增地增加所述hGH的流体动力学尺寸, 每个所述糖基化的CTP单元递增约28-53kDa。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中编码所述hGH的DNA连接至编码CTP肽的DNA序列。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述编码所述hGH的DNA编码SEQ ID NO:5至SEQ ID NO:8中任一项的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1-3中的任一项所述的方法, 其中所述CTP单元中的至少一个的氨基酸序列选自自由SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2组成的组。

5. 根据权利要求1-4中的任一项所述的方法, 其中所述CTP单元中的至少一个的氨基酸序列被截短, 且包括SEQ ID NO:3的前10个氨基酸 (SSSSKAPPPS)。

6. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述CTP修饰的多肽包括前体CTP修饰的hGH, 其中所述氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示。

7. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述CTP修饰的多肽包括成熟CTP修饰的hGH, 其中所述氨基酸序列如SEQ ID NO:11的氨基酸27-301所示。

8. 根据权利要求1-7中的任一项所述的方法, 其中所述糖基化是O-糖基化。

9. 根据权利要求8所述的方法, 其中所述O-糖基化是通过 α -糖苷键连接至蛋白链中的丝氨酸 (Ser) 或苏氨酸 (Thr) 的GalNAc。

10. 根据权利要求8-9中的任一项所述的方法, 其中所述O-糖基化是核心1糖基化、O-岩藻糖基化、O-甘露糖基化或O-糖基化。

11. 根据权利要求8-10中的任一项所述的方法, 其中所述O-糖基化之后添加1-60个半乳糖分子; 或者所述O-糖基化之后添加1-120个唾液酸分子; 或者它们的组合。

12. 根据权利要求1-11中的任一项所述的方法, 其中增加所述流体动力学尺寸或体积增加所述多肽的生物利用度。

13. 根据权利要求1-12中的任一项所述的方法, 其中所述CTP单元中的至少一个经由接头连接至所述多肽, 且所述接头是肽键。

14. 根据权利要求1-13中的任一项所述的方法, 其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

15. 一种增加多肽的表观分子量的方法, 所述方法包括下述步骤: 根据权利要求1-14中的任一项增加流体动力学体积。

16. 一种增加多肽的血清半衰期的方法, 所述方法通过根据权利要求1-14中的任一项的包括增加所述多肽的流体动力学体积的方法进行。

通过连接至促性腺激素羧基端肽来增加多肽的流体动力学体积的方法

[0001] 本申请为申请日为2013年11月20日、申请号为201380066354.X、发明名称为“通过连接至促性腺激素羧基端肽来增加多肽的流体动力学体积的方法”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及绒毛膜促性腺激素羧基端肽 (CTP) 用于增加多肽或其片段的流体动力学体积的用途。

背景技术

[0003] 生物技术产品涵盖了所有治疗药物的大部分,包括单克隆抗体、疫苗、生长因子、激素、细胞因子、凝血因子、融合蛋白、酶和其它蛋白。除了单克隆抗体和疫苗以外,在该列表中的许多具有低于50kDa的分子质量和在几分钟至几小时范围内的短终末半衰期。

[0004] 蛋白治疗剂的效力主要取决于它们的药代动力学性能,包括它们的血浆半衰期,这会影响分布和排泄。尽管小尺寸会促进组织穿透,这些分子经常从循环中快速地清除。因而,为了在延长的时间段内维持治疗有效浓度,进行输注或频繁施用,或利用向血流中的缓慢吸收而局部地或皮下地施用药物。小尺寸蛋白药物的这些限制已经导致半衰期延长策略的开发和实现,以延长这些重组抗体在血液中的循环并从而改善施用和药代动力学以及药效动力学性能。

[0005] 本发明采用这样的策略,以便使目标蛋白或其片段(包括肽)的流体动力学尺寸或体积增加特定因数,并由此改善它们的施用、药代动力学以及药效动力学性能。流体动力学体积的这种增加通过利用基于肽的技术来实现,所述技术用于延长蛋白和肽的血清半衰期。该技术是基于使用天然的肽,即人绒毛膜促性腺激素(hCG)的 β 链的C-端肽(CTP),该肽会给hCG提供所需的寿命以维持妊娠。黄体生成素(LH)(一种触发排卵的能育性激素)的 β 链与hCG几乎相同,但是不包括CTP。所以,LH在血液中具有显著更短的半衰期。将预定数目的CTP连接至目标蛋白或肽,会使它们的流体动力学体积增加特定因数并导致改善的性能,所述性能包括目标蛋白或肽的增强的血清半衰期和效能。

发明内容

[0006] 在一个实施方案中,本发明涉及一种增加目标多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将1-10个绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所述多肽或其片段,其中将所述1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段会导致每个连接的CTP使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加约28-53kDa,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0007] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种增加多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将1-10个绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所

述多肽或其片段,其中将所述1-10个CTP连接至所述多肽或其片段会导致使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加一定量,所述量取决于所述CTP所连接的特定多肽或其片段,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0008] 从下述详细描述实施例和附图将明白本发明的其它特征和优点。但是,应当理解,所述详细描述和具体实施例尽管指出了本发明的优选实施方案,但是仅仅通过例证给出,因为本领域技术人员从该详细描述会明白在本发明的精神和范围内的各种变化和修改。

附图说明

[0009] 以下附图形成本说明书的部分,并且被包括以进一步证实本公开内容的某些方面,通过参考这些附图中的一个或多个,结合在本文中呈现的具体实施方案的详细描述,可以更好地理解所述方面的发明。

[0010] 图1显示了6种不同的纯化的CTP修饰的蛋白和它们的对应天然蛋白的SDS-PAGE分析。1.CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023), 2.比奥托品 (Biotropin, rhGH), 3.大小标志物, 4.CTP-EPO-CTP-CTP, 5.CTP-CTP-EPO, 6.CTP-CTP-EPO-CTP-CTP, 7. **EPREX®** (rEPO), 8.大小标志物, 9.APO-A1, 10.大小标志物, 11.Apo-CTP, 12.Apo-CTP-CTP, 13.大小标志物。

[0011] 图2显示了5种不同的纯化的CTP修饰的蛋白和它们的对应天然蛋白的SDS-PAGE分析。1.FIX-CTP-CTP-CTP 2.大小标志物 3.FIX-CTP-CTP-CTP-CTP 4.FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP 5. **Mononine®** (rFIX) 6.大小标志物 7.FVIIa-CTP-CTP-CTP 8.FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP 9.大小标志物。

[0012] 图3显示了通过MALDI-TOF测量的、未糖基化的 (A) 和糖基化的 (B) CTP修饰的蛋白的一个CTP拷贝的分子量 (kDa) 增量。

[0013] 图4显示了通过SEC-HPLC测量的、糖基化的CTP修饰的蛋白的流体动力学尺寸与它们的对应天然蛋白相比的增量。(A) 展示流体动力学尺寸的总增量,而 (B) 展示每一个拷贝的糖基化的CTP的计算增量。

[0014] 图5显示了通过SEC-HPLC柱测量的、未糖基化的CTP修饰的蛋白的流体动力学尺寸与它们的对应天然蛋白相比的增量。(A) 展示流体动力学尺寸的总增量,而 (B) 展示每一个拷贝的未糖基化的CTP的计算增量。

具体实施方式

[0015] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加目标多肽或其片段的流体动力学体积或流体动力学尺寸的方法,所述方法包括下述步骤:在所述多肽或其片段的N-端或C-端上将所述多肽或其片段融合至至少一个绒毛膜促性腺激素C-端肽 (CTP)。

[0016] 在一个实施方案中,术语“蛋白”和“多肽”在本文中可互换地使用。在另一个实施方案中,术语“目标多肽或其片段”或“目标蛋白或其片段”包括天然多肽 (降解产物、通过合成法合成的多肽或重组多肽) 和肽拟似物 (通常,通过合成法合成的多肽)、以及作为多肽类似物的类肽和半类肽,在另一个实施方案中,所述多肽类似物具有这样的修饰:所述修饰使得本文中提供的经修饰的多肽当在体内时甚至稳定或更能够穿透进细胞中。此外,该术语也包括目标肽。在另一个实施方案中,本文提供的至少一个CTP肽连接至目标多肽或其片段或本文中提供的目标肽。在另一个实施方案中,当表示蛋白或多肽时,术语“其片段”包括目

标蛋白或多肽的截短形式,包括目标肽。

[0017] 在另一个实施方案中,术语蛋白或多肽的“其片段”表示功能片段(例如,具有与亲本多肽相同的生物活性或与亲本多肽相比增强的活性的片段)。其片段的例子可以包括多肽的变体、或从亲本多肽衍生出的肽。因此,应当理解,术语蛋白或多肽的“其片段”和术语“肽”可以在本文中互换使用。

[0018] 在一个实施方案中,本文提供了使目标多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积增加至少约28kDa的方法,所述方法包括下述步骤:在所述多肽或其片段的N-端或C-端上将所述多肽或其片段融合至至少一个绒毛膜促性腺激素C-端肽(CTP)。

[0019] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加目标多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将1-10个绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所述多肽或其片段,其中将所述1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段会导致增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。在另一个实施方案中,每个连接至所述多肽或其片段的糖基化的CTP使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加约28-53kDa,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。在另一个实施方案中,每个连接至所述多肽或其片段的未糖基化的CTP使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加约8.0-22kDa,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。在另一个实施方案中,每个连接至所述多肽或其片段的未糖基化的CTP使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加约8.1-21.6kDa,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0020] 在另一个实施方案中,本文提供了一种增加多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将1-10个绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所述多肽或其片段,其中将所述1-10个CTP连接至所述多肽或其片段会导致使所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加一定量,所述量取决于所述CTP所连接的特定多肽或其片段,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0021] 在一个实施方案中,所述1-10个CTP连接至所述多肽的N-端。在另一个实施方案中,所述1-10个CTP连接至所述多肽的C-端。在另一个实施方案中,所述1-10个CTP连接至所述多肽的N-端和C-端。在另一个实施方案中,一个CTP连接至所述多肽的N-端且两个CTP连接至所述多肽的C-端。在另一个实施方案中,两个CTP连接至所述多肽的N-端且两个CTP连接至所述多肽的C-端。

[0022] 在一个实施方案中,术语“流体动力学尺寸”或“流体动力学体积”在本文中可互换地使用,且各自表示分子(例如,蛋白分子)的表观大小,其基于所述分子在水溶液中的扩散。可以处理蛋白在溶液中的扩散或运动以衍生出蛋白的表观大小,其中所述大小由蛋白颗粒的“斯托克斯半径”或“流体动力学半径”给出。蛋白的“流体动力学尺寸”取决于质量和形状(构象),使得两种具有相同分子质量的蛋白可以基于所述蛋白的总构象而具有不同的流体动力学尺寸。

[0023] 在另一个实施方案中,所述糖基化的类型是O-糖基化。在另一个实施方案中,所述O-糖基化的类型是通过通过 α -糖苷键与蛋白链中的丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)的GalNAc连接。在另一个实施方案中,所述O-糖基化的类型是与蛋白链中的Ser或Thr残基的N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)连接。在另一个实施方案中,所述O-糖基化的类型是O-岩藻糖基化、O-

甘露糖基化、核心10-糖基化、核心20-糖基化或O-葡萄糖基化。在另一个实施方案中,所述O-糖基化是粘蛋白-型O-糖基化。在另一个实施方案中,所述O-糖基化包含与丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、羟赖氨酸或羟脯氨酸侧链的羟基氧连接的O-连接的聚糖。在另一个实施方案中,所述O-糖基化之后添加半乳糖和/或唾液酸,其中在其它实施方案中,在O-糖基化以后向目标蛋白添加至少一个半乳糖分子,和/或添加至少一个唾液酸分子。在另一个实施方案中,添加约1-3个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约1-3个唾液酸分子。在另一个实施方案中,添加约1-5个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约1-5个唾液酸分子。在另一个实施方案中,添加约1-10个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约1-20个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约21-30个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约31-40个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约41-50个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约51-60个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约61-70个半乳糖分子。在另一个实施方案中,添加约1-10个唾液酸分子。在另一个实施方案中,每添加一个半乳糖分子添加2个唾液酸分子。在另一个实施方案中,每个CTP添加约1-5个半乳糖分子。在另一个实施方案中,每个CTP添加约1-10个唾液酸分子。在另一个实施方案中,在每个CTP修饰的多肽或其片段中总计添加约1-60个半乳糖分子和添加约1-120个唾液酸分子。

[0024] 在另一个实施方案中,本文提供的糖基化的类型是N-糖基化。在另一个实施方案中,N-连接的聚糖连接至天冬酰胺或精氨酸侧链的氮。N-连接的氨基酸共有序列是Asn-任意氨基酸-Ser或Thr,其中任意氨基酸可以不是脯氨酸。

[0025] 在另一个实施方案中,本文提供了一种增加多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将至少一个未糖基化的绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至目标多肽或其片段的N-端或C-端,其中将至少一个CTP连接至所述多肽或其片段会导致所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加一定量,所述量取决于所述CTP所连接的特定多肽或其片段,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0026] 在一个实施方案中,糖基化的CTP会增加它所连接或融合的蛋白的流体动力学体积。在另一个实施方案中,未糖基化的CTP会增加它所连接或融合的蛋白的流体动力学体积。

[0027] 在一个实施方案中,CTP修饰的蛋白(其在所述蛋白的天然部分中含有聚糖)会贡献对一个拷贝的糖基化的CTP的流体动力学体积的较高增量,例如,本文中的实施例3/表5证实,FIX和FVIIa-CTP修饰的蛋白(其在所述蛋白的天然部分中含有聚糖)会贡献对一个拷贝的糖基化的CTP的流体动力学体积的较高增量。

[0028] 技术人员会明白,当受本发明的说明书指引时,可以将糖基化的CTP和未糖基化的CTP的组合用于增加本文中提供的多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积。可以进行这样的操作,以便使多肽或其片段的流体动力学体积增加至最佳或期望的水平。在一个实施方案中,流体动力学体积的这样的最佳或期望的增加水平与在受试者中增强的保留时间、从受试者的低清除率和目标多肽或其片段的增强的生物活性有关。在一个实施方案中,将1-5个糖基化的CTP和1-5个未糖基化的CTP并行地连接至本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,将糖基化的或未糖基化的CTP肽串联地连接至N-端或C-端,或随机地连接至N-端和C-端。技术人员还会理解,可以使用糖基化的和未糖基化的CTP肽的额外组合,且因

此被本发明包括。

[0029] 在一个实施方案中,术语“连接”及其语法变体表示一个蛋白、多肽或肽与另一个蛋白、多肽或肽的结合。在另一个实施方案中,这样的结合表示目标蛋白、多肽或肽与本文中提供的至少一个CTP肽的结合。在另一个实施方案中,这样的结合表示目标蛋白、多肽或肽与本文中提供的1-10个CTP肽的结合。这样的结合可以通过众多方式实现,所述方式包括、但不限于共价结合、氢结合、离子结合、金属结合、极性共价结合、非共价结合(范德华相互作用、疏水相互作用、氢键合等)、通过使用接头实现的结合等。

[0030] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加目标多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积的方法,所述方法包括:将至少一个未糖基化的绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所述多肽或其片段的N-端或C-端,其中将至少一个CTP连接至所述多肽或其片段会导致所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积增加一定量,所述量取决于所述CTP所连接的特定多肽或其片段,由此增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积。

[0031] 在另一个实施方案中,使用本领域已知的方法,包括、但不限于基于酶的去糖基化,将本文提供的CTP去糖基化。

[0032] 技术人员会明白,术语“未糖基化”和“去糖基化”及其语法变体在本文中可互换地使用。

[0033] 在另一个实施方案中,本文提供了一种针对目标多肽或其片段增加体内生物活性、增加血清半衰期、增加生物利用度、增加效能或扩展曲线下面积(AUC)等(如本文中另外提供的)的方法,所述方法包括下述步骤:将至少一个糖基化的CTP肽与所述多肽或其片段融合,其中将糖基化的CTP肽与所述多肽或其片段融合会导致,与未修饰的多肽或其片段的流体动力学体积相比,所述多肽或其片段的流体动力学体积增加至少约28kDa。

[0034] 在另一个实施方案中,所述CTP修饰的多肽具有较低体外生物活性,但是该较低活性被延长的半衰期补偿。在另一个实施方案中,所述CTP修饰的多肽具有增加的体外生物活性。

[0035] 在另一个实施方案中,增加本文中提供的多肽或其片段的流体动力学体积会降低所述多肽或其片段的施用频率。在另一个实施方案中,增加所述多肽或其片段的流体动力学体积也会增加所述多肽或其片段的表观分子量。

[0036] 在一个实施方案中,使用本领域众所周知的方法,包括、但不限于,尺寸排阻色谱法(SEC)、动态光散射方法(DLS)、沉降速度、沉降平衡离心和分光光度测量检测,确定表观分子量。在另一个实施方案中,使用本领域中可得到的蛋白质组学软件,确定理论分子量。这样的软件包括、但不限于ExPASy portal、ProteoIQ、Scaffold 3等。在另一个实施方案中,使用本领域众所周知的方法,包括、但不限于MALDI-TOF,确定实际分子量。

[0037] 在另一个实施方案中,本文提供了一种使目标多肽或其片段的表观分子量增加至少28kDa的方法。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约1-14kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约15-27kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-40.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连

接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-55.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-70.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-80.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-90.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约28-100.0kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约41.0-50kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP肽。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约51.0-60kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP肽。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量增加约61.0-70kDa的方法,所述方法包括:向所述多肽或其片段连接至少一个CTP肽。在另一个实施方案中,所述CTP是糖基化的。在另一个实施方案中,所述CTP是未糖基化的CTP。

[0038] 在一个实施方案中,本文中提供的方法意外地证实,向目标多肽或其片段随后添加糖基化的CTP肽会线性地贡献与CTP肽向所述目标多肽或其片段的先前连接大约相同的表观分子量(参见表4)。

[0039] 在另一个实施方案中,至少一个糖基化的CTP会为目标蛋白贡献每个糖基化的CTP约28-40kDa。在另一个实施方案中,至少一个糖基化的CTP会为目标蛋白贡献每个糖基化的CTP约28-55kDa,不论连接的CTP的数目如何。

[0040] 在一个实施方案中,本文提供了一种使目标多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约2倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约3-5倍的方法,所述方法包括下述步骤:将至少一个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约6-10倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约11-20倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约21-30倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段,所述方法包括下述步骤:将至少一个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约31-40倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约41-50倍的方法,所述方法包括下述步骤:将至少一个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约51-60倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接

至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约61-70倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约71-80的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约81-90倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,本文提供了一种使多肽或其片段的表观分子量比所述多肽或其片段的理论分子量增加约91-100倍的方法,所述方法包括下述步骤:将1-10个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,将至少一个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,将1-5个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,将1-15个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,将1-20个CTP肽连接至所述多肽或其片段。在另一个实施方案中,至少一个CTP肽是糖基化的。在另一个实施方案中,至少一个CTP肽是未糖基化的CTP肽。

[0041] 在另一个实施方案中,增加目标多肽或其片段或目标肽的生物活性、血清半衰期、生物利用度、效能等的方法包括:通过将糖基化的CTP连接至所述多肽或其片段,使目标多肽或其片段的总流体动力学体积与未修饰的多肽或其片段相比增加约28kDa。在另一个实施方案中,增加目标多肽或其片段的生物活性、血清半衰期、生物利用度等的方法包括:通过将本文中提供的CTP连接至所述多肽或其片段,使所述多肽或其片段的总流体动力学体积与未修饰的目标多肽或其片段相比增加约1-10kDa、11-20kDa、21-30kDa、31-40kDa、41-50kDa、51-60kDa、61-70kDa、71-80kDa、81-90kDa、91-100kDa、100-150kDa、151-200kDa、201-400kDa、401-1000kDa或1001-5000kDa。

[0042] 在另一个实施方案中,在本文提供的方法中,至少一个CTP是糖基化的。在另一个实施方案中,在本文提供的方法中,至少一个CTP为本文中也提供的多肽或其片段贡献每个CTP约28.3-38.7kDa的流体动力学体积。在另一个实施方案中,所述糖基化的CTP贡献每个CTP 28.3-38.7kDa,不论它结合哪种多肽或其片段(参见本文中的实施例3)。在另一个实施方案中,所述糖基化的CTP贡献每个CTP 28.3-38.7kDa,不良与所述多肽连接的CTP肽的数目(参见本文中的实施例3)。在另一个实施方案中,至少一个CTP的贡献是至少20kDa。在另一个实施方案中,至少一个CTP的贡献是至少约20kDa至27.9kDa。在另一个实施方案中,一个CTP的贡献是至少28kDa。在另一个实施方案中,一个CTP的贡献是约28kDa至40kDa。在另一个实施方案中,一个CTP的贡献是约41kDa至50kDa。在另一个实施方案中,一个CTP的贡献是约51kDa至60kDa。

[0043] 在另一个实施方案中,增加目标多肽或其片段的血清半衰期或增强目标多肽或其片段的效能的方法包括,使所述多肽或其片段的流体动力学体积与未修饰的多肽或其片段相比增加约84kDa。在另一个实施方案中,使流体动力学体积增加约84kDa对应于根据本文提供的方法将多肽或其片段连接至3个糖基化的CTP肽而进行修饰。在另一个实施方案中,在连接至本文中提供的多肽或其片段的3个糖基化的CTP肽中,一个糖基化的CTP肽连接至多肽或其片段的N-端,而2个糖基化的CTP肽串联地连接至多肽或其片段的C-端。

[0044] 在一个实施方案中,增加目标多肽或其片段的血清半衰期或生物活性的方法包

括,使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的多肽或其片段相比增加约84-159kDa。在另一个实施方案中,通过将2个糖基化的CTP肽至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约56-110kDa。在另一个实施方案中,通过将3个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约84-162kDa。在另一个实施方案中,通过将4个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约112-230kDa。在另一个实施方案中,通过将5个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140-280kDa。在另一个实施方案中,通过将6个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约168-330kDa。在另一个实施方案中,通过将7个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约196-390kDa。在另一个实施方案中,通过将8个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约224-425kDa。在另一个实施方案中,通过将9个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约252-480kDa。在另一个实施方案中,通过将10个糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段,实现使流体动力学尺寸或体积增加约280-330kDa。

[0045] 在一个实施方案中,本文中提供的方法还包括将未糖基化的CTP连接至目标多肽或其片段。应当理解,可以进行用糖基化的和/或未糖基化的CTP修饰目标多肽或其片段的多种方式。在一个实施方案中,仅用至少一个糖基化的CTP或仅用至少一个未糖基化的CTP修饰目标多肽或其片段。在另一个实施方案中,用至少一个糖基化的CTP和至少一个未糖基化的CTP修饰目标多肽或其片段。在另一个实施方案中,将糖基化的CTP和/或未糖基化的CTP的截短形式用在本文提供的方法中。

[0046] 在另一个实施方案中,本文提供了一种通过使目标多肽或其片段的流体动力学体积增加特定量来增加目标多肽或其片段的生物活性、血清半衰期、生物利用度、效能等的方法,所述方法包括:将至少一个绒毛膜促性腺激素羧基端肽(CTP)连接至所述多肽的N-端或C-端,其中将至少一个未糖基化的CTP肽连接至目标多肽或其片段会导致与多肽或其片段的未修饰形式相比增加所述多肽或其片段的流体动力学尺寸或流体动力学体积,且其中特定量取决于未糖基化的CTP所连接的目标多肽或其片段。在另一个实施方案中,当将至少一个未糖基化的CTP连接至目标多肽或其片段时,未糖基化的CTP所连接的目标多肽决定了表观分子量或流体动力学体积的增加量。在另一个实施方案中,当将一个未糖基化的CTP连接至hGH时,所述未糖基化的CTP会给人生长激素(hGH)的流体动力学尺寸或流体动力学体积贡献约8kDa。在另一个实施方案中,当将一个未糖基化的CTP连接至红细胞生成素(EPO)时,未糖基化的CTP会给EPO的流体动力学尺寸或流体动力学体积贡献约16kDa。在另一个实施方案中,当将一个未糖基化的CTP连接至载脂蛋白-A1(APO-A1)时,未糖基化的CTP会给APO-A1的流体动力学尺寸或流体动力学体积贡献约21kDa。在另一个实施方案中,当将一个未糖基化的CTP连接至因子IX(FIX)时,未糖基化的CTP会给FIX的流体动力学尺寸或流体动力学体积贡献约20kDa。在另一个实施方案中,当将一个未糖基化的CTP连接至因子VIIa(FVIIa)时,未糖基化的CTP会给FIX的流体动力学尺寸或流体动力学体积贡献约20kDa。

[0047] 在一个实施方案中,增加本文中提供的目标多肽或其片段的流体动力学体积的方法会增强多肽的或其片段的生物利用度。

[0048] 在另一个实施方案中,增加本文中提供的目标多肽或其片段的流体动力学体积的

方法会降低目标多肽或其片段的施用频率。

[0049] 在一个实施方案中,通过本文提供的方法修饰的多肽是细胞因子、单克隆抗体、生长因子、激素、细胞因子、凝血因子、酶等。

[0050] 在另一个实施方案中,至少一个CTP肽所连接的多肽是促红细胞生成素(EPO)、人生长激素(hGH)、载脂蛋白A1(APO-A1)、因子IIa(FVIIa)、因子IX(FIX)或胃泌酸调节素(OXM)。

[0051] 在一个实施方案中,至少一个未糖基化的CTP会给EPO贡献约16kDa。在另一个实施方案中,当连接至EPO时,至少一个未糖基化的CTP会给EPO的表观分子量贡献约16kDa。在另一个实施方案中,至少一个未糖基化的CTP会给hGH贡献约8kDa。在另一个实施方案中,当连接至hGH时,至少一个未糖基化的CTP会给hGH的表观分子量贡献约8kDa。在另一个实施方案中,至少一个未糖基化的CTP会给APO-A1贡献约21kDa。在另一个实施方案中,当连接至APO-A1时,至少一个未糖基化的CTP会给APO-A1的表观分子量贡献约21kDa。

[0052] 在一个实施方案中,所述未糖基化的CTP给所述未糖基化的CTP所连接的每个多肽贡献不同的流体动力学体积。在另一个实施方案中,该差异取决于未糖基化的CTP所结合的多肽或其片段(参见本文中的实施例3)。在另一个实施方案中,所述未糖基化的CTP意外地贡献相同的流体动力学尺寸(对于每个特定多肽上的每个CTP而言),不论与多肽连接的未糖基化的CTP肽的数目(参见本文中的实施例3)。

[0053] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加hGH的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的hGH相比增加约28-40kDa。在另一个实施方案中,通过将约2个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约56-80kDa。在另一个实施方案中,通过将约3个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约84-120kDa。在另一个实施方案中,通过将约4个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约112-160kDa。在另一个实施方案中,通过将约5个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140-200kDa。在另一个实施方案中,通过将约6个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约168-240kDa。在另一个实施方案中,通过将约7个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约196-280kDa。在另一个实施方案中,通过将约8个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约224-320kDa。在另一个实施方案中,通过将约9个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约252-360kDa。在另一个实施方案中,通过将约10个糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约280-400kDa。在另一个实施方案中,将1-10个截短的或部分CTP肽连接至目标多肽或其片段。

[0054] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加EPO的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的EPO相比增加约28-40kDa。在另一个实施方案中,通过将2个糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约56-80kDa。在另一个实施方案中,通过将3个糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约84-120kDa。在另一个实施方案中,通过将4个糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约112-160kDa。在另一个实施方案中,通过将5个糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140-

200kDa。在另一个实施方案中,通过将6个糖基化的CTP肽连接至EP0,实现使流体动力学尺寸或体积增加约168-240kDa。在另一个实施方案中,通过将7个糖基化的CTP肽连接至EP0,实现使流体动力学尺寸或体积增加约196-280kDa。在另一个实施方案中,通过将8个糖基化的CTP肽连接至EP0,实现使流体动力学尺寸或体积增加约224-320kDa。在另一个实施方案中,通过将9个糖基化的CTP肽连接至EP0,实现使流体动力学尺寸或体积增加约252-360kDa。在另一个实施方案中,通过将10个糖基化的CTP肽连接至EP0,实现使流体动力学尺寸或体积增加约280-400kDa。

[0055] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加AP0-A1的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的AP0-A1相比增加约28-40kDa。在另一个实施方案中,通过将2个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约56-80kDa。在另一个实施方案中,通过将3个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约84-120kDa。在另一个实施方案中,通过将4个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约112-160kDa。在另一个实施方案中,通过将5个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140-200kDa。在另一个实施方案中,通过将6个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约168-240kDa。在另一个实施方案中,通过将7个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约196-280kDa。在另一个实施方案中,通过将8个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约224-320kDa。在另一个实施方案中,通过将9个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约252-360kDa。在另一个实施方案中,通过将10个糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约280-400kDa。

[0056] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加FIX的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的FIX相比增加约48-53kDa。在另一个实施方案中,通过将2个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约96-106kDa。在另一个实施方案中,通过将3个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约144-159kDa。在另一个实施方案中,通过将4个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约192-212kDa。在另一个实施方案中,通过将5个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约240-265kDa。在另一个实施方案中,通过将6个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约288-318kDa。在另一个实施方案中,通过将7个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约336-371kDa。在另一个实施方案中,通过将8个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约384-424kDa。在另一个实施方案中,通过将9个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约432-530kDa。在另一个实施方案中,通过将10个糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约480-530kDa。

[0057] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加FVIIa的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的FVIIA相比增加约43-50kDa。在另一个实施方案中,通过将2个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约86-100kDa。在另一个实施方案中,通过将3个糖基化的CTP肽连

接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约129-150kDa。在另一个实施方案中,通过将4个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约172-200kDa。在另一个实施方案中,通过将5个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约215-250kDa。在另一个实施方案中,通过将6个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约258-300kDa。在另一个实施方案中,通过将7个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约301-350kDa。在另一个实施方案中,通过将8个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约344-400kDa。在另一个实施方案中,通过将9个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约387-450kDa。在另一个实施方案中,通过将10个糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约430-500kDa。

[0058] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加hGH的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的hGH相比增加约8kDa。在另一个实施方案中,通过将2个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约16kDa。在另一个实施方案中,通过将3个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约24kDa。在另一个实施方案中,通过将4个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约32kDa。在另一个实施方案中,通过将5个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约40kDa。在另一个实施方案中,通过将6个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约48kDa。在另一个实施方案中,通过将7个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约56kDa。在另一个实施方案中,通过将8个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约64kDa。在另一个实施方案中,通过将9个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约72kDa。在另一个实施方案中,通过将10个未糖基化的CTP肽连接至hGH,实现使流体动力学尺寸或体积增加约80kDa。

[0059] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加EPO的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的EPO相比增加约16kDa。在另一个实施方案中,通过将2个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约32kDa。在另一个实施方案中,通过将3个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约48kDa。在另一个实施方案中,通过将4个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约16kDa。在另一个实施方案中,通过将5个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约80kDa。在另一个实施方案中,通过将6个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约96kDa。在另一个实施方案中,通过将7个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约112kDa。在另一个实施方案中,通过将8个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约128kDa。在另一个实施方案中,通过将9个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约144kDa。在另一个实施方案中,通过将10个未糖基化的CTP肽连接至EPO,实现使流体动力学尺寸或体积增加约160kDa。

[0060] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加APO-A1的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的APO-A1相比增加约21kDa。在另一个实施方案中,通过将2个未糖基化的CTP肽连接至APO-A1,实现

使流体动力学尺寸或体积增加约42kDa。在另一个实施方案中,通过将3个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约63-120kDa。在另一个实施方案中,通过将4个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约84kDa。在另一个实施方案中,通过将5个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约105kDa。在另一个实施方案中,通过将6个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约126kDa。在另一个实施方案中,通过将7个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约147kDa。在另一个实施方案中,通过将8个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约168kDa。在另一个实施方案中,通过将9个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约189kDa。在另一个实施方案中,通过将10个未糖基化的CTP肽连接至AP0-A1,实现使流体动力学尺寸或体积增加约210kDa。

[0061] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加FIX的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的FIX相比增加约20kDa。在另一个实施方案中,通过将2个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约40kDa。在另一个实施方案中,通过将3个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约60kDa。在另一个实施方案中,通过将4个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约80kDa。在另一个实施方案中,通过将5个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约100kDa。在另一个实施方案中,通过将6个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约120kDa。在另一个实施方案中,通过将7个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140kDa。在另一个实施方案中,通过将8个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约160kDa。在另一个实施方案中,通过将9个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约180kDa。在另一个实施方案中,通过将10个未糖基化的CTP肽连接至FIX,实现使流体动力学尺寸或体积增加约200kDa。

[0062] 在一个实施方案中,本文提供了一种增加FVIIa的血清半衰期或生物活性的方法,所述方法包括下述步骤:使多肽或其片段的流体动力学尺寸或体积与未修饰的FVIIA相比增加约20kDa。在另一个实施方案中,通过将2个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约40kDa。在另一个实施方案中,通过将3个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约60kDa。在另一个实施方案中,通过将4个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约80kDa。在另一个实施方案中,通过将5个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约100kDa。在另一个实施方案中,通过将6个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约120kDa。在另一个实施方案中,通过将7个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约140kDa。在另一个实施方案中,通过将8个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约160kDa。在另一个实施方案中,通过将9个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约180kDa。在另一个实施方案中,通过将10个未糖基化的CTP肽连接至FVIIA,实现使流体动力学尺寸或体积增加约200kDa。

[0063] 在一个实施方案中,所述流体动力学体积会增加生物样品中的目标蛋白的保留时

间。在另一个实施方案中,所述流体动力学体积会增加生物样品中的目标蛋白的曲线下面积(AUC)。在另一个实施方案中,所述生物样品是血液、靶组织(例如,关节、CNS)、脑脊液(CSF)、淋巴液或血清。

[0064] 在另一个实施方案中,增加流体动力学体积会增加本文中提供的目标多肽或其片段的生物利用度。在另一个实施方案中,增加多肽的流体动力学体积也会延长多肽或其片段的血清半衰期。

[0065] 在另一个实施方案中,增加流体动力学体积会增加多肽的生物活性。

[0066] 在另一个实施方案中,术语“CTP肽”、“羧基端肽”和“CTP序列”在本文中可互换地使用。在另一个实施方案中,所述羧基端肽是全长CTP。在另一个实施方案中,所述羧基端肽是截短的CTP。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0067] 在另一个实施方案中,将信号肽连接至CTP的氨基端,如在US 7,553,940中所述,其通过引用整体并入本文。

[0068] 在另一个实施方案中,至少一个CTP经由接头连接至多肽。在另一个实施方案中,所述接头是肽键。在另一个实施方案中,所述融合蛋白形成CTP修饰的多肽。在一个实施方案中,增加多肽或其片段的流体动力学体积的方法包括,将多肽或其片段在所述多肽或其片段的氨基或羧基端上与至少一个CTP肽融合。在另一个实施方案中,将CTP与多肽或其片段重组地融合。在另一个实施方案中,将CTP化学缀合至多肽或其片段。

[0069] 在一个实施方案中,所述CTP修饰的多肽包含含有少于50个氨基酸的肽和连接至所述肽的N-(氨基)或C-(羧基)端的至少一个绒毛膜促性腺激素羧基端肽。

[0070] 在一个实施方案中,包含与它们的N-端和/或C-端连接的至少单个CTP的、本发明的经工程改造的目标多肽在生物活性方面至少等同于未CTP修饰的目标多肽。在其它实施方案中,包含与它们的N-端和/或C-端连接的至少一个CTP的、本发明的经工程改造的目标多肽在药理学量度诸如药代动力学和药效动力学方面至少等同于未CTP修饰的目标多肽。

[0071] 在一个实施方案中,本文中提供的CTP序列包含:DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL(SEQ ID NO:1)。在另一个实施方案中,所述CTP序列包含:SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ(SEQ ID NO:2)。在另一个实施方案中,所述CTP序列包含选自在SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2中所示序列的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述CTP序列选自SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。

[0072] 在一个实施方案中,本发明的羧基端肽(CTP)肽包含人绒毛膜促性腺激素的从氨基酸112至位置145的氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的CTP序列包含如在SEQ ID NO:2中所示的、人绒毛膜促性腺激素的从氨基酸118至位置145的氨基酸序列。在另一个实施方案中,所述CTP序列也始于位置112-118之间的任意位置且终止于人绒毛膜促性腺激素的位置145。在另一个实施方案中,所述CTP序列肽具有28、29、30、31、32、33或34个氨基酸的长度且始于CTP氨基酸序列的位置112、113、114、115、116、117或118。

[0073] 在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:3的前10个氨基酸。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:3包含下述氨基酸(AA)序列:SSSSKAPPPSLP。

[0074] 在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2的前11个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2的前12个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的前8个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP

包含SEQ ID NO:2的前13个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2的前14个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的前6个氨基酸。在一个实施方案中,所述截短的CTP包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的前5个氨基酸。

[0075] 在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差1-5个保守的氨基酸置换,如在美国专利号5,712,122中所述,其通过引用并入本文。在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差1个保守的氨基酸置换。在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差2个保守的氨基酸置换。在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差3个保守的氨基酸置换。在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差4个保守的氨基酸置换。在另一个实施方案中,所述CTP肽是绒毛膜促性腺激素CTP的变体,所述变体与天然CTP相差5个保守的氨基酸置换。

[0076] 在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少40%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少50%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少60%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少70%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少80%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少90%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少95%同源性。在另一个实施方案中,本发明的CTP肽氨基酸序列与天然CTP氨基酸序列或其肽具有至少98%同源性。

[0077] 在另一个实施方案中,编码本发明的CTP肽的多核苷酸与天然人CTP DNA序列或其肽具有至少70%同源性。在另一个实施方案中,编码本发明的CTP肽的多核苷酸与天然人CTP DNA序列或其肽具有至少80%同源性。在另一个实施方案中,编码本发明的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少90%同源性。在另一个实施方案中,编码本发明的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少95%同源性。在另一个实施方案中,编码本发明的CTP肽的多核苷酸与天然CTP DNA序列或其肽具有至少98%同源性。

[0078] 在一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的至少一个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列二者都被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的3个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的4个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的5个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的6个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的7个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的8个被截短。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个或更多个被截短。在另一个实施方案中,所有绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都被截短。

[0079] 在一个实施方案中,本文提供的CTP肽经由接头连接至本文提供的多肽或其片段。在一个实施方案中,1-10个CTP肽经由接头连接至本文提供的多肽或其片段。在一个实施方案中,至少一个CTP经由接头连接至本文提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,所述接头是肽键。

[0080] 在一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的至少一个被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列二者都被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的3个被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的4个被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的5个被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个或更多个被糖基化。在另一个实施方案中,所有绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都被糖基化。

[0081] 在一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的至少一个未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列二者都未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的3个未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的4个未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的5个未被糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的2个或更多个未被糖基化。在另一个实施方案中,所有绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列都未被糖基化。

[0082] 在一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含至少一个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含2个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含3个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含4个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含5个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含6个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含7个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的糖基化的CTP序列包含8个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的CTP序列包含1-4个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的CTP序列包含4-9个糖基化位点。在另一个实施方案中,本发明的CTP序列包含6-12个糖基化位点。

[0083] 在一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的至少一个被完全糖基化。在另一个实施方案中,绒毛膜促性腺激素CTP氨基酸序列中的至少一个被部分地糖基化。在一个实施方案中,部分地糖基化指示,至少一个CTP糖基化位点被糖基化。在另一个实施方案中,所述糖基化位点是O-糖基化位点。在另一个实施方案中,所述糖基化位点是N-糖基化位点。

[0084] 在一个实施方案中,在连接至目标多肽、药物或试剂时允许使用较低剂量方面,所述CTP序列修饰是有利的。在另一个实施方案中,在允许更少剂量的目标多肽、药物或试剂方面,所述CTP序列修饰是有利的。在另一个实施方案中,在施用CTP修饰的目标多肽、药物或试剂时允许安全的长效效应方面,所述CTP序列修饰是有利的。

[0085] 在另一个实施方案中,对本文中的目标多肽和CTP肽的修饰包括、但不限于C端修饰、多肽键修饰,包括、但不限于,CH₂-NH、CH₂-S、CH₂-S=O、O=C-NH、CH₂-O、CH₂-CH₂、S=C-

NH、CH=CH或CF=CH、主链修饰和残基修饰。用于制备肽拟似物化合物的方法是本领域众所周知的，且参见，例如，Quantitative Drug Design, C.A.Ramsden Gd., 第17.2章，F.Choplin Pergamon Press (1992)，其通过引用并入如同在本文中完整地阐述。在下文中提供了在这方面的其它细节。

[0086] 在另一个实施方案中，在多肽内的多肽键(-CO-NH-)被置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被N-甲基化的键(-N(CH₃)-CO-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被酯键(-C(R)H-C-O-O-C(R)-N-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被酮亚甲基键(-CO-CH₂-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被 α -氮杂键(-NH-N(R)-CO-)置换，其中R是任意烷基，例如，甲基亚胺键(-CH₂-NH-)。在另一个实施方案中，所述多肽键被羟基亚乙基键(-CH(OH)-CH₂-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被硫代酰胺键(-CS-NH-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被烯族双键(-CH=CH-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被反酰胺键(-NH-CO-)置换。在另一个实施方案中，所述多肽键被多肽衍生物(-N(R)-CH₂-CO-)置换，其中R是天然地存在于碳原子上的“标准”侧链。在另一个实施方案中，这些修饰沿着多肽链发生在任意键处，且在一个实施方案中，同时发生在几个(2-3个键)处。

[0087] 在一个实施方案中，多肽的天然芳族氨基酸诸如Trp、Tyr和Phe被置换为合成的非天然酸诸如苯基甘氨酸、TIC、萘基丙氨酸(No1)、Phe的环-甲基化衍生物、Phe的卤化衍生物或o-甲基-Tyr。在另一个实施方案中，本发明的多肽包括一个或多个修饰的氨基酸或者一个或多个非氨基酸单体(例如脂肪酸、复合糖等)。

[0088] 在一个实施方案中，“氨基酸”或“氨基酸序列”被理解为包括20种天然存在的氨基酸；经常在体内翻译后修饰的那些氨基酸，包括例如羟脯氨酸、磷酸丝氨酸和磷酸苏氨酸；和其它罕见氨基酸，包括、但不限于2-氨基己二酸、羟赖氨酸、异锁链素、正-缬氨酸、正-亮氨酸和鸟氨酸。在一个实施方案中，“氨基酸”包括D-和L-氨基酸。

[0089] 在另一个实施方案中，生化地合成本发明的经工程改造的多肽或肽，诸如通过使用标准的固相技术。在另一个实施方案中，这些生化方法包括排它固相合成法、部分固相合成法、片段缩合法或经典的溶液合成法。

[0090] 在一个实施方案中，使用重组蛋白技术来制备本发明的经工程改造的目标多肽或其片段。在另一个实施方案中，重组技术由以下文献描述：Bitter等人，(1987) Methods in Enzymol. 153:516-544, Studier等人(1990) Methods in Enzymol. 185:60-89, Brisson等人(1984) Nature 310:511-514, Takamatsu等人(1987) EMBO J. 6:307-311, Coruzzi等人(1984) EMBO J. 3:1671-1680和Brogli等人，(1984) Science 224:838-843, Gurley等人(1986) Mol. Cell. Biol. 6:559-565和Weissbach & Weissbach, 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, 第VIII部分，第421-463页，它们通过引用整体并入本文。

[0091] 在另一个实施方案中，所述CTP修饰的目标多肽或其片段包含含有少于50个氨基酸的肽和连接至所述多肽的N-端或C-端的至少一个糖基化的和/或未糖基化的绒毛膜促性腺激素羧基端肽。在一个实施方案中，本文中提供的CTP修饰的目标多肽或其片段包含含有少于40个氨基酸的肽和连接至所述多肽的N-端或C-端的至少一个绒毛膜促性腺激素羧基端肽。在另一个实施方案中，本文中提供的CTP修饰的目标多肽或其片段包含含有少于30、20或10个氨基酸的肽。在一个实施方案中，含有少于50个氨基酸的目标多肽或其片段包括

本文中提供的肽。在另一个实施方案中,含有少于50个氨基酸的肽是hGH、OXM、EPO、载脂蛋白A1 (APO-A1)、干扰素、细胞因子或凝血因子。

[0092] 在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是EPO。在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是APO。在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是FVIIa。在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是FIX。在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是干扰素。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是hGH。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是OXM。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是GLP-1。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是胰岛素。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是脑啡肽。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是ACTH。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是胰高血糖素。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是胰岛素-样生长因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是表皮生长因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是酸性的或碱性的成纤维细胞生长因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是血小板-衍生的生长因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是粒细胞-CSF。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是巨噬细胞-CSF。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是IL-2。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是IL-3。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是肿瘤坏死因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是LHRH。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是LHRH类似物。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是生长抑素。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是生长激素释放因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是内啡肽。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是肺泡表面活性蛋白。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是利钠因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是粘附素。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是血管生成抑制因子。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是内皮他丁。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是受体肽。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是结合受体的配体。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是抗体。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是抗体片段。在另一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是肽或蛋白,包括任何修饰形式。

[0093] 在另一个实施方案中,所述目标多肽或其片段另外包含连接在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和/或连接在C-端上的一个CTP氨基酸肽。在另一个实施方案中,所述目标多肽或其片段选自以下列表:胰岛素、Albutein/白蛋白、Activase altiplase/tPA、腺苷脱氨酶、免疫球蛋白、葡糖脑苷脂酶、Leukine-沙格司亭/GM-CSF、G-CSF、Venoglobulin-S/IgG、Proleukin阿地白介素、DNA酶、因子VIII、Helixate、L-天门冬酰胺酶、WinRho SDF Rh I、Retavase retaplastase/tPA、因子IX、FSH、球蛋白、纤维蛋白、白介素-11、贝卡普勒明/PDGF、来匹卢定/herudrin、TNF、胸腺球蛋白、因子VIIa、干扰素 α -2a、干扰素 α n-1、干扰素 α -N3、干扰素 β -1b、干扰素 γ -1b、白介素-2、HGH或单克隆抗体。

[0094] 在一个实施方案中,本文中提供的目标多肽或其片段进一步包含信号肽。在另一个实施方案中,所述目标多肽或其片段是生长激素。在另一个实施方案中,所述生长激素进

一步包含信号肽。在另一个实施方案中,在表达和分泌以后,从前体工程肽/多肽切掉信号肽,产生成熟的工程肽/多肽。在另一个实施方案中,信号序列包括、但不限于内源性信号序列。

[0095] 在另一个实施方案中,本发明的多肽和方法提供了另外具有包含下述氨基酸序列的信号肽的生长激素:MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSA (SEQ ID NO:4)。

[0096] 在另一个实施方案中,以与未修饰的生长激素相同的方式使用本发明的CTP-修饰的或缀合的生长激素。在另一个实施方案中,本发明的缀合的生长激素具有增加的循环半衰期和血浆停留时间、降低的清除率和增加的体内临床活性。在另一个实施方案中,由于如本文中所述的缀合的生长激素的改善的性能,以比未修饰的生长激素更低的频率施用这些缀合物。在另一个实施方案中,每周1次至每2周1次施用如本文中所述的缀合的生长激素。在另一个实施方案中,每2周1次至每3周1次施用如本文中所述的缀合的生长激素。在另一个实施方案中,每天1次至每周3次施用如本文中所述的缀合的生长激素。在另一个实施方案中,降低的施用频率将导致改善的患者顺应性,从而导致改善的治疗结果以及改善的患者生活质量。在另一个实施方案中,与连接至聚乙二醇的生长激素的常规缀合物相比,已经发现,具有本发明的缀合物的分子量和接头结构的生长激素CTP缀合物具有改善的效能、改善的稳定性、增加的曲线下面积(AUC)水平和增强的循环半衰期。在另一个实施方案中,与连接至聚乙二醇的生长激素的常规缀合物相比,已经发现,有本发明的缀合物的分子量和接头结构的生长激素具有改善的效能、改善的稳定性、增加的AUC水平、增强的循环半衰期。在另一个实施方案中,与连接至聚乙二醇的生长激素的常规缀合物相比,已经发现,具有本发明的缀合物的最佳流体动力学体积的生长激素具有改善的效能、改善的稳定性、增加的AUC水平、增强的循环半衰期。在另一个实施方案中,缀合的生长激素的治疗有效量是体内可测量的预期生物活性所需的缀合物的量。在另一个实施方案中,根据本发明的教导利用的生长激素表现出增加的效能。在另一个实施方案中,CTP序列与生长激素的N-端和C-端的连接导致延长的体内活性。

[0097] 在另一个实施方案中,所述生长激素是本领域技术人员已知的任意生长激素。在另一个实施方案中,所述生长激素是人生长激素。在另一个实施方案中,生长激素的核苷酸序列和/或氨基酸序列可在基因库数据库中得到。在另一个实施方案中,所述生长激素是在本文中提供的生长激素和/或在基因库数据库中提供的生长激素的同系物。在另一个实施方案中,同系物也表示删除、插入或置换变体,包括其氨基酸置换和它们的生物活性的多肽片段。

[0098] 在另一个实施方案中,所述生长激素是缺少外显子2、3、4的hGH的变体或它们的任意组合。在另一个实施方案中,所述生长激素包含信号肽。在另一个实施方案中,所述生长激素包含信号切割位点。在另一个实施方案中,包含用本发明的CTP修饰的GH的多肽包含重组GH。

[0099] 在另一个实施方案中,如本文中所述的生长激素是生长激素(GH)-样细胞因子的超家族的一个成员。在另一个实施方案中,如本文中所述的生长激素是人生长激素(hGH)。在另一个实施方案中,人生长激素包含下述氨基酸序列(Genbank登记号P01241):

[0100] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKY
SFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE

EGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:5)。

[0101] 在另一个实施方案中,人生长激素包含下述氨基酸序列:

[0102] MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTSPNREET QQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTY SKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:6)。在另一个实施方案中,人生长激素包含下述氨基酸序列:MFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLA (SEQ ID NO:7)。在另一个实施方案中,hGH包含下述氨基酸序列:MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKVQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:8)。在另一个实施方案中,hGH是置换变体,其中在hGH的位置65中的谷氨酰胺被缬氨酸置换。

[0103] 在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号AAA72260下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号AAK69708下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号CAA01435下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号CAA01329下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号CAA00380下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号AAA72555下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号NP_000506.2下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号NP_072053.1下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号NP_072054.1下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号NP_072055.1下保藏的基因库氨基酸序列。在另一个实施方案中,本发明的生长激素包含在登记号NP_072056.1下保藏的基因库氨基酸序列。

[0104] 在另一个实施方案中,编码如本文中所述的生长激素的核酸分子会编码本领域技术人员已知的生长激素的任意氨基酸序列。在另一个实施方案中,编码如本文中所述的生长激素的核酸分子会编码hGH。在另一个实施方案中,所述编码生长激素的核酸分子包含在登记号NM_000515.3下保藏的基因库核酸序列。在另一个实施方案中,所述编码生长激素的核酸分子包含在登记号NM_022559.2下保藏的基因库核酸序列。在另一个实施方案中,所述编码生长激素的核酸分子包含在登记号NM_022560.2下保藏的基因库核酸序列。在另一个实施方案中,所述编码生长激素的核酸分子包含在登记号NM_022561.2下保藏的基因库核酸序列。在另一个实施方案中,所述编码生长激素的核酸分子包含在登记号NM_022562.2下保藏的基因库核酸序列。

[0105] 在另一个实施方案中,包含本发明的生长激素的多肽包含一个连接至生长激素的C-端的CTP (hGH-CTP) 且具有下述氨基酸序列:

[0106] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDTYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSES IPTSPNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLMGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKMDKVVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO:9)。

[0107] 在另一个实施方案中,包含本发明的生长激素的多肽包含2个串联连接至生长激素的C-端的CTP (hGH-CTP-CTP) 且具有下述氨基酸序列:

[0108] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSAFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKY SFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLE EGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSS SKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:10)。

[0109] 在另一个实施方案中,包含本发明的生长激素的多肽包含2个串联连接至生长激素的C-端的CTP和1个连接至生长激素的N-端的CTP (CTP-hGH-CTP-CTP) 且具有下述氨基酸序列:

[0110] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAM LRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPV QFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDT PILPQ (SEQ ID NO:11)。

[0111] 在另一个实施方案中,包含本发明的生长激素的多肽包含2个串联连接至生长激素的C-端的CTP (其中两个CTP中的一个CTP被截短,且另一个CTP连接至生长激素的N-端) (tCTP-hGH-CTP-CTP) 且具有下述氨基酸序列:

[0112] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPFPTIPLSRLFDNAMLRAHRLHQLAFDITYQE FEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPVQFLRSVFANSLVYGAS DSNVYDLLKDLEEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCFRKDMDKVETFLRIVQC RSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO: 12)。

[0113] 在另一个实施方案中,包含本发明的生长激素的多肽包含一个连接至生长激素的 C-端的CTP和一个连接至生长激素的N-端的CTP (CTP-hGH-CTP) 且具有下述氨基酸序列:

[0114] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAM LRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPV QFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGFSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:13)。

[0115] 在另一个实施方案中,包含生长激素和一个CTP的多肽包含下述氨基酸序列:

[0116] MATGSRTSLLLAFLGLLCLPWLQEGSASSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQFPTIPLSRLFDNAM LRAHRLHQLAFDITYQEFEEAYIPKEQKYSFLQNPQTSLCFSESIPTPSNREETQQKSNLELLRISLLLIQSWLEPV QFLRSVFANSLVYGASDSNVYDLLKDLEEGIQTLGRLEDGSPRTGQIFKQTYSKFDTNSHNDDALLKNYGLLYCF RKDMDKVETFLRIVQCRSVEGSCGF (SEQ ID NO:14)。

[0117] 在另一个实施方案中,编码具有CTP-hGH-CTP的多肽的多核苷酸分子包含下述核 酸序列:

[0118] tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccat ggctgcaggagggcagcgcagctcttcttcttaaggctccacccccatctctgccagccccagcagactgccggg cccagcgcacacccattctgccccagttccccaccatccccctgagcaggtgttcgacaacgccatgctgagg gctcacaggctgcaccagctggcctttgacacctaccaggagtctcgaggaagcctacatccccaaggagcagaagt

acagcttctctgcagaacccccagacctccctgtgtcttcagcgagagcatccccacccccagcaacagagaggagac
ccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgtgtgtgatccagagctggctggagcccgtgcagttc
ctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctgg
aggagggcatccagaccctgatgggcccgtggaggacggcagccccaggaccggccagatcttcaagcagacct
cagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgcctgtgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaag
gacatggacaaggtggagaccttccctgaggatcgtgcagtgacagaagcgtggagggcagctgaggcttcagctcca
gcagcaaggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggtgcctgggcccctccgacacaccaatcctgcctca
gtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID NO:15)。

[0119] 在另一个实施方案中,编码具有CTP-hGH-CTP-CTP的多肽的多核苷酸分子包含下述核酸序列:

[0120] tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccat
ggctgcaggagggcagcgccagctcttcttcttaaggctccacccccatctctgccagccccagcagactgcggg
ccccagcgacacacccattctgccccagttccccaccatccccctgagcaggtgttcgacaacgccatgctgagg
gctcacaggtgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgaggaagcctacatccccaaggagcagaagt
acagcttctctgcagaacccccagacctccctgtgtcttcagcgagagcatccccacccccagcaacagagaggagac
ccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgtgtgtgatccagagctggctggagcccgtgcagttc
ctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagcaacgtgtacgacctgctgaaggacctgg
aggagggcatccagaccctgatgggcccgtggaggacggcagccccaggaccggccagatcttcaagcagacct
cagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgcctgtgaagaactacgggctgctgtactgcttcagaaag
gacatggacaaggtggagaccttccctgaggatcgtgcagtgacagaagcgtggagggcagctgaggcttcagctcca
gcagcaaggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggtgcctgggcccctccgacacaccaatcctgcacac
gagcagctcctctaaggccccctcctccatccctgccatccccctccccggctgcctggccccctctgacacccctatc
ctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID NO:16)。

[0121] 在另一个实施方案中,编码具有CTP-hGH-CTP-CTP的多肽的多核苷酸分子包含下述核酸序列:

[0122] tctagaggacatggccaccggcagcaggaccagcctgctgctggccttcggcctgctgtgcctgccat
ggctgcaggagggcagcgccagctcttcttcttaaggctccacccccagcctgcccttccccaccatccccctgag
caggctgttcgacaacgccatgctgagggtcacaggtgcaccagctggcctttgacacctaccaggagttcgag
gaagcctacatccccaaggagcagaagtacagcttccctgcagaacccccagacctccctgtgtcttcagcgagagca
tccccacccccagcaacagagaggagaccagcagaagagcaacctggagctgctgaggatctccctgtgtgtgat
ccagagctggctggagcccgtgcagttcctgagaagcgtgttcgccaacagcctggtgtacggcgccagcgacagc
aacgtgtacgacctgctgaaggacctggaggagggcatccagaccctgatgggcccgtggaggacggcagcccc
ggaccggccagatcttcaagcagacctacagcaagttcgacaccaacagccacaacgacgacgcctgtgaagaa
ctacgggctgctgtactgcttcagaaaggacatggacaaggtggagaccttccctgaggatcgtgcagtgacagaagc
gtggagggcagctgaggcttcagctccagcagaagggccccctccccgagcctgccctccccaaagcaggtgcctg
ggccccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctcttaaggccccctcctccatccctgccatccccctcccc
gctgcctggccccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctggatgcggccgc (SEQ ID NO:17)。

[0123] 在另一个实施方案中,本发明的生长激素与已知的生长激素序列具有同源性。在另一个实施方案中,本发明的生长激素与本文中公开的生长激素序列具有同源性。在另一

个实施方案中,根据本发明的同源性也包括删除、插入或置换变体,包括其氨基酸置换和它们的生物活性的多肽片段。在一个实施方案中,所述置换变体是这样的变体,其中hGH的位置65处的谷氨酰胺被缬氨酸置换[Gellerfors等人,J Pharm Biomed Anal 1989,7:173-83]。

[0124] 在一个实施方案中,短语“人生长激素”(hGH)表示表现出hGH活性(即,刺激生长)的多肽,诸如在Genbank登记号P01241中阐述的。

[0125] 在一个实施方案中,“人生长激素”(hGH)表示表现出hGH活性(即,刺激生长)的多肽,诸如在Genbank登记号P01241中阐述的。在一个实施方案中,本发明的hGH也表示同系物。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少50%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少60%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少70%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少80%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少90%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心(NCBI)的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的hGH氨基酸序列与在GenBank登记号P01241中阐述的hGH序列具有至少95%同源性。

[0126] 在一个实施方案中,本文提供的目标肽是胃泌酸调节素。在另一个实施方案中,胃泌酸调节素(OXM)包含下述氨基酸(AA)序列:HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA (SEQ ID NO:18)。在另一个实施方案中,OXM由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。在另一个实施方案中,OXM包含在CAS No.62340-29-8中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0127] 在一个实施方案中,术语胃泌酸调节素进一步包括已知的胃泌酸调节素的同系物。在一个实施方案中,所述同系物是功能同系物。在另一个实施方案中,术语“功能”表示本文中提供的同系物、多肽或其片段具有抑制食欲的能力。该术语也表示本文中提供的同系物、多肽或其片段具有延长另一种蛋白或肽的生物半衰期的能力。在另一个实施方案中,本文中提供的蛋白、肽或同系物的生物半衰期(T_{1/2})表示所述蛋白、肽或同系物的量的半数被降解或不存在于受试者的生物介质中所用的时间。在另一个实施方案中,所述生物介质是血清、脑脊液、组织、粘膜层等。

[0128] 在另一个实施方案中,OXM是人OXM或任意哺乳动物OXM。在另一个实施方案中,OXM是也被称作胰高血糖素-37或生物活性的肠高血糖素。在另一个实施方案中,OXM是双多肽或其片段。在另一个实施方案中,OXM是OXM的生物活性片段。在另一个实施方案中,生物活性的OXM从SEQ ID NO:18的氨基酸30延伸至氨基酸37。在另一个实施方案中,生物活性的OXM从SEQ ID NO:18的氨基酸19延伸至氨基酸37。在另一个实施方案中,本发明的OXM对应于从其中删除了2个C-端氨基酸的八肽。在另一个实施方案中,本发明的OXM对应于如本文中所述的、保留OXM活性的SEQ ID NO:18的任意片段。在另一个实施方案中,本发明还包括

同系物,例如,使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数确定的、与胃泌酸调节素具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同源性的多肽。

[0129] 在其它实施方案中,术语经工程改造的胃泌酸调节素表示成束的胃泌酸调节素的氨基酸序列。在其它实施方案中,术语经工程改造的胃泌酸调节素表示包括它的信号序列或信号肽的胃泌酸调节素的氨基酸序列。

[0130] 在另一个实施方案中,本文中提供的多肽或其片段包含信号肽或信号序列。

[0131] 在另一个实施方案中,“信号序列”和“信号肽”在本文中可互换地使用。在另一个实施方案中,“序列”当表示多核苷酸分子时可以表示编码部分。每种可能性代表本发明的一个单独实施方案。

[0132] 在一个实施方案中,本文提供的多肽或目标肽是促红细胞生成素 (EPO)。在另一个实施方案中,术语“促红细胞生成素”表示哺乳动物促红细胞生成素。在一个实施方案中,“促红细胞生成素”表示人促红细胞生成素,诸如在GenBank登记号AAA52400中阐述的。

[0133] 在一个实施方案中,本发明的促红细胞生成素或EPO序列也表示同系物。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少50%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少60%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少70%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少80%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少90%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的促红细胞生成素氨基酸序列与在GenBank登记号AAA52400中所示的促红细胞生成素序列具有至少95%同源性。

[0134] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:19中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个额外CTP氨基酸肽。在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:19中所示的EPO肽:

[0135] MGVECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGAPPRILICDSRVLERYLLEAKEAENITGCAEHCSLNENITV
PDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKE
AISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPSLPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO:19)。

[0136] 在另一个实施方案中,所述EPO肽另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个额外CTP氨基酸肽,其用于治疗贫血。在另一个实施方案中,本发明的方

法提供了在SEQ ID NO:20中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0137] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:20)。

[0138] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:21中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0139] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:21)。

[0140] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:22中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0141] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:22)。

[0142] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:23中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0143] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:23)。

[0144] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:24中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0145] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:24)。

[0146] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:25中所示的EPO肽,其另外具有在N-端上的至少一个CTP氨基酸肽和在C-端上的至少一个CTP氨基酸肽:

[0147] MGVHECPAWLWLLSLLSLPLGLPVLGAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVEVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTFRKLFRVYSNFLRGKCLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:25)。

[0148] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:26中所示的核酸,其编码EPO肽和在N-端上的一个CTP氨基酸肽和在C-端上的两个CTP氨基酸肽:tctagaggtc

atcatggggg tgcacgaatg tcctgcctgg ctgtggcttc tcctgtcccttc tgctgctc cctctgggcc
tcccagtcct gggctcctct tcctcaaagg cccctcccc gagccttcca agtccatccc gactccccggg
gccctcggac accccaatat taccacaagc cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg
tacctcttgg aggccaagga ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga
atatcactgt ccagacaccc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt
agaagtctgg cagggcctgg cctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt ggtcaactct
tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg ccttcgcagc ctcaccactc
tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg
aacaatcact gctgacactt tccgaaact cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag
ctgtacacag gggaggcctg caggacagg gacagatcct cttcctcaaa ggccctccc ccgagccttc
caagtccatc ccgactcccg gggccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct
ctaaggccccctcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc
tcaagtatga aggtcttctg gatccgcggc cgc (SEQ ID NO:26)。在另一个实施方案中,本发
明的方法提供了包含SEQ ID NO:66所示的EPO肽的氨基酸序列,其具有在N-端上的两个CTP氨
基酸肽:MGVHECPAWLWLLSLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSP
SRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAVE
VWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADTF
RKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDR (SEQ ID NO:66)。

[0149] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:67中所示的核酸序列,
其编码EPO肽和在N-端上的两个CTP氨基酸肽:ATGGGCGTGACGAGTGTCTGCTTGGCTGTGGCTGC
TGCTGAGCCTGCTGTCCCTGCCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCAGCAGCAGCTCTAAGGCCCTCCACCCAGCCT
GCCAGCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCGACACCCCCATCTGCCTCAGAGCAGCAGCAGCAAGGCCACCA
CCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGACTGCCAGGCCCTTCCGATACCCAATCCTGCCCCAGGCCCTCCAGACTGA
TCTGCGACAGCCGGGTGCTGGAAAGATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGA
GCACTGCAGCCTGAACGAGAATATCACCGTGCCCCGACACCAAAGTGAAGTCTACGCCTGGAAGCGGATGGAAGTG
GGCCAGCAGCCGTGGAAGTGTGGCAGGACTGGCCCTGCTGAGCGAGGCCGTGCTGAGAGGACAGGCCCTGCTGG
TGAACAGCAGCCAGCCCTGGGAGCCCCTGCAGCTGCATGTGGATAAGGCCGTGTCCGGCCTGCGGAGCCTGACCAC
ACTGCTGAGAGCCCTGGGCGCTCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCCGCTCTGCCGCCCTCTGAGAACC
ATCACCGCCGACACCTTCCGGAAGCTGTTCCGGGTGTACAGCAACTTCTGCGGGGCAAGCTGAAGCTGTACACCG
GCGAGGCCTGCCGACCGGCGATAGATAAGCTTGGCGGCC (SEQ ID NO:67)。

[0150] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:68中所示的EPO肽,其具
有在N-端上的两个CTP氨基酸肽和在C-端上的两个CTP氨基酸肽:

[0151] MGVHECPAWLWLLSLSLPLGLPVLGSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPS
PSRLPGPSDTPILPQAPPRLICDSRVLERYLLEAKEAENITTGCAEHCSLNENITVPDTKVNIFYAWKRMEVGQQAV
EVWQGLALLSEAVLRGQALLVNSSQPWEPLQLHVDKAVSGLRSLTTLRLALGAQKEAISPPDAASAAPLRTITADT
FRKLFRVYSNFLRGKLKLYTGEACRTGDRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPG
PSDTPILPQ (SEQ ID NO:68)。

[0152] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:69中所示的核酸序列,
其编码EPO肽和N-端上的两个CTP氨基酸肽和在C-端上的两个CTP氨基酸肽:

[0153] ATGGGCGTGACGAGTGTCTGCTTGGCTGTGGCTGCTGCTGAGCCTGCTGTCCCTGCCTCTGGGCCTGCCTGTGCTGGGCAGCAGCAGCTCTAAGGCCCTCCACCCAGCCTGCCAGCCCTTCTAGACTGCCTGGCCCCAGCAGACCCCCATCCTGCCTCAGAGCAGCAGCAAGGCCACCACCATCCCTGCCTAGCCCCAGCAGACTGCCAGGCCCTTCGATACCCAATCCTGCCCCAGGCCCTCCCAGACTGATCTGCGACAGCCGGGTGCTGGAAAGATACCTGCTGGAAGCCAAAGAGGCCGAGAACATCACCACCGGCTGCGCCGAGCACTGCAGCCTGAACGAGAATATCACCGTGCCGACACCAAAGTGAACCTTCTACGCCTGGAAGCGGATGGAAGTGGGCCAGCAGGCCGTGGAAGTGTGGCAGGGACTGGCCCTGCTGAGCGAGGCCGTGCTGAGAGGACAGGCCCTGCTGGTGAACAGCAGCCAGCCCTGGGAGCCCCTGCA GCTGCATGTGGATAAGGCCGTGTCCGGCCTGCGGAGCCTGACCACACTGCTGAGAGCCCTGGGCGCTCAGAAAGAGGCCATCTCTCCCCCTGATGCCGCTCTGCCGCCCTCTGAGAACCATCACCGCCGACACCTTCGGAAGCTGTTCCGGGTGTACAGCAACTTCCTGCGGGCAAGCTGAAGCTGTACACCGGCGAGGCCTGCCGACCGGCGATAGAAGCAGCTCCAGCAAGGCTCCACCCCCAGCCTGCCATCCCCAAGTAGACTGCCCGGCCCTCTGACACACCTATCCTGCCA CAGTCCAGCAGCTCCAAAGCTCCCCACCATCCCTCCCATCCCCATCCAGACTGCCTGGACCATCCGACACTCCAA TTCTGCCTCAGTAAGCTTGGCGCGCC (SEQ ID NO:69)。

[0154] 在一个实施方案中，“干扰素”表示I型哺乳动物干扰素多肽。在一个实施方案中，“干扰素”表示II型哺乳动物干扰素多肽。在某些实施方案中，利用本领域普通技术人员已知的其它合适的干扰素多肽。在某些实施方案中，所述干扰素是 α -干扰素。在某些实施方案中，所述干扰素是 β -干扰素。在某些实施方案中，所述干扰素是 γ -干扰素。在某些实施方案中，所述干扰素是 ω -干扰素。在某些实施方案中，所述干扰素是干扰素亚种。在一个实施方案中，所述干扰素亚种 (IFN) 是IFN- α 2a。在一个实施方案中，所述干扰素亚种 (IFN) 是IFN- α 2b。在一个实施方案中，所述干扰素亚种 (IFN) 是IFN- β 1a。在一个实施方案中，所述干扰素 (IFN) 亚种是IFN- β 1b。

[0155] 在一个实施方案中，本发明的干扰素表现出干扰素活性，诸如抗病毒或抗增生活性。在某些实施方案中，在下面表1中列出了干扰素的非限制性例子的GenBank登记号。

[0156] 在一个实施方案中，本发明的干扰素也表示同系物。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少50%同源性。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少60%同源性。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少70%同源性。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少80%同源性。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少90%同源性。在一个实施方案中，如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的，本发明的干扰素氨基酸序列与在表1中列出的干扰素序列具有至少95%同源性。在某些实施方案中，根据本发明的同源性也包括删除、插入或置换变体，包括其氨基酸置换和它们的生物活性的多肽片段。在一个实施方案中，干扰素 β 的位置17中的半胱氨酸被丝氨酸置换。

[0157] 下面的表1列出了干扰素的例子和它们各自的NCBI序列编号

[0158] 表1

[0159]	干扰素名称	NCBI序列编号
	干扰素, α 1	NP_076918.1
	干扰素, α 10	NP_002162.1
	干扰素, α 13	NP_008831.2
	干扰素, α 14	NP_002163.1
	干扰素, α 16	NP_002164.1
	干扰素, α 17	NP_067091.1
	干扰素, α 2	NP_000596.2
	干扰素, α 21	NP_002166.1
	干扰素, α 4	NP_066546.1
	干扰素, α 5	NP_002160.1
	干扰素, α 6	NP_066282.1
	干扰素, α 7	NP_066401.2
	干扰素, α 8	NP_002161.2
	干扰素, β 前体	NP_002167.1
	干扰素, ϵ 1	NP_795372.1
	干扰素, γ	NP_000610.2
	干扰素, ϵ	NP_064509.1
	干扰素, Ω 1	NP_002168.1

[0160] 在另一个实施方案中,在本文中作为肽或作为多肽提供的干扰素 (IFN) 是I型干扰素。在另一个实施方案中,所述干扰素 (IFN) 是IFN- α ,在另一个实施方案中,所述干扰素 (IFN) 是IFN- β 。在另一个实施方案中,所述干扰素 (IFN) 是IFN- γ 。在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽包含在SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:28包含下述氨基酸 (AA) 序列:MTNKLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRN (SEQ ID NO:27, 人干扰素- β 1a)。在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽包含人干扰素 β 1a (hIFN β 1a) 的氨基酸序列。在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽包含在GenBank登记号NP_002167.1中所示的氨基酸序列。

[0161] 在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽由在SEQ ID NO:28中所示的核苷酸序列编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:28包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0162] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc
tgagcatgagctacaacctgctgggcttctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctgtggcagct
gaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcag
ttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagca
gcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaac
cgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtac
tacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc

tgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaactgatgagtcgcgccgc (SEQ ID NO: 28, 人干扰素- β 1a)。在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽由人干扰素 β 1a (hIFN β 1a) 的核苷酸 (NA) 分子编码。在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽由包含GenBank登记号NM_002176所示的核苷酸序列的核苷酸 (NA) 分子编码。

[0163] 在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽包含在SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:29包含下述氨基酸 (AA) 序列:

[0164] TF*LQPFEAFALAAQQVVGDTRVRVNMNTNCLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNFYFINRLTGYLRLN (SEQ ID NO:29)。

[0165] 在另一个实施方案中,如本文中所述的干扰素 (IFN) 肽由在SEQ ID NO:30中所示的核苷酸序列编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:30包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0166] acattctaactgcaacctttcgaagcctttgctctggcacaacaggtagtaggcgacactgttcgtgtgtgtcaacatgaccaacaagtgtctcctccaaattgctctcctgtttgtgcttctccactacagctctttccatgagctacaacttgcttgattcctacaaagaagcagcaattttcagtgtcagaagctcctgtggcaattgaatgggaggcttgaatactgcctcaaggacaggatgaactttgacatccctgaggagattaagcagctgcagcagttccagaaggaggacgccgcattgaccatctatgagatgctccagaacatctttgctattttcagacaagattcatctagcactggctggaatgagactattgttgagaacctcctggctaattgtctatcatcagataaacatctgaagacagtcctggaagaaaactggagaaagaagatttcaccaggggaaaactcatgagcagctctgcacctgaaaagatattatgggaggattctgcattacctgaaggccaaggagtacagtcactgtgcctggaccatagtcagagtggaaatcctaaggaacttttactttcattaacagacttacaggttacctccgaaactga (SEQ ID NO:30)。

[0167] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至C-端的CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至C-端的至少一个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至N-端的CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至N-端的至少一个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至N-端的至少一个CTP单元和/或连接至C-端的至少一个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至N-端的至少一个CTP单元和串联连接至C-端的两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至N-端的至少一个CTP单元和连接至C-端的两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至N-端的一个CTP单元和连接至C-端的至少两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至N-端的一个CTP单元和至少串联连接至C-端的两个CTP单元。

[0168] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和至少三个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和三个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含由包含SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的氨基酸序列编码的干扰素 (IFN) 肽-CTP多肽。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:31包含下述氨基酸 (AA) 序列:

[0169] MTNKLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLK RYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:31)。

[0170] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素 (IFN) 肽-和CTP的多肽由SEQ ID NO:32所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:32包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0171] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc tgagcatgagctacaacctgctgggcttctgcagaggtccagcaacttccagtgcagaagctgctgtggcagct gaacggcaggtggaatactgctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcag ttccagaaggaggacgccgcctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagca gcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaac cgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtac tacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc tgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccctccaccttc cctgcccagtcgaagccgactccctgggcccctccgatacaccaattctgccacagtgatga (SEQ ID NO:32)。

[0172] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至它的羧基端的两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含由包含SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的氨基酸序列编码的干扰素 (IFN) 肽-CTP (x2)。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:33包含下述氨基酸 (AA) 序列:

[0173] MTNKLLQIALLLCFSTTALSMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQINHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLK RYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLRNSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSK APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:33)。

[0174] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素 (IFN) 肽-和连接至它的羧基端的两个CTP单元的多肽由SEQ ID NO:34所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:34包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0175] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc tgagcatgagctacaacctgctgggcttctgcagaggtccagcaacttccagtgcagaagctgctgtggcagct gaacggcaggtggaatactgctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagctgcagcag ttccagaaggaggacgccgcctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggcaggacagca gcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccacctgaaaac cgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctgaagaggtac tacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggtggagatcc tgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccctccaccttc cctgcccagtcgaagccgactccctgggcccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctctaaggccct cctccatccctgccatccccctcccgctgctggcccctctgacacccctatcctgcctcagtgatgaaggtctg gatccgcggccgc (SEQ ID NO:34)。

[0176] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至IFN的氨

基端的单个CTP单元和连接至IFN的羧基端的两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素(IFN)肽、连接至IFN的氨基端的单个CTP单元和串联连接至IFN的羧基端的两个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含(从氨基端至羧基端):CTP(x1)-干扰素(IFN)肽-CTP(x2),其包含在SEQ ID NO:365中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:35包含下述氨基酸(AA)序列:

[0177] MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:35)。

[0178] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素(IFN)肽、连接至IFN的氨基端的单个CTP单元和连接至IFN的羧基端的两个CTP单元的多肽由SEQ ID NO:36所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:36包含下述核苷酸(NA)序列:

[0179] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc
tgagcagcagcagctccaaggccccccccccagcctgcccagccccagcagactgccaggccccagcgacacccc
cactctgccccagatgagctacaacctgctgggcttctctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctg
tggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagc
tgcagcagttccagaaggaggacgccgcctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggca
ggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccac
ctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaagaggagacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctga
agaggtactacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggt
ggagatcctgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccccct
ccaccttccctgcccagctccaagccgactccctgggcccctccgacacaccaatcctgccacagagcagctcctcta
aggccccctcctccatccctgccatccccctcccggctgcctggccccctctgacacccctatcctgcctcagtgatg
aaggtctggatccgcggccgc (SEQ ID NO:36)。

[0180] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素(IFN)肽、连接至IFN的氨基端的单个CTP和位于IFN编码序列内的单个CTP。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含(从氨基端至羧基端):CTP(x1)-干扰素(IFN)肽(片段1)-CTP-干扰素(IFN)肽(片段2),其包含SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:37包含下述氨基酸(AA)序列:

[0181] MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLNIFAIIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRIHLHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNR (SEQ ID NO:37)。

[0182] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素(IFN)肽、连接至IFN的氨基端的单个CTP单元和位于IFN编码序列内的单个CTP单元的多肽由SEQ ID NO:38所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:38包含下述核苷酸(NA)序列:

[0183] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc

tgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcaggctgccaggccccagcgacacccc
catcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcttcgagaggtccagcaacttccagtgccagaaactgctg
tggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggaccgatgaacttcgacatccccgaagagatcaagcagc
tgcagcagttccagaaagaggacgccgcctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggca
ggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccac
ctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctga
agaggtactacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggt
ggagatcctgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccct
ccaccctccctgccctccccaaagcagactgcccggaccctccgacacaccaattctgccacagatgtcctacaatc
tgctcggatttctgcagcgtcctccaactttcagtgtcagaagctcctctggcagctcaatggccgcctggaata
ttgtctgaaagacagaatgaattttgacatcccagaggaaattaaacagctccagcagtttcagaaagaagatgct
gctctcacaatctatgaaatgctccagaatatctttgcaatctttcgccaggacagctcctccaccgggtggaatg
agacaattgtcgagaatctgctcgccaatgtctatcatcagatcaatcacctcaagacagctcctcgaagaaaaact
cgaaaaagaagatttcacacgcggcaactgatgtcctccctgcatctgaagcgctactatgggcgcatcctgcat
tatctgaaagctaaagaatactcccactgtgcttggacaattgtgcgcgtcgagatcctgagaaacttttattttca
ttaaccgcctgacaggatacctgcgcaactgatgaaggctctggatgcggccgc (SEQ ID NO:38)。

[0184] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽和连接至它的氨基端的单个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽-CTP,其包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:39包含下述氨基酸 (AA) 序列:

[0185] MTNCKLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQK
LLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI
NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGylRN* (SEQ
ID NO:39)。

[0186] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素 (IFN) 肽-和连接至它的氨基端的单个CTP的多肽由SEQ ID NO:40所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:40包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0187] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc
tgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgcccagccccagcaggctgccaggccccagcgacacccc
catcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttcttcgagaggtccagcaacttccagtgccagaaactgctg
tggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggaccgatgaacttcgacatccccgaagagatcaagcagc
tgcagcagttccagaaagaggacgccgcctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggca
ggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccac
ctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaagaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctga
agaggtactacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaagagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggt
ggagatcctgcggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaactgatgagtccgcggccgc (SEQ
ID NO:40)。

[0188] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽、连接至它的氨基端的单个CTP单元和连接至它的羧基端的单个CTP单元。在另一个实施方案中,如本文中所

述的多肽包含干扰素 (IFN) 肽-CTP,其包含在SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:41包含下述氨基酸 (AA) 序列:

[0189] MTNKCLLQIALLLCFSTTALSSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQMSYNLLGFLQRSSNFQCQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFAIFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWTIVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRSSSSK APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ* (SEQ ID NO:41)。

[0190] 在另一个实施方案中,如本文中所述的包含干扰素 (IFN) 肽、连接至它的氨基端的单个CTP单元和连接至它的羧基端的单个CTP单元的多肽由SEQ ID NO:42所示的核酸分子编码。在另一个实施方案中,SEQ ID NO:42包含下述核苷酸 (NA) 序列:

[0191] tctagaggacatgaccaacaagtgcctgctgcagatcgccctgctgctgtgcttcagcaccaccgccc tgagcagcagcagctccaaggccccacccccagcctgccagccccagcagactgccaggccccagcgacacccc catcctgccccagatgagctacaacctgctgggcttctctgcagaggtccagcaacttccagtgccagaagctgctg tggcagctgaacggcaggctggaatactgcctgaaggacaggatgaacttcgacatcccagaggaaatcaagcagc tgcagcagttccagaaggaggacgccgccctgaccatctacgagatgctgcagaacatcttcgccatcttcaggca ggacagcagcagcaccggctggaacgagaccatcgtggagaacctgctggccaacgtgtaccaccagatcaaccac ctgaaaaccgtgctggaagagaagctggaaaaggaggacttcaccaggggcaagctgatgagcagcctgcacctga agaggtactacggcagaatcctgcactacctgaaggccaaggagtacagccactgcgcctggaccatcgtgagggt ggagatcctgaggaacttctacttcatcaacaggctgaccggctacctgaggaacagctccagcagcaaggccct ccaccttccctgcccagctccaagccgactccctgggcccctccgatacaccaattctgccacagtgatgaaggtctg gatgcggccgc (SEQ ID NO:42)。

[0192] 在另一个实施方案中,干扰素β肽包含含有下述氨基酸 (AA) 序列的SEQ ID NO:43:

[0193] MSYNLLGFLQRSSNFQSQKLLWQLNGRLEYCLKDRMNFDIPEEIKQLQQFQKEDAALTIYEMLQNIFA IFRQDSSSTGWNETIVENLLANVYHQI NHLKTVLEEKLEKEDFTRGKLMSSLHLKRYYGRILHYLKAKEYSHCAWT IVRVEILRNIFYFINRLTGYLNRN (SEQ ID NO:43)。

[0194] 在一个实施方案中,本文中提供的多肽或其片段是胰高血糖素-样肽-1。在另一个实施方案中,根据本发明的教导利用胰高血糖素-样肽-1。在另一个实施方案中,CTP序列向“胰高血糖素-样肽-1”的氨基端和羧基端的连接导致增加的效能。在另一个实施方案中,CTP向肽的氨基端和羧基端的连接导致延长的体内活性。在另一个实施方案中,CTP向胰高血糖素-样肽-1的氨基端和羧基端的连接导致延长的体内活性。

[0195] 在一个实施方案中,“胰高血糖素-样肽-1” (GLP-1) 表示哺乳动物多肽。在一个实施方案中,“胰高血糖素-样肽-1” (GLP-1) 表示人多肽。在另一个实施方案中,从胰高血糖素前蛋白原 (Genbank ID No.NP002045) 切下GLP-1,所述前蛋白原具有结合GLP-1受体并引发生产生促胰岛素活性的信号转导途径的能力。在一个实施方案中,“促胰岛素活性”表示这样的能力:响应于升高的葡萄糖水平而刺激胰岛素分泌,由此造成细胞的葡萄糖摄取和降低的血糖水平。在某些实施方案中,GLP-1多肽包括、但不限于在美国专利号5,118,666中描述的那些;其通过引用并入本文。

[0196] 在一个实施方案中,本发明的GLP-1也表示GLP-1同系物。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少50%同源性。在一个

实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少60%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少70%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少80%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少90%同源性。在一个实施方案中,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的,本发明的GLP-1氨基酸序列与在Genbank ID No.NP002045中所示的GLP-1序列具有至少95%同源性。

[0197] 在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是载脂蛋白。在另一个实施方案中,本文提供的多肽或其片段是载脂蛋白A1 (APO-A1)。在另一个实施方案中,所述载脂蛋白在N-端和/或C-端上连接至至少一个CTP肽。在另一个实施方案中,所述载脂蛋白是载脂蛋白AI、载脂蛋白AII、载脂蛋白AIV或类似物或其变体。

[0198] 在一个实施方案中,由于它们的与胆固醇和其它脂质形成复合物并辅助这些化合物向肝脏的运输的能力,根据本发明的载脂蛋白构建体可以被广泛地视作HDL类似物。

[0199] 在另一个实施方案中,使用脂质结合测定,可以方便地测量天然载脂蛋白A-I、A-II或A-IV的功能等同物。通过测量在试验生物诸如兔或啮齿类动物诸如小鼠中进行反向胆固醇运输的能力,可以方便地测量CTP修饰的载脂蛋白的在哺乳动物中引起基本上相同的生理学应答的能力。

[0200] 在一个实施方案中,包含CTP修饰的载脂蛋白的多肽能够象天然载脂蛋白一样好或甚至优于天然载脂蛋白而在体内执行反向胆固醇运输,尽管通过添加至少一个CTP造成了修饰。在另一个实施方案中,在体外,CTP修饰的载脂蛋白具有较低体外生物活性,但是它被延长的半衰期的补偿。在另一个实施方案中,与野生型载脂蛋白的血浆半衰期相比,优选地增加CTP修饰的载脂蛋白的血浆半衰期。在一个实施方案中,所述增加的半衰期是由于载脂蛋白构建体的流体动力学尺寸,其可以降低在肾中的过滤速率。

[0201] 在一个实施方案中,APO-A1的氨基酸序列是:

[0202] DEPPQSPWDRVKDKATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSAGKGLNLKLLDNWDSVTSTFSKLREQLG PVTQ EFWDNLEKETEGLRGEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELRYQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLG EEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLQRLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQG LLPV LESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ (SEQ ID NO:44) 或其同系物或变体或片段。在一个实施方案中,本发明的方法提供了包含APO-A1肽的氨基酸序列,所述APO-A1肽具有在C-端上的一个CTP氨基酸肽:

[0203] MKA AVL TLAVL FLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNL KLLDNWDSVTSTFSKLREQLG PVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELRYQKVE PLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLQRLAARLEALKENG GARLA EYHAKA TEHLSTLSEKAKPALEDLRQG LLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:70)。

[0204] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:71中所示的核酸序列,其编码APO-A1肽和在C-端上的一个CTP氨基酸肽:

[0205] ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGGCACTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCTGGCCACCGTGTACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGTTCGAGGGCTCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAAGTGGGACTCCGTGACCTCCACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAATTCTGGGACAACCTGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGGACCTGGAAGAGGTCAAAGCCAAGGTGCAGCCCTACTGGACGACTTCCAGAAGAAATGGCAGGAAGAGATGGAAGTGTACCGGCAGAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCTGCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGCTGCACGAACTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCTGGGCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGAGCCCACGTGGACGCCCTGAGAACCCACCTGGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGAAAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACCACGCTAAGGCTACCGAGCACCTGTCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAAGATCTGCGGCAGGGCCTGCTGCCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCCTTCCTGTCCGCTCTGGAAGAGTACACCAAGAAGCTGAACACCCAGTCCTCCAGCTCCAAGGCCCTCCACCTCCCTGCCTAGCCCTAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACCCCCATCCTGCCCCAGTGATGAGGATCCGCGGCCGCGAGCTC (SEQ ID NO:71)。

[0206] 在一个实施方案中,本发明的方法提供了包含APO-A1肽的氨基酸序列,所述APO-A1肽具有在C-端上的2个CTP氨基酸肽:

[0207] MKA AVL TLAVL FLTG SQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKLLDNWDSVTSTFSKLRQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYRQKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLAARLEALKENG GARLA EYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGLLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:72)。

[0208] 在另一个实施方案中,本发明的方法提供了在SEQ ID NO:73中所示的核酸序列,其编码APO-A1肽和在C-端上的2个CTP氨基酸肽:

[0209] ATGAAGGCCGCCGTGCTGACCCTGGCCGTGCTGTTTCTGACCGGCTCTCAGGCCCGGCACTTCTGGCAGCAGGACGAGCCTCCCCAGTCCCCCTGGGACAGAGTGAAGGACCTGGCCACCGTGTACGTGGACGTGCTGAAGGACTCCGGCAGAGACTACGTGTCCCAGTTCGAGGGCTCTGCCCTGGGCAAGCAGCTGAACCTGAAGCTGCTGGACAAGTGGGACTCCGTGACCTCCACCTTCTCCAAGCTGCGCGAACAGCTGGGACCTGTGACCCAGGAATTCTGGGACAACCTGGAAAAAGAGACAGAGGGCCTGAGACAGGAAATGTCCAAGGACCTGGAAGAGGTCAAAGCCAAGGTGCAGCCCTACTGGACGACTTCCAGAAGAAATGGCAGGAAGAGATGGAAGTGTACCGGCAGAAGGTGGAACCCCTGCGGGCCGAGCTGCAGGAAGGCGCTAGACAGAAGCTGCACGAACTGCAGGAAAAGCTGTCCCCCTGGGCGAGGAAATGCGGGACAGAGCCAGAGCCCACGTGGACGCCCTGAGAACCCACCTGGCCCCCTACTCTGACGAGCTGCGGCAGAGGCTGGCCGCCAGACTGGAAGCCCTGAAAGAGAACGGCGGAGCCCGGCTGGCCGAGTACCACGCTAAGGCTACCGAGCACCTGTCCACCCTGTCCGAGAAGGCCAAGCCCGCCCTGGAAGATCTGCGGCAGGGCCTGCTGCCCCGTGCTGGAATCCTTCAAGGTGTCCTTCCTGTCCGCTCTGGAAGAGTACACCAAGAAGCTGAACACCCAGTCCTCCAGCTCCAAGGCCCTCCACCTCCCTGCCTAGCCCTAGTAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCTGGCCCCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGCTGAGATCCGCGGCCG (SEQ ID NO:73)。

[0210] 在一个实施方案中,通过添加、置换或删除至少一个氨基酸,可以得到载脂蛋白或

其片段的功能等同物。当氨基酸序列包含一个氨基酸对另一个氨基酸的置换时,这样的置换可以是保守的氨基酸置换。SEQ ID NO:44的片段可以包含超过一个这样的置换,例如,2个保守的氨基酸置换,例如3或4个保守的氨基酸置换,诸如5或6个保守的氨基酸置换,例如7或8个保守的氨基酸置换,诸如10-15个保守的氨基酸置换,例如15-25个保守的氨基酸置换,诸如25-75个保守的氨基酸置换,例如75-125个保守的氨基酸置换,诸如125-175个保守的氨基酸置换。置换可以在预定氨基酸的任意一个或多个组内做出。

[0211] 在另一个实施方案中,载脂蛋白的片段含有脂质结合区域。

[0212] 如在本发明中使用的“功能等同”是根据通过参考本文中提供的序列的预定片段的对应功能性而建立的一个优选实施方案。

[0213] 本文中提供的序列的变体的功能等同将被理解为表现出与优选的预定序列逐渐不同的氨基酸序列,如插入、缺失和置换的数目和范围,包括保守置换增加。将该差异测量为优选的预定序列与片段或功能等同物之间的同源性的下降。

[0214] 在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是细胞因子。在另一个实施方案中,所述细胞因子是红细胞生成素细胞因子。在另一个实施方案中,所述细胞因子是干扰素细胞因子。在另一个实施方案中,所述细胞因子是趋化因子。在另一个实施方案中,所述细胞因子是肿瘤坏死因子细胞因子。在另一个实施方案中,本文中使用的细胞因子包含生物活性和临床效力。在另一个实施方案中,本文中使用的细胞因子是治疗性蛋白。

[0215] 载脂蛋白的所有片段或功能等同都被包括在本发明范围内,无论它们表现出与载脂蛋白的优选预定序列的同源性程度如何。其原因是,序列SEQ ID NO:44的一些区域最可能是容易突变的,或能够被完全删除,而对得到的片段的结合活性没有任何显著影响。产生SEQ ID NO:44的功能等同变体的方法描述在美国专利号6,897,039中,其通过引用并入本文。

[0216] 在一个实施方案中,本文提供的目标多肽或其片段是凝血因子。在另一个实施方案中,本发明的凝血因子是蛋白。在另一个实施方案中,本发明的凝血因子是肽。在另一个实施方案中,本发明的凝血因子是多肽。在另一个实施方案中,所述凝血因子是酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是丝氨酸蛋白酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是糖蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是转谷氨酰胺酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是无活性的酶原。在另一个实施方案中,所述凝血因子是本领域技术人员已知的任何凝血因子。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FVIII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FV。在另一个实施方案中,所述凝血因子是因子XIII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是因子X。在另一个实施方案中,所述凝血因子是凝血酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是纤维蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FVIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FVII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FIX。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FX。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FXIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FXII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FXa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FVa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是凝血酶原。在另一个实施方案中,所述凝血因子是凝血酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FV。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FXI。在另一个实施方案中,所述凝血因子是vWF。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FVIIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是删除B的结构域FVIII (FVIII BDD)。在

另一个实施方案中,所述凝血因子是FIXa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是前激肽释放酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是激肽释放酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FXIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是纤维蛋白原。在另一个实施方案中,所述凝血因子是血栓调节蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是FII。

[0217] 在另一个实施方案中,所述凝血因子是糖蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是维生素K依赖性的糖蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是维生素K非依赖性的糖蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组糖蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组糖蛋白FV。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVI。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVIII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FIX。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FX。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FXI。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FXII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FvW。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FII。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FIXa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FXIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组纤维蛋白。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FXa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组凝血酶原。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组凝血酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FVIIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组前激肽释放酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组激肽释放酶。在另一个实施方案中,所述凝血因子是重组FXIIa。在另一个实施方案中,所述凝血因子是任何已知的重组凝血因子。在另一个实施方案中,所述包含信号肽的凝血因子是任何已知的重组凝血因子。在另一个实施方案中,凝血因子包含1-10个连接至C-端的CTP重复且不包含连接至N-端的CTP。在另一个实施方案中,所述包含信号肽的凝血因子是任何已知的重组凝血因子。在另一个实施方案中,凝血因子包含至少一个连接至C-端的CTP且不包含连接至N-端的CTP。在另一个实施方案中,包含1-10个连接至C-端的CTP重复且不包含连接至N-端的CTP的凝血因子是经工程改造的凝血因子。在另一个实施方案中,包含至少一个连接至C-端的CTP且不包含连接至N-端的CTP的凝血因子是经工程改造的凝血因子。在另一个实施方案中,包含1-10个连接至C-端的CTP重复且不包含连接至N-端的CTP的凝血因子是缀合的凝血因子。在另一个实施方案中,包含至少一个连接至C-端的CTP且不包含连接至N-端的CTP的凝血因子是缀合的凝血因子。

[0218] 在另一个实施方案中,所述凝血因子包含与FIX、FVII、因子X、蛋白C和凝血酶原的结构域组构类似或相同的结构域组构。在另一个实施方案中,所述凝血因子被合成为具有N-端前肽的前体。在另一个实施方案中,本文中使用的凝血因子呈无活性的前酶形式。在另一个实施方案中,所述凝血因子是在肝细胞中产生。在另一个实施方案中,所述凝血因子包含 γ 羧化酶的停泊位点,所述 γ 羧化酶将谷氨酸(Glu)转化成 γ 羧基谷氨酸(Gla)。在另一个实施方案中,本文中使用的凝血因子是商购可得的凝血因子。

[0219] 在另一个实施方案中,因子VII的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0220] MVSQALRLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREIFKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHT

GTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMF CAGYS D
GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPR PGVLLRAPFP (SEQ
ID NO:45)。

[0221] 在另一个实施方案中,因子VII的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0222] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCS DHT
GTKRSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWVVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALELMVLNVPRLMTQDCLQQSRKVG DSPNITEYMF CAGYS D
GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFP*
GCGR. (SEQ ID NO:46)。

[0223] 在另一个实施方案中,编码因子VII的核酸序列包含核酸序列:

[0224] CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA

[0225] GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCCTGCACCGGCGCCGGCGCG
CCAACGCGTTCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA
GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCC
TCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCG
AGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTG
CAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTCTGC
ACACCCACAGTTGAATATCCATGTGAAAAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAA
TTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCATGGCAGGTCTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTG
TGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAACTGGAGGAAC
CTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCACGACCTCAGCGAGCACGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCA
TCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCT
CACTGACCATGTGGTGGCCCTCTGCCTGCCCCAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCCTTCGTGCGCTTCTCA
TTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGC
CGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACG
TGGTACCTGACGGGCATCGTCAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCAACCGTGGGCCACTTTGGGGTGTACACCAGGGTCT
CCCAGTACATCGAGTGGCTGAAAAGCTCATGCGCTCAGAGCCACGCCAGGAGTCCTCCTGCGAGCCCCATTTCC
CTGAGGATGCGGCCGC (SEQ ID NO:47)。

[0226] 在另一个实施方案中,编码因子VII-CTP (连接至羧基端)的核酸序列包含下述核
酸序列:

[0227] CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA

[0228] GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCCTGCACCGGCGCCGGCGCG
CCAACGCGTTCTGGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA
GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCC

TCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCG
AGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTG
CAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTCG
ACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAATAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAA
TTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTG
TGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAACTGGAGGAAC
CTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCAGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCA
TCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCT
CACTGACCATGTGGTGGCCCTCTGCCTGCCCCAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCA
TTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGC
CGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACG
TGGTACCTGACCGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGGCACTTCGGCGTGTACACCAGGGTGT
CCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAACTGATGAGAAGCGAGCCCAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCC
CAGCAGCAGCTCCAAGGCCCTCCCCCTAGCCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCAGCGACACCCCCATC
CTGCCCCAGTGAGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO:48)。

[0229] 在另一个实施方案中,因子VII-CTP (连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0230] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHT
GTRKSCRCHEGYSLLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECWPQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVNLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDS PNITEYMF CAGYS
GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ* (SEQ ID NO:49)。

[0231] 在另一个实施方案中,编码因子VII-CTP-CTP (连接至羧基端)的核酸序列包含下述核酸序列:

[0232] CTCGAGGACATGGTCTCCCAGGCCCTCAGGCTCCTCTGCCTTCTGCTTGGGCTTCA

[0233] GGGCTGCCTGGCTGCAGTCTTCGTAACCCAGGAGGAAGCCACGGCGTCTGCACCGGCGCCGGCGCG
CCAACGCGTTCTTGAGGAGCTGCGGCCGGGCTCCCTGGAGAGGGAGTGCAAGGAGGAGCAGTGCTCCTTCGAGGA
GGCCCGGGAGATCTTCAAGGACGCGGAGAGGACGAAGCTGTTCTGGATTTCTTACAGTGATGGGGACCAGTGTGCC
TCAAGTCCATGCCAGAATGGGGGCTCCTGCAAGGACCAGCTCCAGTCTATATCTGCTTCTGCCTCCCTGCCTTCG
AGGGCCGGAAGTGTGAGACGCACAAGGATGACCAGCTGATCTGTGTGAACGAGAACGGCGGCTGTGAGCAGTACTG
CAGTGACCACACGGGCACCAAGCGCTCCTGTGCGTGCCACGAGGGGTACTCTCTGCTGGCAGACGGGGTGTCTTCG
ACACCCACAGTTGAATATCCATGTGGAATAATACCTATTCTAGAAAAAAGAAATGCCAGCAAACCCCAAGGCCGAA
TTGTGGGGGGCAAGGTGTGCCCCAAAGGGGAGTGTCCATGGCAGGTCTGTGTTGTTGGTGAATGGAGCTCAGTTGTG
TGGGGGGACCCTGATCAACACCATCTGGGTGGTCTCCGCGGCCCACTGTTTCGACAAAATCAAGAACTGGAGGAAC
CTGATCGCGGTGCTGGGCGAGCAGACCTCAGCGAGCAGACGGGGATGAGCAGAGCCGGCGGGTGGCGCAGGTCA
TCATCCCCAGCACGTACGTCCCGGGCACCACCAACCACGACATCGCGCTGCTCCGCCTGCACCAGCCCGTGGTCTCT

CACTGACCATGTGGTGCCCTCTGCCTGCCCCGAACGGACGTTCTCTGAGAGGACGCTGGCCTTCGTGCGCTTCTCA
TTGGTCAGCGGCTGGGGCCAGCTGCTGGACCGTGGCGCCACGGCCCTGGAGCTCATGGTCCTCAACGTGCCCCGGC
TGATGACCCAGGACTGCCTGCAGCAGTCACGGAAGGTGGGAGACTCCCCAAATATCACGGAGTACATGTTCTGTGC
CGGCTACTCGGATGGCAGCAAGGACTCCTGCAAGGGGGACAGTGGAGGGCCACATGCCACCCACTACCGGGGCACG
TGGTACCTGACCGGCATCGTGAGCTGGGGCCAGGGCTGCGCCACCGTGGGGCCACTTCGGCGTGTACACCAGGGTGT
CCCAGTACATCGAGTGGCTGCAGAACTGATGAGAAGCGAGCCCAGACCCGGCGTGCTGCTGAGAGCCCCCTTCCC
CAGCAGCAGCTCCAAGGCCCTCCCCCTAGCCTGCCAGCCCTAGCAGACTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATC
CTGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCCTGCCATCCCCCTCCCGGCTGCCAGGCCCTCTGACA
CCCCTATCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO:50)。

[0234] 在另一个实施方案中,因子VII-CTP-CTP (连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0235] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHT
GTRRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVLPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCA GYS
D GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ** (SEQ ID NO:51)。

[0236] 在另一个实施方案中,因子VII-CTP-CTP-CTP (3个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0237] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHT
GTRRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVLPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCA GYS
D GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTP
ILPQ (SEQ ID NO:52)。

[0238] 在另一个实施方案中,因子VII-CTP (X4) (4个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0239] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHT
GTRRSCRCHEGYSLADGVSTPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQVIIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVLPRLMTQDCLQQSRKVGDSNITEYMFCA GYS
D GSKDSCKGDSGGPHATHYRG TWYLTGIVSWGQGCATVGHFVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTP
ILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGSDTPILPQ (SEQ ID NO:53)。

[0240] 在另一个实施方案中,因子VII-CTP (x5) (5个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下

述氨基酸序列：

[0241] MVSQALRLLCLLLGLQGCLAAVFVTQEEAHGVLHRRRRANAFLEELRPGSLERECKEEQCSFEEAREI
FKDAERTKLFWISYSDGDQCASSPCQNGGSKDQLQSYICFCLPAFEGRNCETHKDDQLICVNENGGCEQYCSHT
GTRKSCRCHEGYSLLADGVSCPTVEYPCGKIPILEKRNASKPQGRIVGGKVC PKGECPWQVLLL VNGAQLCGGTL
INTIWWVSAAHCFDKIKNWRNLIAVLGEHDLSEHDGDEQSRRVAQV IIPSTYVPGTTNHDIALRLHQPVVLT DHV
VPLCLPERTFSERTLAFVRFSLVSGWGQLLDRGATALEMLVNLNVPRLMTQDCLQQSRKVGDSNPITEYMFCAGYS
GSKDSCKGDSGGPHATHYRGTWYLTGIVSWGQGCATVGHFGVYTRVSQYIEWLQKLMRSEPRPGVLLRAPFPSSSS
KAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTP
ILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:54)。

[0242] 在另一个实施方案中，编码因子IX的核酸序列包含下述核酸序列：

[0243] GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATTGCCTTTTA
GGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAGA
GGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTTT
TGAAGAAGCACGAGAAGTTTTGAAAACACTGAAAGAACAAGTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCAG
TGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTTG
GATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAAA
TAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAAAAACAGAAAGTCCGTGTAACCA
GCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCTG
ATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCAATCATTTAATGA
CTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGTT
GATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCCCAGTGTGTTGAAACTGGTGTTA
AAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAAT
TATTCCTCACCAACTACAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACCC
TTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGAT
CTGGCTATGTAAGTGCTGGGGAAGAGTCTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTCCAGTACCTTAGAGTTCC
ACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCAT
GAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCATGTTACTGAAGTGAAGGGACAGTTTCTTAA
CTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGT
CAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTTGAACGCGGCCGC (SEQ ID NO:55)。

[0244] 在另一个实施方案中，因子IX的氨基酸序列包含下述氨基酸序列：

[0245] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK
CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQF
CKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPD VDVNSTEAETILDNITQSTQS
FNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGSIVNEKWI VTAHCVETGVKITTVAGEHNIEETEHTEQKRN
V IRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYL
RVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHGGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYG IYTKVS
RYVNWIKEKTKLT* (SEQ ID NO:56)。

[0246] 在另一个实施方案中，编码因子IX-CTP (连接至羧基端) 的核酸序列包含下述核酸序列：

[0247] GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTT AGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAG AGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTT TTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCA GTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTT GGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAA ATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACC AGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCT GATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATG ACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGT TGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCACTGTGTTGAACTGGTGT AAAATTACAGTTGTCGAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGCAA TTATTCCTCACCACAACATAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACC CTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTGACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGA TCTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTTCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTC CACTTGTTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTCACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCA TGAAGGAGGTAGAGATTATGTCAAGGAGATAGTGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAGGGACCAGTTTCTTA ACTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATG TCAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGCCTGCCCTCCCCAAG CAGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCCTGCCACAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ ID NO: 57)。

[0248] 在另一个实施方案中,因子IX-CTP(连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0249] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGSCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQF CKNSADNKVVCSTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQT SKLTRAETVFPD VDYVNSTEAE TILDNITQSTQS FNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVD AFCGGSIVNEKWI VTA AHCVETGVKITV VAGEHNI EETEHTEQKRN V IRIIPHNNYNA AINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPIC IADKEYTNIFLKF GSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYL RVPLVD RATCL RSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVS RYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEQ ID NO:58)。

[0250] 在另一个实施方案中,编码因子IX-CTP-CTP(连接至羧基端)的核酸序列包含下述核酸序列:

[0251] GCGATCGCCATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCAGAATCACCAGGCCTCATCACCATCTGCCTTTT AGGATATCTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATTCTGAATCGGCCAAAG AGGTATAATTCAGGTAAATTGGAAGAGTTTGTTCAGGGAACCTTGAGAGAGAATGTATGGAAGAAAAGTGTAGTT TTGAAGAAGCACGAGAAGTTTTTGA AACACTGAAAGAACA ACTGAATTTTGAAGCAGTATGTTGATGGAGATCA GTGTGAGTCCAATCCATGTTTAAATGGCGGCAGTTGCAAGGATGACATTAATTCCTATGAATGTTGGTGTCCCTTT GGATTTGAAGGAAAGAACTGTGAATTAGATGTAACATGTAACATTAAGAATGGCAGATGCGAGCAGTTTTGTAAAA ATAGTGCTGATAACAAGGTGGTTTGCTCCTGTACTGAGGGATATCGACTTGCAGAAAACCAGAAGTCCTGTGAACC

AGCAGTGCCATTTCCATGTGGAAGAGTTTCTGTTTCACAACTTCTAAGCTCACCCGTGCTGAGACTGTTTTCTCT
GATGTGGACTATGTAAATTCTACTGAAGCTGAAACCATTTTGGATAACATCACTCAAAGCACCCAATCATTTAATG
ACTTCACTCGAGTTGTTGGTGGAGAAGATGCCAAACCAGGTCAATTCCCTTGGCAGGTTGTTTTGAATGGTAAAGT
TGATGCATTCTGTGGAGGCTCTATCGTTAATGAAAAATGGATTGTAAGTCTGCTGCCCCTGTGTTGAAACTGGTGT
AAAATTACAGTTGTCGCAGGTGAACATAATATTGAGGAGACAGAACATACAGAGCAAAAGCGAAATGTGATTGAA
TTATTCCTCACCACAACATAATGCAGCTATTAATAAGTACAACCATGACATTGCCCTTCTGGAAGTGGACGAACC
CTTAGTGCTAAACAGCTACGTTACACCTATTTGCATTGCTACAAGGAATACACGAACATCTTCCTCAAATTTGGAT
CTGGCTATGTAAGTGGCTGGGGAAGAGTCTCCACAAAGGGAGATCAGCTTTAGTTCTTCAGTACCTTAGAGTTCC
ACTTGTGACCGAGCCACATGTCTTCGATCTACAAAGTTTACCATCTATAACAACATGTTCTGTGCTGGCTTCCAT
GAAGGAGGTAGAGATTCATGTCAAGGAGATAGTGGGGGACCCCATGTTACTGAAGTGGAAAGGGACCAGTTTCTTAA
CTGGAATTATTAGCTGGGGTGAAGAGTGTGCAATGAAAGGCAAATATGGAATATATACCAAGGTATCCCGGTATGT
CAACTGGATTAAGGAAAAAACAAGCTCACTAGCTCCAGCAGCAAGGCCCTCCCCGAGCCTGCCCTCCCCAAGC
AGGCTGCCTGGGCCCTCCGACACACCAATCTGCCACAGAGCAGCTCCTCTAAGGCCCTCCTCCATCCTGCCAT
CCCCCTCCCGGCTGCCTGGCCCCCTCTGACACCCCTATCCTGCCTCAGTGATGAAGGTCTGGATCCGCGGCCGC (SEQ
ID NO:59)。

[0252] 在另一个实施方案中,因子IX-CTP-CTP(连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0253] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK
CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTICNIKNGRCEQF
CKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAEITLDNITQSTQS
FNDFTRVVGGEDAKPG QFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHEQKRN
VIRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQY
LRVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKV
SRYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ** (SEQ
ID NO:60)。

[0254] 在另一个实施方案中,因子IX-CTP(x3)(3个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0255] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK
CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTICNIKNGRCEQF
CKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLTRAETVFPDQVDYVNSTEAEITLDNITQSTQS
FNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITV VAGEHNIEETEHEQKRN
IRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRV FHKGRSALVLQYL
RVPLVDRATCLRSTKFTIYNMFCAGFHEGGRDSCQGD SGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGIYTKVS
RYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:61)。

[0256] 在另一个实施方案中,因子IX-CTP(x4)(4个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0257] MQRVNMIMAESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK
CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVTICNIKNGRCEQF

CKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQS
FNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITTVVAGEHNIETEHEQKRN
IRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYL
RVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
RYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ (SEQ ID NO:62)。

[0258] 在另一个实施方案中,因子IX-CTP (x5) (5个连接至羧基端)的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0259] MQRVNMI AESPLITICLLGYLLSAECTVFLDHENANKILNRPKRYNSGKLEEFVQGNLERECMEEK
CSFEEAREVFENTERTEFWKQYVDGDQCESNPCLNGGCKDDINSYECWCPFGFEGKNCELDVT CNIKNGRCEQF
CKNSADNKVVCSCTEGYRLAENQKSCEPAVPFPCGRVSVSQTSLKTRAETVFPDVDYVNSTEAEITLDNITQSTQS
FNDFTRVVGGEDAKPGQFPWQVVLNGKVDAFCGGSIVNEKWIIVTAAHCVETGVKITTVVAGEHNIETEHEQKRN
IRIIPHHNYNAAINKYNHDIALLELDEPLVLNSYVTPICIAADKEYTNIFLKFGSGYVSGWGRVFKGRSALVLQYL
RVPLVDRATCLRSTKFTIYNNMFCAGFHEGGRDSCQGDSSGPHVTEVEGTSFLTGIISWGEECAMKGKYGITYTKVS
RYVNWIKEKTKLTSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAP
PPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ
(SEQ ID NO:63)。

[0260] 在另一个实施方案中,将弗林蛋白酶加给表达本发明的凝血因子-CTP的细胞。在另一个实施方案中,弗林蛋白酶会增加细胞中本发明的凝血因子-CTP的生产效率。在另一个实施方案中,将弗林蛋白酶与包含本发明的凝血因子-CTP的编码序列的载体共转染。在另一个实施方案中,弗林蛋白酶由单独的载体编码。在另一个实施方案中,弗林蛋白酶和凝血因子-CTP由一个载体编码。在另一个实施方案中,将弗林蛋白酶的编码序列插入pCI-DHFR中。在另一个实施方案中,弗林蛋白酶的编码序列被工程改造进pCI-dhfr/smaI+NotI、弗林蛋白酶/AsiI F.I.+NotI中。

[0261] 在另一个实施方案中,编码弗林蛋白酶的核酸序列包含下述核酸序列:

[0262] tctagagtcgacccCGCCATGGAGCTGAGGCCCTGGTTGCTATGGGTGGTAGCAGCAACA

[0263] GGAACCTTGGTCTCTAGCAGCTGATGCTCAGGGCCAGAAGGTCTTCACCAACACGTGGGCTGTGCG
CATCCCTGGAGGCCAGCGGTGGCCAACAGTGTGGCACGGAAGCATGGGTTCTCAACCTGGGCCAGATCTTCGGG
GACTATTACCACTTCTGGCATCGAGGAGTGACGAAGCGGTCCCTGTCGCCTCACCGCCCGCGGCACAGCCGGCTGC
AGAGGGAGCCTCAAGTACAGTGGCTGGAACAGCAGGTGGCAAAGCGACGGAATAACGGGACGTGTACCAGGAGCC
CACAGACCCCAAGTTTCTCAGCAGTGGTACCTGTCTGGTGTCACTCAGCGGGACCTGAATGTGAAGGCGGCCTGG
GCGCAGGGCTACACAGGGCACGGCATTGTGGTCTCCATTCTGGACGATGGCATCGAGAAGAACCACCCGGAATTGG
CAGGCAATTATGATCCTGGGGCCAGTTTTGATGTCAATGACCAGGACCCTGACCCCGAGCCTCGGTACACACAGAT
GAATGACAACAGGCACGGCACACGGTGTGCGGGGGAAGTGGCTGCGGTGGCCAACAACGGTGTCTGTGGTGTAGGT
GTGGCCTACAACGCCCCGATTGGAGGGGTGCGCATGCTGGATGGCGAGGTGACAGATGCAGTGGAGGCACGCTCGC
TGGGCCTGAACCCCAACCACATCCACATCTACAGTGCCAGCTGGGGCCCCGAGGATGACGGCAAGACAGTGGATGG
GCCAGCCCGCCTCGCCGAGGAGGCCTTCTTCCGTGGGGTTAGCCAGGGCCGAGGGGGGCTGGGCTCCATCTTTGTC
TGGGCCTCGGGGAACGGGGGCCGGGAACATGACAGCTGCAACTGCGACGGCTACACCAACAGTATCTACACGCTGT
CCATCAGCAGCGCCACGCAGTTTGGCAACGTGCCGTGGTACAGCGAGGCCTGCTCGTCCACACTGGCCACGACCTA

CAGCAGTGGCAACCAGAATGAGAAGCAGATCGTGACGACTGACTTGCGGCAGAAAGTGCACGGAGTCTCACACGGGC
ACCTCAGCCTCTGCCCCCTTAGCAGCCGGCATCATTGCTCTACCCCTGGAGGCCAATAAGAACCTCACATGGCGGG
ACATGCAACACCTGGTGGTACAGACCTCGAAGCCAGCCACCTCAATGCCAACGACTGGGCCACCAATGGTGTGGG
CCGAAAGTGAGCCACTCATATGGCTACGGGCTTTTGGACGCAGGCGCCATGGTGGCCCTGGCCCAGAATTGGACC
ACAGTGGCCCCCAGCGGAAGTGCATCATCGACATCCTCACCAGCCCCAAAGACATCGGGAAACGGCTCGAGGTGC
GGAAGACCGTGACCGGTGCCTGGGCGAGCCCAACCACATCACTCGGCTGGAGCACGCTCAGGCGCGGCTCACCT
GTCCTATAATCGCCGTGGCGACCTGGCCATCCACCTGGTCAGCCCCATGGGCACCCGCTCCACCCTGCTGGCAGCC
AGGCCACATGACTACTCCGCAGATGGGTTTAATGACTGGGCCTTCATGACAACTCATTCTGGGATGAGGATCCCT
CTGGCGAGTGGGTCTAGAGATTGAAAACACCAGCGAAGCCAACAACCTATGGGACGCTGACCAAGTTCACCCTCGT
ACTCTATGGCACCGCCCCCTGAGGGGCTGCCCCGTACCTCCAGAAAGCAGTGGCTGCAAGACCCTCACGTCCAGTCAG
GCCTGTGTGGTGTGCGAGGAAGGCTTCTCCCTGCACCAGAAGAGCTGTGTCCAGCACTGCCCTCCAGGCTTCGCCC
CCCAAGTCTCGATACGCACTATAGCACCGAGAATGACGTGGAGACCATCCGGGCCAGCGTCTGCGCCCCCTGCCA
CGCCTCATGTGCCACATGCCAGGGGCCGGCCCTGACAGACTGCCTCAGCTGCCCCAGCCACGCCTCCTTGACCCT
GTGGAGCAGACTTGCTCCCGCAAAGCCAGAGCAGCCGAGAGTCCCCGCCACAGCAGCAGCCACCTCGGCTGCCCC
CGGAGGTGGAGGCGGGGCAACGGCTGCGGGCAGGGCTGCTGCCCTCACACCTGCCTGAGGTGGTGGCCGGCCTCAG
CTGCGCCTTCATCGTGTCTTTCGTCACCTGTCTTCTGGTCTGCAGCTGCGCTCTGGCTTTAGTTTTCGGGGG
GTGAAGGTGTACACCATGGACCGTGGCCTCATCTCTACAAGGGGCTGCCCCCTGAAGCCTGGCAGGAGGAGTGCC
CGTCTGACTCAGAAGAGGACGAGGGCCGGGGCGAGAGGACCGCCTTTATCAAAGACCAGAGCGCCCTCTGAACGCG
GCCGC (SEQ ID NO:64)。

[0264] 在另一个实施方案中,弗林蛋白酶的氨基酸序列包含下述氨基酸序列:

[0265] MELRPWLLWVVAATGTLVLLAADAQGQKVFNTWAVRIPGGPAVANSVARKHGFLNLGQIFGDYYHFW
HRGVTKRSLSPHRPRHSRLQREPQVQWLEQQVAKRRTRKRDVYQEPTDPKFPQQWYLSGVTQRDLNVKAAWAQGYTG
HGIVVSILDDGIEKNHPDLAGNYDPGASFDVNDQDPDPQPRYTQMNDRHGTRCAGEVAAVANNGVCGVGVAYNAR
IGGVRMLDGEVTDAREARSLGLNPNHIHIYSASWGPEDDGKTVDGPALAEAEFFRGVSQGRGGLGSIFVWASNG
GREHDSNCNDGYTNSIYTLSSISATQFGNVPWYSEACSSTLATTYSSGNQNEKQIVTTDLRQKCTESHTGTSASAP
LAAGIIALTLEANKNLTWDRMQHLVVQTSKPAHLNANDWATNGVGRKVSYSYGYLLDAGAMVALAQNWTTPVAPQR
KCIIDILTEPKDIGKRLEVRKTVTACLGEPNHITRLEHAQARLTLSYNRRGLAIHLVSPMGTRSTLLAARPHDYS
ADGFNDWAFMTTHSWDEDPSEGEVLEIENTSEANNYGLTKFTLVLYGTAPGLPVPPESSGKTLTSSQACVCE
EGFSLHQKSCVQHCPPGFAPQVLDTHYSTENDVETIRASVCAPCHASCATCQGPALTDCLSCPSHASLDPVEQTCS
RQSQSSRESPPQQQPPRLPPEVEAGQRLRAGLLPSHLPEVVAGLSCAFIVLVFVTVFLVLQLRSGFSFRGVKVTM
DRGLISYKGLPPEAWQEECPDSEDEGRGERTAFIKDQSAL* (SEQ ID NO:65)。

[0266] 在某些实施方案中,术语凝血因子进一步包括具有凝固活性的已知凝血因子的同系物。在某些实施方案中,根据本发明的同源性也包括删除、插入或置换变体,包括其氨基酸置换和它们的生物活性的多肽片段。

[0267] 在另一个实施方案中,本发明包括具有凝固活性的凝血因子的同系物。在另一个实施方案中,本发明包括具有凝固活性的、如本文中所述的凝血因子的同系物。在另一个实施方案中,同系物,例如,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的、与凝血因子具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%或更多而言99%

同源性的多肽。

[0268] 在另一个实施方案中,本发明包括弗林蛋白酶的同系物。在另一个实施方案中,同系物,例如,如使用国家生物技术信息中心 (NCBI) 的BlastP软件使用默认参数所确定的、与弗林蛋白酶具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少87%、至少89%、至少91%、至少93%、至少95%或更多而言99%同源性的多肽。

[0269] 在一个实施方案中,本文中提供的多肽或其片段的同系物也表示其缺失、插入或置换变体,包括氨基酸置换,和它们的生物活性的多肽片段。

[0270] 在另一个实施方案中,将3个绒毛膜促性腺激素羧基端肽连接至本文中提供的肽或多肽的C-端。在另一个实施方案中,将4个绒毛膜促性腺激素羧基端肽连接至本文中提供的肽或多肽的C-端。在另一个实施方案中,将5个绒毛膜促性腺激素羧基端肽连接至本文中提供的肽或多肽的C-端。在另一个实施方案中,将1-10个CTP连接至本文中提供的肽或多肽的氨基端或C-端。在另一个实施方案中,将1-10个CTP连接至本文中提供的多肽或其片段的N-端。在另一个实施方案中,将1-10个CTP连接至本文中提供的多肽或其片段的C-端。

[0271] 应当理解,包含如本文中所述的要素或步骤的本发明的组合物和方法在另一个实施方案中可以由那些要素或步骤组成,或在另一个实施方案中基本上由那些要素或步骤组成。在另一个实施方案中,如制药工业中已知的,术语“包含”表示包括指定的活性剂,诸如CTP修饰的多肽或其片段,以及包括其它活性剂和药学上或生理上可接受的载体、赋形剂、软化剂、稳定剂等。在另一个实施方案中,术语“基本上由……组成”表示这样的组合物:其唯一活性成分是指定的活性成分,但是,可以包括用于使制剂稳定、防腐等、却不直接涉入指定的活性成分的治疗效果的其它化合物。在另一个实施方案中,术语“基本上由……组成”可以表示促进活性成分的释放的组分。在另一个实施方案中,术语“由……组成”表示含有活性成分和药学上可接受的载体或赋形剂的组合物。

[0272] 在一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至至少一个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端或C-端。

[0273] 在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至1-3个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至1-5个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至1-10个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至2-3个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至2-5个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至2-10个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至3-5个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至3-8个促性腺激素羧基端肽 (CTP) 的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/

或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至3-10个促性腺激素羧基端肽(CTP)的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至6-10个促性腺激素羧基端肽(CTP)的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至1个促性腺激素羧基端肽(CTP)的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,本文中提供的方法包括连接至2、3、4、5、6、7、8、9或10个促性腺激素羧基端肽(CTP)的多肽或其片段,所述CTP连接在所述多肽或其片段的N-端和/或C-端。在另一个实施方案中,所述CTP肽串联地连接在所述多肽或其片段的任一侧(N-端或C-端)上。

[0274] 在一个实施方案中,本文提供了包含本文中提供的多核苷酸的表达载体。在另一个实施方案中,本文提供了包含所述表达载体的细胞。在另一个实施方案中,本文提供了包含所述表达载体的组合物。

[0275] 在另一个实施方案中,本发明提供了包含如本文中所述的细胞的组合物。在另一个实施方案中,所述细胞是真核细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是原核细胞。

[0276] 在一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会提供增强的针对多肽或其片段的降解的保护。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会提供增强的针对清除的保护。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会提供延长的清除时间。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会增强它的 C_{max} 。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会增强它的 T_{max} 。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会延长它的 $T_{1/2}$ 。在另一个实施方案中,在多肽或其片段的C-端末端处的CTP序列会延长它的AUC。

[0277] 在另一个实施方案中,以与未修饰的多肽或其片段相同的方式使用本发明的缀合的多肽或其片段。在另一个实施方案中,以与未修饰的多肽或其片段相同的方式使用本发明的多肽或其片段。在另一个实施方案中,本发明的多肽或其片段具有增加的循环半衰期和血浆停留时间、降低的清除率和增加的体内临床活性。在另一个实施方案中,由于本文中提供的多肽或其片段的提高的性能,以比多肽或其片段更低地频率施用该缀合物。

[0278] 在另一个实施方案中,降低的施用频率会导致改善的治疗策略,其在一个实施方案中导致改善的患者顺应性,从而导致改善的治疗结果以及改善的患者生活质量。在另一个实施方案中,与常规缀合物相比,具有本文中另外提供的流体动力学体积的、本文中提供的缀合物具有改善的体内效能、改善的稳定性、升高的AUC水平和增强的循环半衰期。

[0279] 在另一个实施方案中,本发明进一步提供了一种包含CTP修饰的多肽的药物组合物,所述多肽包含连接至多肽或其片段的N-端的一个糖基化的促性腺激素羧基端肽(CTP)和连接至多肽或其片段的C-端的两个糖基化的CTP。

[0280] 在另一个实施方案中,应当理解,糖基化的CTP和未糖基化的CTP的组合可以用于修饰本文中另外提供的目标多肽或其片段。这样的组合可以包括,例如,连接至多肽或其片段的N-端的至少一个未糖基化的CTP和连接至多肽或其片段的C-端的至少一个糖基化的CTP,反之亦然。此外,且在另一个实施方案中,也预见到连接至相同端(N-端或C-端)的至少一个糖基化的CTP和至少一个未糖基化的CTP的组合。这些组合还可以包括糖基化的和/或未糖基化的CTP的截短体。这样的组合可以由本文中提供的发明指导的技术人员确定,从而

达到目标多肽或其片段的最佳流体动力学体积或流体动力学尺寸。结果,具有最佳流体动力学体积的目标多肽或其片段可以具有最佳期望的特征,即,改善的效能、改善的稳定性、升高的AUC水平、增强的生物利用度和增强的循环半衰期。

[0281] 在一个实施方案中,本文提供了一种药物组合物,其包含治疗有效量的本文中提供的CTP修饰的目标多肽或其片段。在另一个实施方案中,根据诸如以下因素确定CTP修饰的多肽或其片段的治疗有效量:要治疗的特定病症、要治疗的患者的状况、以及组合物中的其它成分。在另一个实施方案中,通过添加或除去糖基化的和/或未糖基化的CTP肽以便达到最佳流体动力学体积,最佳地调节CTP修饰的多肽或其片段的治疗效果。应当理解,在这样做时,技术人员可以达到具有最佳治疗效果的CTP修饰的多肽或其片段。

[0282] 在一个实施方案中,本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段具有治疗用途。在另一个实施方案中,本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段具有预防用途。

[0283] 在一个实施方案中,当关于本文提供的方法使用时,术语“减少、减小、降低等”表示从先前测量的或确定的水平或从正常水平下降100%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低89-99%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低79-88%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低69-78%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低59-68%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低49-58%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低39-48%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低29-38%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低19-28%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低9-18%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低5-8%。在另一个实施方案中,所述降低是从先前确定的水平降低1-4%。

[0284] 在一个实施方案中,适合与本发明一起使用的组织特异性启动子包括在一个或多个特定细胞群体中起作用的序列,例子包括、但不限于:启动子诸如肝特异性的白蛋白的启动子[Pinkert等人, (1987) *Genes Dev.* 1:268-277],淋巴样特异性的启动子[Calame等人, (1988) *Adv. Immunol.* 43:235-275];尤其是T-细胞受体[Winoto等人, (1989) *EMBO J.* 8:729-733]和免疫球蛋白的启动子;[Banerji等人 (1983) *Cell* 33:729-740],神经元特异性的启动子诸如神经丝启动子[Byrne等人 (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:5473-5477],胰腺特异性的启动子[Edlunch等人 (1985) *Science* 230:912-916]或乳腺特异性的启动子诸如乳清启动子(美国专利号4,873,316和欧洲申请公开号264,166)。适合与本发明一起使用的诱导型启动子包括、例如四环素诱导型启动子(Srour, M.A., 等人, 2003. *Thromb. Haemost.* 90: 398-405)。

[0285] 在一个实施方案中,短语“多核苷酸分子”表示单链或双链核酸序列,其是分离的并且以RNA序列、互补多核苷酸序列(cDNA)、基因组多核苷酸序列和/或组合的多核苷酸序列(例如上述形式的组合)的形式提供。

[0286] 在一个实施方案中,“互补多核苷酸序列”表示这样的序列:其源自使用逆转录酶或任意其它RNA依赖性的DNA聚合酶对信使RNA的逆转录。在一个实施方案中,随后可以在体内或在体外使用DNA聚合酶扩增所述序列。

[0287] 在一个实施方案中,“基因组多核苷酸序列”表示这样的序列:其衍生自染色体且因此它代表染色体的一个连续部分。

[0288] 在一个实施方案中,“组合的多核苷酸序列”表示这样的序列:其为至少部分互补的和至少部分基因组的。在一个实施方案中,组合的序列可以包括编码本发明的多肽所需的一些外显子序列,以及插入二者之间的一些内含子序列。在一个实施方案中,所述内含子序列可以具有任何来源,包括其它基因,且通常包括保守剪接的信号序列。在一个实施方案中,内含子序列包括顺式起作用的表达调节元件。

[0289] 在一个实施方案中,使用PCR技术或本领域技术人员已知的任何其它方法或规程来制备本发明的多核苷酸。在另一个实施方案中,所述规程包括连接两个不同的DNA序列(参见,例如,“Current Protocols in Molecular Biology”,eds.Ausubel等人,John Wiley&Sons,1992)。

[0290] 在一个实施方案中,将编码本文提供的经工程改造的目标多肽或其片段的、本发明的多核苷酸插入表达载体(即,核酸构建体)中,以实现重组肽/多肽的表达。在一个实施方案中,本发明的表达载体包括额外序列,所述额外序列使得该载体适合于在原核生物中复制和整合。在一个实施方案中,本发明的表达载体包括额外序列,所述额外序列使得该载体适合于在真核生物中复制和整合。在另一个实施方案中,本发明的表达载体包括穿梭载体,所述穿梭载体使得该载体适合于在原核生物和真核生物二者中复制和整合。在另一个实施方案中,克隆载体包含转录和翻译起始序列(例如,启动子、增强子)以及转录和翻译终止子(例如,聚腺苷酰化信号)。

[0291] 在一个实施方案中,多种原核或真核细胞可以用作宿主表达系统来表达本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段。在另一个实施方案中,这些包括、但不限于:微生物,诸如用含有多肽编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌;用含有多肽编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用含有多肽编码序列的重组质粒表达载体(诸如Ti质粒)转化的植物细胞系统。

[0292] 在一个实施方案中,使用非细菌表达系统(例如,哺乳动物表达系统诸如CHO细胞)来表达本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,用于在哺乳动物细胞中表达本发明的多核苷酸的表达载体是pCI-dhfr载体。根据一个实施方案,将pCI-dhfr载体的构建描述在下面的实施例的材料和方法中。

[0293] 在一个实施方案中,在本发明的细菌系统中,根据表达的多肽的预期用途,可以有利地选择许多表达载体。在一个实施方案中,需要大量的多肽。在一个实施方案中,指导蛋白产物的高水平表达的载体,可能是作为与疏水信号序列的融合体,所述疏水信号序列指导表达产物进入细菌周质或培养基中,在这些地方的蛋白产物易于被纯化是期望的。在一个实施方案中,用特异性切割位点工程改造的某些融合蛋白以辅助多肽的回收。在一个实施方案中,适合于这种操作的载体包括、但不限于pET系列的大肠杆菌表达载体[Studier等人,Methods in Enzymol.185:60-89(1990)]。

[0294] 在一个实施方案中,使用酵母表达系统。在一个实施方案中,许多含有组成型或诱导型启动子的载体可以用于酵母中,如在美国专利申请号:5,932,447中公开的,其通过引用整体并入本文。在另一个实施方案中,使用促进外源DNA序列整合进酵母染色体中的载体。

[0295] 在一个实施方案中,本发明的表达载体可以进一步包括额外多核苷酸序列,其允

许例如从单一mRNA翻译几种蛋白,诸如内核糖体进入位点(IRES)和用于启动子嵌合多肽的基因组整合的序列。

[0296] 在一个实施方案中,哺乳动物表达载体包括、但不限于:pcDNA3、pcDNA3.1(±)、pGL3、pZeoSV2(±)、pSecTag2、pDisplay、pEF/myc/cyto、pCMV/myc/cyto、pCR3.1、pSinRep5、DH26S、DHBB、pNMT1、pNMT41、pNMT81,它们可得自Invitrogen;pCI,其可得自Promega;pMbac、pPbac、pBK-RSV和pBK-CMV,它们可得自Stratagene;pTRES,其可得自Clontech,和它们的衍生物。

[0297] 在一个实施方案中,在本发明中使用含有来自真核病毒(诸如逆转录病毒)的调节元件的表达载体。SV40载体包括pSVT7和pMT2。在另一个实施方案中,衍生自牛乳头状瘤病毒载体包括pBV-1MTHA,衍生自Epstein Bar病毒载体包括pHEB0和p205。其它示例性的载体包括pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE和允许蛋白在启动子指导下表达的任何其它载体,所述启动子是SV-40早期启动子、SV-40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或经证实真核细胞中有效表达的其它启动子。

[0298] 在一个实施方案中,重组病毒载体可用于在体内表达本发明的肽/多肽,因为它们会提供优点诸如横向感染和靶向特异性。在一个实施方案中,横向感染是例如逆转录病毒的生命周期中固有的,是单个受感染细胞产生许多后代病毒颗粒及其出芽和感染相邻细胞的过程。在一个实施方案中,结果是,大面积被迅速感染,其中大部分最初未被原始病毒颗粒感染。在一个实施方案中,产生不能横向传播的病毒载体。在一个实施方案中,如果希望的目的将指定基因仅导入局限数目的靶细胞中,该特性可以是有用的。

[0299] 在一个实施方案中,可以使用不同方法将本发明的表达载体导入细胞中。这样的方法通常描述在:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Springs Harbor Laboratory,New York(1989,1992),Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,Md.(1989),Chang等人,Somatic Gene Therapy,CRC Press,Ann Arbor,Mich.(1995),Vega等人,Gene Targeting,CRC Press,Ann Arbor Mich.(1995),Vectors:A Survey of Molecular Cloning Vectors and Their Uses,Butterworths,Boston Mass.(1988)和Gilboa等人[Biotechniques 4(6):504-512,1986],且包括、例如,稳定的或瞬时的转染、脂转染、电穿孔和用重组病毒载体感染。另外,关于正-负选择方法,参见美国专利号5,464,764和5,487,992,通过引用并入本文。

[0300] 在一个实施方案中,通过病毒感染导入核酸会提供胜过其它方法(诸如脂转染和电穿孔)的几个优点,因为由于病毒的感染性质可以获得更高的转染效率。

[0301] 应当理解,本文中提供的经工程改造的多肽或其片段还可以从核酸构建体表达,所述核酸构建体采用任意合适的施用模式(例如,皮下施用、口服施用、鼻内施用、静脉内(intra-venal)施用或体内基因治疗)施用给个体。在一个实施方案中,通过适当的基因递送媒介物/方法(转染、转导、同源重组等)和必要的表达系统将所述核酸构建体导入合适的细胞中,然后将修饰的细胞培养扩增并返回所述个体(即,离体基因治疗)。

[0302] 在一个实施方案中,使用植物表达载体。在一个实施方案中,多肽编码序列的表达由许多启动子驱动。在另一个实施方案中,使用病毒启动子诸如CaMV的35S RNA和19S RNA

启动子[Brisson等人,Nature 310:511-514(1984)],或TMV的外壳蛋白启动子[Takamatsu等人,EMBO J.6:307-311(1987)]。在另一个实施方案中,使用植物启动子,例如,RUBISCO的小亚基[Coruzzi等人,EMBO J.3:1671-1680(1984);和Brogli等人,Science 224:838-843(1984)]或热激启动子,例如,大豆hsp17.5-E或hsp17.3-B[Gurley等人,Mol.Cell.Biol.6:559-565(1986)]。在一个实施方案中,使用Ti质粒、Ri质粒、植物病毒载体、直接DNA转化、显微注射、电穿孔和技术人员众所周知的其它技术,将构建体导入植物细胞中。参见,例如,Weissbach&Weissbach[Methods for Plant Molecular Biology,Academic Press,NY,Section VIII,第421-463页(1988)]。本发明还可以使用本领域众所周知的其它表达系统诸如昆虫和哺乳动物宿主细胞系统。

[0303] 应当理解,除了含有插入的编码序列(其编码多肽)的转录和翻译所必需的元件之外,本发明的表达构建体还可以包括经工程改造以优化表达的多肽的稳定性、产生、纯化、产量或活性的序列。

[0304] 在一个实施方案中,将转化的细胞在有效条件下培养,所述条件允许重组的经工程改造的胃泌酸调节素肽以较高量表达。在另一个实施方案中,有效培养条件包括、但不限于允许蛋白产生的有效的培养基、生物反应器、温度、pH和氧条件。在一个实施方案中,有效培养基表示在其中培养细胞以产生本发明的重组多肽的任何培养基。在另一个实施方案中,培养基通常包括水溶液,其具有可同化的碳、氮和磷酸盐来源,和合适的盐、矿物质、金属和其它营养物诸如维生素。可以将本发明的细胞在常规发酵生物反应器、摇瓶、试管、微滴定平板和培养皿中培养。在另一个实施方案中,在适合重组细胞的温度、pH和氧含量条件下进行培养。在另一个实施方案中,培养条件的确定属于本领域普通技术人员的专业技术。

[0305] 在一个实施方案中,根据用于生产的载体和宿主系统,得到的多肽或其片段,或在另一个实施方案中,在发生CTP的糖基化的重组细胞内表达的、得到的本文提供的CTP修饰的多肽或其片段,被分泌进发酵培养基中,或保留在哺乳动物细胞的外表面上。

[0306] 在一个实施方案中,在预定的培养时间之后,实现重组多肽或其片段的回收。

[0307] 在一个实施方案中,短语“回收重组的经工程改造的多肽或其片段”表示收集含有多肽或其片段的全部发酵培养基,且不一定暗示额外的分离或纯化步骤。在另一个实施方案中,进行本领域众所周知的额外的分离或纯化步骤,以便回收重组的经工程改造的多肽或其片段。

[0308] 在一个实施方案中,使用多种标准的蛋白纯化技术来纯化本文提供的经工程改造的多肽或其片段或其变体,所述技术是例如,但不限于,亲和色谱法、离子交换色谱法、过滤、电泳、疏水相互作用色谱法、凝胶过滤色谱法、反相色谱法、伴刀豆球蛋白A色谱法、色谱聚焦和差别增溶。

[0309] 为了促进回收,可以将表达的编码序列工程改造成编码本文中提供的多肽或其片段和融合的可切割的部分。此外,可以设计融合蛋白,使得所述多肽可以通过亲和色谱法容易地分离;例如,通过固定化在对可切割的部分特异性的柱上。将切割位点工程改造在经工程改造的多肽或其片段和可切割的部分之间,并且通过用在此位点特异性地切割融合蛋白的合适酶或试剂处理,可以从色谱柱释放多肽[例如,参见Booth等人,Immunol.Lett.19:65-70(1988);和Gardella等人,J.Biol.Chem.265:15854-15859(1990)]。

[0310] 在一个实施方案中,以“基本上纯的”形式回收本文提供的经工程改造的肽或多

肽。

[0311] 在一个实施方案中,短语“基本上纯的”表示允许蛋白在本文描述的应用中有效使用的纯度。

[0312] 也可以使用体外表达系统合成本文中提供的经工程改造的多肽或其片段。在另一个实施方案中,体外合成方法是本领域众所周知的,所述系统的组分是商购可得的。

[0313] 在一个实施方案中,合成和纯化重组的经工程改造的多肽或其片段;可以在体内或在体外测定它们的治疗效果。使用本领域技术人员已知的各种测定法,可以确定本发明的重组的经工程改造的多肽或其片段的结合活性。

[0314] 在另一个实施方案中,可以将本发明的多肽或其片段提供给个体本身。在一个实施方案中,可以将本文提供的经工程改造的多肽或其片段作为药物组合物的一部分提供给个体,所述多肽或其片段在所述药物组合物中与药学上可接受的载体混合。

[0315] 在另一个实施方案中,“药物组合物”表示一种或多种本文描述的活性成分与其它化学组分(诸如生理学上合适的载体和赋形剂)的制品。药物组合物的目的是便于将化合物施用给生物体。

[0316] 在另一个实施方案中,“活性成分”表示引起生物学效应的目标多肽序列。

[0317] 在另一个实施方案中,在本文中可互换地使用的短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”表示对生物体不引起显著刺激且不废除所施用的化合物的生物活性和性能的载体或稀释剂。佐剂被包含在这些短语下。在一个实施方案中,在药学上可接受的载体中包含的成分之一可以是例如聚乙二醇(PEG),即在有机和水性介质中均具有宽溶解度范围的生物相容的聚合物(Mutter等人(1979))。

[0318] 在另一个实施方案中,术语“赋形剂”表示加入药物组合物中以进一步促进活性成分施用的惰性物质。在一个实施方案中,赋形剂包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0319] 药物的配制和施用技术参见“Remington's Pharmaceutical Sciences”,Mack Publishing Co.,Easton,PA,最新版,其通过引用并入本文。

[0320] 本发明预见到剂量范围的各个实施方案。在一个实施方案中,本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量是在0.005-100mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.005-5mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.01-50mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-20mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-10mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.01-5mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.001-0.01mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.001-0.1mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-5mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.5-50mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.2-15mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.8-65mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在1-50mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在5-10mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在8-15mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在10-20mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在20-40mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在60-120mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在12-40mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是

在40-60mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在50-100mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在1-60mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在15-25mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在5-10mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在55-65mg/天的范围内。

[0321] 在另一个实施方案中,所述剂量是在50-500mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在50-150mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在100-200mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在150-250mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在200-300mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在250-400mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在300-500mg/天的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在350-500mg/天的范围内。

[0322] 在一个实施方案中,所述剂量是20mg/天。在一个实施方案中,所述剂量是30mg/天。在一个实施方案中,所述剂量是40mg/天。在一个实施方案中,所述剂量是50mg/天。在一个实施方案中,所述剂量是0.01mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是0.1mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是1mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是0.530mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是0.05mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是50mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是10mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是20-70mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是5mg/天。

[0323] 在一个实施方案中,CTP修饰的多肽或其片段的剂量是1-5mg/天。在一个实施方案中,CTP修饰的多肽或其片段的剂量是1-3mg/天。在另一个实施方案中,CTP修饰的多肽或其片段的剂量是2mg/天。

[0324] 在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/2天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/3天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/4天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/5天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/6天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/周。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/9天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/11天。在另一个实施方案中,所述剂量是1-90mg/14天。

[0325] 在另一个实施方案中,所述CTP修饰的多肽或其片段剂量是10-50mg/天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/2天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/3天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/4天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/5天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/6天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/周。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/9天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/11天。在另一个实施方案中,所述剂量是10-50mg/14天。

[0326] 在另一个实施方案中,所述剂量可以给出为mg/kg或单位/kg。在另一个实施方案中,本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量,在一个实施方案中,是在0.005-100mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.005-5mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.01-50mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-20mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-10mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.01-5mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.001-0.01mg/kg或单位/kg的范围

内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.001-0.1mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.1-5mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.5-50mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.2-15mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在0.8-65mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在1-50mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在5-10mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在8-15mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在10-20mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在20-40mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在60-120mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在12-40mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在40-60mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在50-100mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在1-60mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在15-25mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在5-10mg/kg或单位/kg的范围内。在另一个实施方案中,所述剂量是在55-65mg/kg或单位/kg的范围内。

[0327] 在另一个实施方案中,将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽配制成鼻内剂型。在另一个实施方案中,将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽配制成可注射剂型。在另一个实施方案中,以在0.0001mg至0.6mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在0.001mg至0.005mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在0.005mg至0.01mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在0.01mg至0.3mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在0.2mg至0.6mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,本文提供的多肽或其片段是在它的氨基端上不具有CTP。

[0328] 在另一个实施方案中,以在0.2mg至2mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在2mg至6mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在4mg至10mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在5mg至15mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。

[0329] 在另一个实施方案中,以在0.2mg至2mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在2mg至6mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在4mg至10mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,以在5mg至15mg范围内的剂量将包含本文提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。

[0330] 在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的65%。在另一个实施方案中,本文提供

的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的55%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的45%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的10%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的25%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的35%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的多肽或其片段所施用的激动剂的量的75%。在另一个实施方案中,本文提供的CTP修饰的多肽或其片段的剂量使得,它含有使用未CTP修饰的激动剂所施用的激动剂的量的100%。但是,即使所述剂量含有与未CTP修饰的多肽或其片段相同量的激动剂,它对于受试者仍然是有利的,因为它将以更低的频率施用,这是由于它与正常激动剂相比增加的半衰期。

[0331] 在另一个实施方案中,本文提供的缀合的多肽或其片段的治疗有效量是在每天1次施用的50-500IU/千克体重之间。在另一个实施方案中,缀合的多肽或其片段的治疗有效量是每天1次施用的150-250IU/千克体重。在另一个实施方案中,以对于通过多种方式施用给人患者而言有效的强度,配制包含缀合的多肽或其片段的药物组合物。

[0332] 在一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到20-30IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。在另一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到25-50IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。在另一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到50-100IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。在另一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到100-200IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。在另一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到10-50IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。在另一个实施方案中,以有效地使受试者中的循环多肽或其片段的活性达到20-100IU/dL的量,施用包含本文提供的多肽或其片段的CTP修饰的多肽。

[0333] 在一个实施方案中,每周1次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每周2次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每两星期1次地(每2周1次地)将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每个月2次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每个月1次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每天1次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每2天1次地将本文提供的CTP修饰的多肽或其片段施用给受试者。在另一个实施方案中,每3天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。

[0334] 在另一个实施方案中,每4天1次地将包含多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每5天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每6天1次地将包含本文中提

供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每7-14天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每10-20天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每5-15天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。在另一个实施方案中,每15-30天1次地将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽施用给受试者。

[0335] 在另一个实施方案中,本发明的方法包括增加患者的顺应性,所述患者罹患需要本文中提供的多肽或其片段疗法的慢性疾病。在另一个实施方案中,通过使CTP修饰的多肽或其片段的流体动力学尺寸增加本文中提供的因数。在另一个实施方案中,本发明的方法能够降低多肽或其片段的施用频率。

[0336] 在另一个实施方案中,术语顺应性包括坚持。在另一个实施方案中,本发明的方法包括如下增加需要治疗的患者的顺应性:使多肽或其片段的流体动力学尺寸增加本文中提供的因数或增量,其导致降低所述多肽或其片段的施用频率。在另一个实施方案中,由于CTP修饰和流体动力学尺寸随后增加本文中提供的因数或增量(这使得所述多肽或其片段更稳定),实现本文提供的多肽或其片段的施用频率的下降。在另一个实施方案中,由于CTP修饰和流体动力学尺寸随后增加本文中提供的因数或增量(这会增加所述多肽或其片段的半衰期($T_{1/2}$)),实现本文提供的多肽或其片段的施用频率的下降。在另一个实施方案中,通过使多肽或其片段的流体动力学尺寸增加本文中提供的因数或增量(这导致增加本文中提供的多肽或其片段的清除时间或降低清除率),实现本文提供的多肽或其片段的施用频率的下降。

[0337] 在另一个实施方案中,通过使多肽或其片段的流体动力学尺寸增加本文中提供的因数或增量(这导致增加多肽或其片段的AUC测量),实现本文提供的多肽或其片段的施用频率的下降。

[0338] 在一个实施方案中,口服施用包括单位剂型,包括片剂、胶囊剂、锭剂、咀嚼片剂、混悬液、乳剂等。这样的单位剂型包含安全且有效量的期望的本文提供的多肽或其片段,在一个实施方案中,其中的每一种是约0.7或3.5mg至约280mg/70kg,或在另一个实施方案中,约0.5或10mg至约210mg/70kg。适合于制备用于口服施用的单位剂型的药学上可接受的载体是本领域众所周知的。在另一个实施方案中,片剂通常包含常规药学上相容的佐剂如惰性稀释剂,诸如碳酸钙、碳酸钠、甘露醇、乳糖和纤维素;粘合剂诸如淀粉、明胶和蔗糖;崩解剂诸如淀粉、海藻酸和交联羧甲基纤维素(croscarmellose);润滑剂诸如硬脂酸镁、硬脂酸和滑石粉。在一个实施方案中,助流剂诸如二氧化硅可以用于改善粉末混合物的流动特性。在一个实施方案中,为了外观,可以加入着色剂诸如FD&C染料。甜味剂和矫味剂,诸如阿司帕坦、糖精、薄荷醇、薄荷和果味矫味剂,是咀嚼片剂的有用佐剂。胶囊剂通常包含以上公开的一种或多种固体稀释剂。在另一个实施方案中,载体组分的选择取决于后续考虑事项,如味道、成本和贮存稳定性,其对于本发明的目的而言不是关键性的,且可以由本领域技术人员容易地选择。

[0339] 在一个实施方案中,口服剂型包含预定义的释放特性。在一个实施方案中,本发明的口服剂型包含延长释放片剂、胶囊剂、锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方案中,本发明的口服剂型包含缓释片剂、胶囊剂、锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方案中,本发明的口服剂型包

含立即释放片剂、胶囊剂、锭剂或咀嚼片剂。在一个实施方案中,如本领域技术人员已知的,根据药物活性成分的期望释放特性配制所述口服剂型。

[0340] 在另一个实施方案中,口服组合物包含液体溶液、乳剂、混悬液等。在另一个实施方案中,适合于制备这样的组合物的药学上可接受的载体是本领域众所周知的。在另一个实施方案中,液体口服组合物包含约0.001%至约0.933%的一种或多种期望的化合物,或在另一个实施方案中,约0.01%至约10%。

[0341] 在一个实施方案中,用于本发明的方法中的组合物包含溶液或乳剂,在另一个实施方案中,其为包含安全且有效量的本发明化合物和任选的意图用于局部鼻内施用的其它化合物的水溶液或乳剂。在另一个实施方案中,所述组合物包含约0.001%至约10.0% (w/v) 的主题化合物,更优选约0.1%至约2.0%,其用于通过鼻内途径全身性递送所述化合物。

[0342] 在另一个实施方案中,将包含多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽注射进肌肉中(肌肉内注射)。在另一个实施方案中,将包含多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽注射在皮肤下面(皮下注射)。在另一个实施方案中,将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽注射进肌肉中。在另一个实施方案中,将包含本文中提供的多肽或其片段和至少一个CTP单元的多肽注射进皮肤中。在另一个实施方案中,通过全身施用来施用如本文中所述的本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,通过静脉内注射来施用如本文中所述的本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,施用可以是胃肠外的、肺的、口服的、局部的、真皮内的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的、皮下的、鼻内的、经鼻的、眼内的、眼的、硬膜外的、含服的、直肠的、透粘膜的、肠或胃肠外的递送,包括骨髓内注射以及鞘内或直接心室内施用。

[0343] 在另一个实施方案中,以局部方式而不是全身性方式施用制剂,例如,通过将制剂直接注射进患者身体的特定区域中。

[0344] 在一个实施方案中,所述施用途径可以是肠内的。在另一个实施方案中,所述途径可以是结膜的、透皮的、真皮内的、动脉内的、阴道的、直肠的、肿瘤内的、经癌灶(paracancer) 、透粘膜的、肌肉内的、血管内的、心室内的、颅内的、鼻内的、舌下的或它们的组合。

[0345] 在另一个实施方案中,通过静脉内、动脉内或肌肉内注射液体制剂来施用所述药物组合物。在另一个实施方案中,液体制剂包括溶液、混悬液、分散体、乳剂、油等。在一个实施方案中,静脉内地施用所述药物组合物,并因此将其配制成适合于静脉内施用的形式。在另一个实施方案中,动脉内地施用所述药物组合物,并因此将其配制成适合于动脉内施用的形式。在另一个实施方案中,肌内地施用所述药物组合物,并因此将其配制成适合于肌肉内施用的形式。

[0346] 此外,且在另一个实施方案中,将所述药物组合物局部施用于身体表面,并因此将其配制成适合于局部施用的形式。合适的局部制剂包括凝胶、软膏剂、乳膏剂、洗剂、滴剂等。对于局部施用,将本发明的化合物与一种或多种额外的适当治疗剂组合,制备,和作为在有或无药用载体的生理上可接受的稀释剂中的溶液、混悬液或乳剂来施用。

[0347] 在一个实施方案中,通过本领域众所周知的方法来制备本发明的药物组合物,例如,借助于常规混合、溶解、粒化、做糖衣丸、磨细、乳化、包封、截留或冻干过程制备。

[0348] 在一个实施方案中,使用促进将所述活性成分加工成可在药学上使用的制品的一种或多种生理上可接受的载体(包括赋形剂和助剂),以常规方式配制根据本发明使用的药物组合物。在一个实施方案中,制剂取决于选择的施用途径。

[0349] 在一个实施方案中,在水溶液中配制本发明的注射剂。在一个实施方案中,在生理上相容的缓冲液(诸如汉克氏溶液、林格氏溶液或生理盐水缓冲液)中配制本发明的注射剂。在另一个实施方案中,对于透粘膜施用,在所述制剂中使用适合要透过的屏障的穿透剂。所述穿透剂在本领域内是公知的。

[0350] 在一个实施方案中,将本文所述的制品配制为用于胃肠外施用,例如,通过快速推注或连续输注。在另一个实施方案中,注射用制剂呈单位剂型,例如在安瓿中或在多剂量容器中,任选具有加入的防腐剂。在另一个实施方案中,组合物是在油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳剂,且含有配制剂诸如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0351] 在另一个实施方案中,所述组合物还包含:防腐剂,诸如苯扎氯铵和硫柳汞等;螯合剂,诸如依地酸钠等;缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐和乙酸盐;张度剂诸如氯化钠、氯化钾、甘油、甘露醇等;抗氧化剂诸如抗坏血酸、乙酰基胱氨酸、焦亚硫酸钠等;芳香剂;粘度调节剂,诸如聚合物,包括纤维素及其衍生物;和聚乙烯醇以及根据需要调节这些水性组合物的pH的酸和碱。在另一个实施方案中,所述组合物还包含局部麻醉剂或其它活性物。所述组合物可以用作喷雾剂、合剂(mist)、滴剂等。

[0352] 在一个实施方案中,用于胃肠外施用的药物组合物包括水溶性形式的活性制品的水溶液。另外,可以将活性成分的混悬液制备成适当的基于油或水的注射混悬液。在另一个实施方案中,合适的亲脂溶剂或媒介物包括:脂肪油诸如芝麻油,或合成的脂肪酸酯诸如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。在某些实施方案中,水性注射混悬液含有增加所述混悬液的粘度的物质,诸如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。在另一个实施方案中,所述混悬液还含有合适的稳定剂或增加活性成分的可溶性以允许制备高浓缩溶液的试剂。

[0353] 在另一个实施方案中,可以在囊泡、特别是在脂质体中递送所述活性化合物(参见 Langer, Science 249:1527-1533 (1990); Treat 等人, in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein 和 Fidler (编), Liss, New York, 第 353-365 页 (1989); Lopez-Berestein, 文献同上, 第 317-327 页; J.E. Diederichs 等人, Pharm./nd. 56 (1994) 267-275)。

[0354] 在另一个实施方案中,将在控释系统中递送的药物组合物配制成用于静脉内输注、可植入的渗透泵、透皮贴剂、脂质体或其它施用模式。在一个实施方案中,使用泵(参见 Langer, 出处同上; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald 等人, Surgery 88:507 (1980); Saudek 等人, N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)。在另一个实施方案中,可以使用聚合材料。在另一个实施方案中,可以将控释系统置于治疗靶标(即,脑)的附近,因此仅需要全身剂量的一部分(参见,例如, Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 出处同上, 第2卷, 第115-138页 (1984)。在 Langer 的综述 (Science 249:1527-1533 (1990)) 中讨论了其它控释系统。

[0355] 在另一个实施方案中,所述活性成分是呈粉末形式,其用于在使用之前用合适的媒介物(例如,无菌的、无热原的基于水的溶液)构建。在某些实施方案中,将组合物配制用于雾化和吸入施用。在另一个实施方案中,将组合物包含在具有附带的雾化装置的容器中。

[0356] 在一个实施方案中,使用例如常规栓剂基质诸如可可脂或其它甘油酯,将本发明的制品配制成直肠组合物诸如栓剂或保留灌肠剂。

[0357] 在一个实施方案中,适用于用在本发明的上下文中的药物组合物包括这样的组合物:其中含有有效地实现预期目的的量的活性成分。在另一个实施方案中,治疗有效量是指有效地预防、减轻或改善疾病症状或延长接受治疗的受试者的生存时间的活性成分的量。

[0358] 在一个实施方案中,治疗有效量的确定完全是在本领域技术人员的能力范围内。

[0359] 可以充当药学上可接受的载体或其组分的物质的一些例子是:糖类,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉类,诸如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和甲基纤维素;黄蓍胶粉末;麦芽;明胶;滑石粉;固体润滑剂,诸如硬脂酸和硬脂酸镁;硫酸钙;植物油,诸如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可油;多元醇诸如丙二醇、甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;海藻酸;乳化剂,诸如吐温TM商标乳化剂;润湿剂,诸如月桂基硫酸钠;着色剂;矫味剂;压片剂、稳定剂;抗氧化剂;防腐剂;无热原水;等张盐水;和磷酸盐缓冲溶液。要与所述化合物联合使用的药学上可接受的载体的选择基本上取决于要施用所述化合物的方式。在一个实施方案中,如果要注射主题化合物,那么所述药学上可接受的载体是含有血液相容的助悬剂的无菌生理盐水,其pH已经被调节至约7.4。

[0360] 另外,所述组合物还包含:粘合剂(例如阿拉伯胶、玉米淀粉、明胶、卡波姆、乙基纤维素、瓜尔胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚维酮),崩解剂(例如玉米淀粉、马铃薯淀粉、海藻酸、二氧化硅、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、瓜尔胶、淀粉羟乙酸钠),不同pH和离子浓度的缓冲液(例如,Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐),用于防止吸收至表面的添加剂诸如白蛋白或明胶,去污剂(例如,吐温20、吐温80、Pluronic F68、胆汁酸盐),蛋白酶抑制剂、表面活性剂(例如月桂基硫酸钠),渗透增强剂、增溶剂(例如,甘油、聚乙烯甘油),抗氧化剂(例如,抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠、丁羟茴香醚),稳定剂(例如羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素),增粘剂(例如卡波姆、胶体二氧化硅、乙基纤维素、瓜尔胶),甜味剂(例如阿司帕坦、柠檬酸),防腐剂(例如,硫柳汞、苯甲醇、对羟基苯甲酸酯),润滑剂(例如硬脂酸、硬脂酸镁、聚乙二醇、月桂基硫酸钠),助流剂(例如胶体二氧化硅),塑化剂(例如邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三乙酯),乳化剂(例如卡波姆、羟丙基纤维素、月桂基硫酸钠),聚合物包衣剂(例如,泊洛沙姆或泊洛沙胺),包衣剂和成膜剂(例如乙基纤维素、丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯)和/或佐剂。

[0361] 糖浆剂、酏剂、乳剂和混悬液的载体的典型组分包括乙醇、甘油、丙二醇、聚乙二醇、液体蔗糖、山梨醇和水。对于混悬液而言,典型的助悬剂包括甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、纤维素(例如AvicelTM、RC-591)、黄蓍胶和海藻酸钠;典型的润湿剂包括卵磷脂和聚氧化乙烯脱水山梨糖醇(例如聚山梨酯80)。典型的防腐剂包括对羟基苯甲酸甲酯和苯甲酸钠。在另一个实施方案中,口服液体组合物还含有上面公开的一种或多种组分诸如甜味剂、矫味剂和着色剂。

[0362] 所述组合物还包括将活性物质掺入在聚合物化合物(诸如聚乳酸、聚乙醇酸(polglycolic acid)、水凝胶等)的微粒制品的内部或表面上,或掺入在脂质体、微乳剂、胶束、单层或多层囊泡、血影(erythrocyte ghosts)或原生质球上。这样的组合物将影响物理状态、可溶性、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。

[0363] 本发明还包括用聚合物(例如泊洛沙姆或泊洛沙胺)包被的微粒组合物,以及偶联

至针对组织特异性受体、配体或抗原的抗体的化合物或偶联至组织特异性受体的配体的化合物。

[0364] 在一个实施方案中,通过共价连接水溶性聚合物来修饰化合物,所述水溶性聚合物是诸如聚乙二醇、聚乙二醇与聚丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮或聚脯氨酸。在另一个实施方案中,与相应的未修饰的化合物相比,所述修饰的化合物在静脉内注射之后表现出在血液中实质上更长的半衰期。在一个实施方案中,修饰也会增加所述化合物在水溶液中的可溶性,消除聚集,增强所述化合物的物理和化学稳定性,并极大地降低所述化合物的免疫原性和反应性。在另一个实施方案中,通过与未修饰的化合物相比以更低频率或更低剂量施用这样的聚合物-化合物加合物,实现期望的体内生物活性。

[0365] 最初可以从体外测定估算有效量或剂量的制品。在一个实施方案中,可以在动物模型中配制剂量,且这样的信息可以用来更准确地确定在人类中有用的剂量。

[0366] 在一个实施方案中,通过标准制药规程在体外、在细胞培养物或实验动物中可以确定本文描述的活性成分的毒性和治疗效果。在一个实施方案中,可以将得自这些体外和细胞培养测定和动物研究的数据用于配置人用的剂量范围。在一个实施方案中,剂量随采用的剂型和利用的施用途径而变化。在一个实施方案中,精确的制剂、施用途径和剂量可以由个别医师考虑到患者的状况来选择[参见例如,Fingl,等人,(1975)“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,第1章第1页]。

[0367] 在一个实施方案中,取决于要治疗的病症的严重程度和应答性,给药可以是单次或多次给药,疗程持续几天至几周,或直到实现治愈或达到疾病状态的减轻。

[0368] 在一个实施方案中,组合物的施用量当然取决于治疗的受试者、疾病严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0369] 在一个实施方案中,还制备组合物,包括在相容的药用载体中配制的本发明制品,其置于适当的容器中,并标示指定的病症的治疗。

[0370] 在另一个实施方案中,如本文中所述的多肽或其片段或其变体(CTP修饰的)形式是与以下物质组合的低压冻干的(即,冷冻干燥的)制品:复合的有机赋形剂和稳定剂诸如非离子表面活性剂(即,表面活性剂)、各种糖、有机多元醇和/或人血清白蛋白。在另一个实施方案中,药物组合物包含在无菌注射用水中制备的、低压冻干的本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,药物组合物包含在注射用无菌PBS中低压冻干的本文中提供的多肽或其片段。在另一个实施方案中,药物组合物包含在注射用无菌0.9%NaCl中低压冻干的本文中提供的多肽或其片段。

[0371] 在另一个实施方案中,所述药物组合物包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段和复合载体诸如人血清白蛋白、多元醇、糖和阴离子表面活性稳定剂。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含CTP-多肽或其片段和乳糖酸和乙酸盐/甘氨酸缓冲液。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段和增加干扰素成分在水中的可溶性的氨基酸(诸如精氨酸或谷氨酸)。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含低压冻干的如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段和甘氨酸或人血清白蛋白(HSA)、缓冲剂(例如乙酸盐)和等渗剂(例如NaCl)。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含低压冻干的如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段、和磷酸盐缓冲液、甘氨酸和HSA。

[0372] 在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物当置于具有约4至7.2之间的pH的缓冲溶液中时是稳定的。在另一个实施方案中,包含CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物是在具有约4至8.5之间的pH的缓冲溶液中。在另一个实施方案中,包含CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物是在具有约6至7之间的pH的缓冲溶液中。在另一个实施方案中,包含CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物是在具有约6.5的pH的缓冲溶液中。在另一个实施方案中,用作为稳定剂的氨基酸且在某些情况下用盐(如果所述氨基酸不含有带电荷的侧链)来稳定包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物。

[0373] 在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物是这样的液体组合物:其包含约0.3重量%至5重量%之间的稳定剂,所述稳定剂是氨基酸。

[0374] 在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物提供了给药准确度和产品安全性。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物提供了用于可注射施用中的生物学上有活性的、稳定的液体制剂。在另一个实施方案中,所述药物组合物包含未低压冻干的如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段。

[0375] 在另一个实施方案中,包含本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物提供了这样的液体制剂:其允许以液体状态长期贮存,从而促进在施用之前的贮存和运输。

[0376] 在另一个实施方案中,包含本文中提供的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含固体脂质作为基体材料。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的可注射药物组合物包含固体脂质作为基体材料。在另一个实施方案中,如Speiser (Speiser等人,Pharm.Res.8 (1991) 47-54)所述通过喷雾冷凝来生产脂质微粒,随后将脂质纳米球用于口服施用(Speiser EP 0167825 (1990))。在另一个实施方案中,使用的脂质被身体较好地耐受(例如由存在于胃肠外营养物的乳剂中的脂肪酸组成的甘油酯)。

[0377] 在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含高分子微粒。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含纳米颗粒。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含脂质体。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含脂质乳剂。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含微球。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含脂质纳米颗粒。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含含有两亲脂质的脂质纳米颗粒。在另一个实施方案中,包含如本文中所述的CTP修饰的多肽或其片段的药物组合物包含含有药物、脂质基质和表面活性剂的脂质纳米颗粒。在另一个实施方案中,所述脂质基质具有为至少50% (w/w)的甘油单酯含量。

[0378] 在一个实施方案中,本发明的组合物存在于包装或分配器装置中,诸如FDA批准的试剂盒,其包含一个或更多个含有活性成分的单位剂型。在一个实施方案中,所述包装例如包含金属或塑料箔,诸如泡罩包。在一个实施方案中,所述包装或分配器装置伴有施用说明书。在一个实施方案中,所述包装或分配器伴有与容器有关的公告,所述公告采用管理药物

的制备、使用或销售的政府机构指定的形式,所述公告反映了所述机构对所述组合物的形式或人或兽施用的批准。在一个实施方案中,所述公告是由美国食品和药品管理局批准的关于处方药的标签或经批准的产品插页。

[0379] 在一个实施方案中,应当理解,本文提供的多肽或其片段可以与额外活性剂一起提供给个体,以实现与用每种药剂自身治疗相比改善的治疗效果。在另一个实施方案中,采取措施(例如互补药剂的施用和选择)来避免与联合治疗有关的不利副作用。

[0380] 在一个实施方案中,术语“约”是指以定量方式加或减5%,或在另一个实施方案中加或减10%,或在另一个实施方案中加或减15%,或在另一个实施方案中加或减20%。

[0381] 在一个实施方案中,术语“受试者”表示需要治疗病症或其后遗症或者易感病症或其后遗症的哺乳动物,包括人。受试者可以包括狗、猫、猪、牛、绵羊、山羊、马、大鼠和小鼠和人类。术语“受试者”不排除在所有方面正常的个体。

[0382] 本领域普通技术人员在检查下述实施例以后,会明白本发明的其它目标、优点和新颖的特征,所述实施例无意成为限制性的。另外,上文描述的和在下面的权利要求书部分中要求保护的本发明的不同实施方案和方面中的每一个,都可以得到下述实施例的实验支持。

[0383] 实施例

[0384] 材料和方法:

[0385] 不同的CTP修饰的蛋白的生产

[0386] 将人生长激素(hGH)、促红细胞生成素(EPO)、APO-A1、因子IX和因子VII的DNA编码区与CTP肽的DNA序列连接。将CTP肽以单个拷贝或串联地融合至N-端和/或C-端,如在表2中所详述的。在能够适当构建O-聚糖的CHO细胞系中转染和表达经工程改造的质粒,这在增加蛋白的流体动力学体积中起关键作用(参见表5)。根据为每种蛋白独特地开发的定制方法纯化不同的蛋白,如下面所详述的:

[0387] CTP-EPO-CTP-CTP:将澄清的收获物加载到Blue Sepharose柱上。将洗脱的产物稀释并加载到Q Sepharose柱上。通过使用Amicon离心装置(30kDa截止)进行超滤,处理从Q Sepharose柱洗脱的级分,并透析。将浓缩的和透析的级分加载到Phenyl Sepharose柱上。通过使用Amicon离心装置(30kDa截止)进行超滤,处理从Phenyl Sepharose洗脱的级分,并在PBS pH 7中透析。

[0388] CTP-CTP-EPO和CTP-CTP-EPO-CTP-CTP:将澄清的收获物加载到DEAE Sepharose柱上并洗脱。将洗脱的级分用硫酸铵调节并加载到Phenyl Sepharose HS柱上。将Phenyl洗脱物浓缩和透析。接下来的2个柱处于穿流模式:Hydroxyapatite I型40 μ m和SP Sepharose。将终产物浓缩、透析并在-20 $^{\circ}$ C保存。

[0389] APO-CTP和APO-CTP-CTP:用亲和柱(Capture Select Apo,Bac)纯化这2种APO蛋白形式。将澄清的收获物用PBS进行1:1稀释,并从柱洗脱。将洗脱物浓缩并在PBS中透析,并在-80 $^{\circ}$ C保存。

[0390] CTP-hGH-CTP-CTP:使用UFDF1过滤澄清的收获物。完成病毒灭活。第一个色谱法是阴离子交换色谱法,DEAE Sepharose FF。第二个色谱法的树脂是Phenyl Sepharose。将第二个色谱法的洗脱液合并物在UFDF-2中渗滤并浓缩。UFDF-2步骤之后是另外2个处于穿流模式的色谱法:Ceramic Hydroxyapatite I型40 μ m和SP Sepharose FF。进行纳米过滤。将

产物溶液浓缩至 41 ± 1 mg/mL并透析。

[0391] FIX-CTP-CTP-CTP:将Tris-HCl (pH 9) 加入澄清的收获物中。使用阴离子交换Q柱, 进行第一个色谱柱。下一个柱是Heparin Hyper D。将洗脱的级分调至10mM磷酸钠的终浓度, 具有6.8的最终pH。在CHT树脂上进行最后一个色谱法步骤。将洗脱的级分浓缩并在TBS pH 7.5中透析。

[0392] FIX-CTP-CTP-CTP-CTP:将澄清的收获物浓缩并透析。唯一的色谱法步骤是亲和色谱法, 固定化的榴莲凝素。将洗脱的产物浓缩并在TBS pH 7.5中透析。

[0393] FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP:将澄清的收获物浓缩并透析。唯一的色谱法步骤是亲和色谱法, 固定化的榴莲凝素。将洗脱的产物浓缩并在TBS pH 7.5中透析。

[0394] APOA1-CTP-CTP:将澄清的收获物浓缩并透析。使用阴离子交换色谱法DEAE Sepharose FF柱进行第一个色谱法。在固定化的榴莲凝素树脂上进行第二个色谱法步骤。将洗脱液渗滤, 并用UFDF-2在TBS (pH 7.4) 中浓缩。

[0395] APOA1-CTP:使用亲和色谱法,Capture-Select APO-AI柱进行第一个色谱法。在固定化的榴莲凝素树脂上进行第二个色谱法步骤。将洗脱液渗滤, 并用UFDF-2在TBS (pH7.4) 中浓缩。

[0396] APOA1:将稀释的收获物加载到亲和色谱法,Capture-Select APO-AI上。将洗脱液渗滤并用UFDF-2在TBS (pH 7.4) 中浓缩。

[0397] FVIIa-CTP-CTP-CTP:将澄清的收获物浓缩并透析。完成病毒灭活。使用亲和柱VII Select进行第一个色谱法。将洗脱的级分在加载到下一个柱-Ceramic Hydroxyapatite (CHT) 上之前进行稀释。将CHT洗脱液加载到Phenyl Sepharose柱上。将洗脱液渗滤, 并在阴离子交换色谱柱上活化。然后将柱洗涤, 并将产物洗脱。进行纳米过滤。

[0398] FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP:将澄清的收获物浓缩并透析。使用亲和柱VII Select进行第一个色谱法。将洗脱的级分加载到下一个柱-Ceramic Hydroxyapatite (CHT) 上。将柱洗涤, 并将产物洗脱。将CHT洗脱液加载到Phenyl Sepharose柱上。将洗脱液渗滤并浓缩。在阴离子交换色谱柱上活化因子VII。然后将柱洗涤, 并将产物洗脱。

[0399] 表2:CTP修饰的蛋白的简要描述

[0400]

质粒简要描述
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)
CTP-CTP-EPO
CTP-EPO-CTP-CTP
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP
APO-CTP
APO-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP

[0401] CTP修饰的蛋白的去糖基化

[0402] 使用Glyko唾液酸酶A(目录号PZ PZGK80040,Prozyme)、O-聚糖酶(目录号PZ PZGK80090,Prozyme)和N-聚糖酶(目录号PZGKE-5006A,Prozyme),进行CTP修饰的蛋白的去糖基化。将蛋白用唾液酸酶A消化2h(在37℃),随后用O-聚糖酶消化,并在需要时用N-聚糖酶消化过夜。

[0403] 通过MALDI-TOF确定分子量

[0404] 使用REFLEX-IV模型(Bruker Daltonics,Bremen,德国),通过MALDI-TOF技术测量CTP修饰的蛋白的分子量(Mw)。基质辅助的激光解吸/电离-飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS)是这样的技术:其中用激光脉冲照射紫外线吸收基质和生物分子如蛋白或肽的共沉淀物。电离的生物分子在电场中加速并进入飞行管。在该管中飞行期间,不同的分子根据它们的质荷比发生分离,并在不同的时间到达检测器。以此方式,每个分子产生可以转化成分子量的独特信号。该方法被用于表征具有在400-350,000Da之间的分子质量的不同蛋白和肽。它是一种非常灵敏的方法,它允许以0.1-0.01%的准确度检测低(10⁻¹⁵-10⁻¹⁸摩尔)量的样品。在Analytical Research Services Unit(Ben-Gurion University,Beer-Sheva,以色列)进行测量。

[0405] 使用SEC柱通过HPLC分析流体动力学尺寸

[0406] 对于hGH、Epo和Apo天然和有关的CTP-修饰的蛋白而言使用TSKgel G2000SW SEC柱(目录号08540,TosoHaas),或对于因子IX和因子VII天然和有关的CTP修饰的蛋白而言使用TSKgel G3000WXL SEC柱(目录号08541,TosoHaas),通过HPLC(Dionex UltiMate 3000)测量蛋白的流体动力学尺寸。使用H Mw校准试剂盒(目录号151-1901,BioRad)测量蛋白大小。将结果拟合至对数拟合($y=a*\ln X+b$),并计算不同蛋白的流体动力学尺寸。

[0407] 结果

[0408] 实施例1:不同的CTP修饰的蛋白的生产。

[0409] 将11种不同的CTP修饰的蛋白在CHO细胞系中转染和表达。根据上述的方法纯化各种收获物。纯化的蛋白显示在图1和2中。

[0410] 实施例2:通过MALDI-TOF方法分析分子量

[0411] 使用MALDI-TOF技术确定不同的糖基化的和未糖基化的CTP修饰的蛋白的分子量,并与它们的对应天然蛋白(没有与CTP融合的完整蛋白,即,对于hGH而言为比奥托品,对于Epo、ApoAI而言为EPREX®,对于因子IX而言为Mononine®,和对于FVIIa而言为Novoseven®)的分子量进行对比(表3)。基于蛋白的氨基酸序列,所有天然的和未糖基化的蛋白的测量的Mw与理论分子量较好地一致。计算每个拷贝的未糖基化的和糖基化的CTP实现的分子量的增量,并分别描绘在图3A和3B中。如下计算一个拷贝的CTP对分子量的贡献:首先,通过将天然蛋白的测量的或理论的(在天然hGH的情况下)分子量从它们的对应CTP修饰的蛋白的测量分子量减去,计算分子量的增量。然后,将计算的增量除以每种蛋白的CTP拷贝的数目。例如,MOD-4023(在N-端与一个拷贝的CTP融合且在C-端与2个拷贝的串联CTP融合的hGH)具有38,128的分子量,而天然hGH具有22,000的理论分子量。这两种蛋白之间的差异是16.13kDa,这意味着,每个糖基化的CTP的贡献是5.4kDa(16.13除以3个拷贝的CTP)。在所有测量的蛋白中一个拷贝的未糖基化的CTP的平均贡献是2.76kDa±0.103(图3A,表3)。该结果与单个CTP的理论分子量(其为2.78kDa)一致。糖基化的CTP为分子量贡献4.76kDa±0.422的平均值(图3B,表3),在各种测量的蛋白之间没有显著差异。

[0412] 表3:未糖基化的和糖基化的CTP修饰的蛋白和它们的对应天然蛋白的MALDI-TOF结果。ND-未测定。

[0413]	蛋白描述	理论分子量(基于蛋白主链,不包括聚糖贡献)	未糖基化的蛋白, MALDI-TOF 结果(Da)	糖基化的蛋白, MALDI-TOF 结果(Da)	每一个拷贝的未糖基化的 CTP 的分子大小增量	每一个拷贝的糖基化的 CTP 的分子大小增量
	比奥托品(rhGH)	22000	ND	ND	ND	ND
	CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	30469.4	30525	38128	2.8	5.4

[0414]	EPREX®(rEPO)	18396	18246	29160	0.0	0.0
	CTP-CTP-EPO	23956	23690	37074	2.7	4.0
	CTP-EPO-CTP-CTP	26736	27300	43547.8	3.0	4.8
	APO AI	28078	28021.5	28024.5	0.0	0.0
	APO -CTP	30858	30686.5	32505	2.7	4.5
	APO CTP-CTP	33638	33569	36710	2.8	4.3
	Mononine®(rFIX)	48695.6	47172	53270	0.0	0.0
	FIX-CTP-CTP-CTP	57036	55626.5	68876	2.8	5.2
	FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	59816.2	58346.5	73552.5	2.8	5.1
	FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	62596.2	61051.5	77797	2.8	4.9
	Novoseven®(rFVIIa)	47222.6	45899	50310.4	0.0	
	FVIIa-CTP-CTP-CTP	58343.1	53755.5	64302	2.6	4.7
	FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	61123.2	59266	74431	2.7	4.8
				平均值	2.76	4.76
				SD	0.103	0.422
				%CV	3.72	8.87

[0415] 实施例3:通过HPLC方法分析流体动力学尺寸

[0416] 流体动力学体积是影响蛋白在穿过尺寸排阻柱时的保留时间(RT)的主要参数。因此,使用HMw凝胶过滤校准试剂盒(目录号151-1901,BioRad),通过SEC柱计算蛋白大小。在SEC TSK 2000和TSK 3000柱中测量标准物的保留时间,并计算每个柱的%相对误差(%RE),以便确定分析方法的精确度。计算校准蛋白的观察分子量的%RE,并与校准蛋白的已知和预期分子量进行对比。用于校正曲线的计算分子量的结果和%RE呈现在表4a(对于TSK 2000SEC柱)中和表4b(对于TSK 3000SEC柱)中。结果表明,%RE较低或等于20%(≤20%),从而指示蛋白的确定分子量的宽范围的高精确度。

[0417] 表4a:使用TSK 2000的H_{Mw}校正曲线结果和计算的%RE。通过使用的市售的试剂盒(H_{Mw}校准试剂盒BioRad目录号151-1901),提供校正曲线蛋白的预期分子量。

[0418]	标准蛋白	预期分子量	R.T.	观察的分子量	%RE
	γ-球蛋白	158,000	15.535	155279.16	-1.72

卵白蛋白	44,000	18.535	52924.39	20.28
肌球蛋白	17,000	22.315	13635.14	-19.79
维生素B12	1,350	28.61	1424.88	5.55

[0419] 表4b:使用TSK 3000柱的H_{Mw}校正曲线结果和计算的%RE。通过使用的市售的试剂盒(H_{Mw}校准试剂盒BioRad目录号151-1901),提供校正曲线蛋白的预期分子量。

[0420]

标准蛋白	预期分子量	R.T.	观察的分子量	%RE
------	-------	------	--------	-----

[0421]

甲状腺球蛋白 (Tyroglobulin)	670,000	11.925	753,500	12.46
γ-球蛋白	158,000	16.250	126,808	-19.74
卵白蛋白	44,000	18.702	46,172	4.94
肌球蛋白	17,000	21.012	17,824	4.85

[0422] 为了确定糖基化的CTP对CTP修饰的蛋白的流体动力学体积的贡献,通过SEC柱分析了各种CTP修饰的蛋白,并计算它们的流体动力学尺寸。与它们的CTP修饰的对应蛋白平行地分析对应的重组蛋白:比奥托品(rhGH)、EPREX®(rEPO)、ApoAI、Mononine®(rFIX)和Novoseven®(rFVIIa),以便计算糖基化的CTP对蛋白的共享(表5,图4)。图4A呈现了通过SEC柱测量的、CTP修饰的蛋白相对于天然蛋白的流体动力学尺寸的总增量。

[0423] 表5:CTP修饰的蛋白和它们的对应天然蛋白的一个拷贝的CTP的SEC-HPLC结果和计算的增量。

[0424]

糖基化的蛋白	SEC-HPLC Mw (Da)	每个糖基化的 CTP 的 kDa 的增量
比奥托品(rhGH)	21116	NA
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	107750	28.9
EPREX®(rEPO)	79014	NA
CTP-CTP-EPO	146616	33.8
CTP-EPO-CTP-CTP	168032	29.7
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP	199970	30.2
APO	62086	NA
APO -CTP	100233	38.1
APO CTP-CTP	141094	39.5
Mononine®(rFIX)	117553	NA
FIX-CTP-CTP-CTP	261982	48.1
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	329362	53.0
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	381095	52.7
Novoseven®(rFVIIa)	76706	NA
FVIIa -CTP-CTP-CTP	206645	43.3
FVIIa -CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	325602	49.8

[0425] 通过将天然蛋白的测量流体动力学尺寸从它们的对应CTP修饰的蛋白的测量流体动力学尺寸减去,计算一个拷贝的糖基化的CTP的分子量的增量。然后,将计算的增量除以每种蛋白的CTP拷贝的数目。计算的一个拷贝的糖基化的CTP对不同蛋白的分子量的贡献呈现在图4B中。各种蛋白表现出每个拷贝的糖基化的CTP在29kDa至53kDa之间的范围内的增量。

[0426] 有趣地和意外地,与其它测量的蛋白相比,一个拷贝的糖基化的CTP对FIX和FVIIa的贡献显著高于43-53kDa(每个拷贝的CTP)的贡献(表5)。如通过MALDI-TOF测量的,每一个拷贝的糖基化的CTP的流体动力学尺寸的增量远远高于每一个拷贝的糖基化的CTP对分子量的4.76kDa的计算贡献。所述方法之间的计算分子量的差异源自以下事实:尽管MALDI-TOF是在测量蛋白的实际分子量,SEC-HPLC测量结果受蛋白的流体动力学体积影响,从而提示,糖基化的CTP正在显著增加它所连接的蛋白的流体动力学体积。与通过MALDI-TOF测量的每个CTP的计算贡献相比,流体动力学体积的量级是约6-11倍。值得指出的是,对于hGH和CTP修饰的EP0变体(约30kDa)而言,CTP对被修饰的蛋白的流体动力学尺寸的贡献较低,但是对于FIX和FVII-CTP修饰的变体而言稍高,并且令人惊讶地不受添加至特定蛋白的CTP的数目影响。

[0427] 另外,通过SEC-HPLC确定了未糖基化的CTP对蛋白的分子量的贡献(表6,图5A和5B)。如下进行去糖基化:将蛋白与唾液酸酶A(除去唾液酸)一起在37℃温育2h,随后添加O-聚糖酶(以除去O-聚糖)。在EPREX®(rEP0)、Mononine®(rFIX)、NovoSeven®(rFVII)和它们的对应的CTP修饰的蛋白(它们含有N-聚糖)的情况下,加入N-聚糖酶进行过夜消化以除去N-聚糖。计算未糖基化的CTP对各种蛋白的流体动力学尺寸或体积的贡献,并与它们的对应天然蛋白进行对比,即,如下计算未糖基化的CTP修饰的多肽对流体动力学体积的贡献:将未糖基化的CTP修饰的多肽的流体动力学体积与未糖基化的对应天然蛋白的流体动力学体积进行对比。例如,对于EP0,从Eprex®除去N-和O-聚糖,并计算CTP修饰的Epo变体的流体动力学体积的增加和对比它们的分子量)。

[0428] 图5A描绘了完整蛋白的流体动力学尺寸的增量,而图5B描绘了一个拷贝的未糖基化的CTP修饰的蛋白的贡献。值得注意的是,与对应的天然蛋白相比,未糖基化的CTP会增加CTP修饰的蛋白的流体动力学尺寸。一个拷贝的未糖基化的CTP的计算贡献在不同蛋白之间是不同的,每一个拷贝的未糖基化的CTP的计算贡献是在8kDa至21kDa范围内(表6)。考虑到CTP(其由28个氨基酸组成)的理论分子量是2.78kDa和测量的分子量(通过MALDI-TOF)也是约2.76kDa,这些结果提示,未糖基化的CTP对分子量的贡献高于预期值。此外,且如关于糖基化的CTP类似地观察到的,对于未糖基化的CTP,也观察到流体动力学体积远远高于预期值。总之,将CTP连接至蛋白会导致流体动力学体积的增加,这可归因于CTP主链和CTP聚糖。

[0429] 还观察到,添加至特定蛋白的CTP的数目不会影响它们的流体动力学尺寸的贡献。对于Apo、FIX和FVII(其具有在蛋白的C-端中的CTP拷贝),观察到未糖基化的CTP的最显著的增量。这种在C-端添加CTP会导致对流体动力学体积的较高贡献的发现是意外的。有趣地和意外地,Apo、FIX和FVIIa CTP-修饰的蛋白的一个拷贝的未糖基化的CTP的贡献是非常类似的,且测量为~20kDa(表6),但是凝血因子的糖基化的CTP的贡献显著高于Apo糖基化的CTP(表5)。

[0430] 表6:未糖基化的CTP修饰的蛋白和它们的对应天然蛋白的一个拷贝的CTP的SEC-HPLC结果和计算的增量。

[0431]

未糖基化的蛋白	SEC-HPLC 分子量(Da)	每个未糖基化的 CTP 的 kDa 增加
比奥托品(rhGH)	21116	NA
CTP-hGH-CTP-CTP (MOD-4023)	45480	8.1
EPREX®(rEPO)	18083	NA
CTP-CTP-EPO	49472	15.7
CTP-EPO-CTP-CTP	65991	16.0
CTP-CTP-EPO-CTP-CTP	85228	16.8
APO	61267	NA
APO -CTP	82846	21.6
APO CTP-CTP	104007	21.4
Mononine®(rFIX)	79539	NA
FIX-CTP-CTP-CTP	138132	19.5
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP	160115	20.1
FIX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	186677	21.4
Novoseven®(rFVIIa)	52570	NA
FVIIa-CTP-CTP-CTP	107321	18.3
FVIIa-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP	158706	21.2

[0432] 该研究表明,一个拷贝的糖基化的CTP会为流体动力学体积贡献至少28 (kDa),而分子量的增量是4.76 (kDa) 0.422,如分别使用SEC-HPLC和MALDI-TOF所确定的。CTP修饰的蛋白的流体动力学体积的该意外量级可能是观察到的延长的血清半衰期和CTP修饰的蛋白的生物活性的增强的原因。未糖基化的CTP会为流体动力学体积贡献至少8 (kDa),而分子量增量是2.76 (kDa) 0.103。令人感兴趣的是,通过MALDI-TOF测量的未糖基化的和糖基化的CTP肽的分子量在所有蛋白之间是类似的。此外,通过SEC-HPLC测量的糖基化的和未糖基化的CTP肽修饰的蛋白的流体动力学体积是不同的。这些发现提示,尽管当在不同位置与不同蛋白融合时,CTP肽的分子量是类似的,但是它会造成它所连接的不同蛋白的流体动力学体积的意外增加,如通过SEC柱测量结果所证实的。

[0433] 已经参考附图描述了本发明的优选实施方案,应当理解,本发明不限于精确的实施方案,并且本领域技术人员可以在本发明中做出各种变化和修改,而不脱离如在所附权利要求中限定的本发明的范围或精神。

序列表

<110> 奥普科生物制品有限公司

<120> 通过连接至促性腺激素羧基端肽来增加多肽的流体动力学体积的方法

<130> P-76221-PC

<140> PCT/IL2013/050960

<141> 2013-11-20

<150> 61/728,662

<151> 2012-11-20

<160> 73

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP序列

<400> 1

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser

1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu

20 25 30

<210> 2

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP序列

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 截短的CTP序列

<400> 3

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

1 5 10

<210> 4

<211> 26

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hGH信号肽

<400> 4

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

20 25

<210> 5

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser		
	165	170 175
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe		
	180	185 190
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys		
	195	200 205
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe		
	210	215
<210> 6		
<211> 192		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hGH序列		
<400> 6		
Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu		
1	5	10 15
Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe		
	20	25 30
Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn		
	35	40 45
Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn		
	50	55 60
Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser		
65	70	75 80
Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser		
	85	90 95
Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr		
	100	105 110
Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg		
	115	120 125
Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr		
	130	135 140
Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn		
145	150	155 160
Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr		
	165	170 175
Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe		
	180	185 190

<210> 7

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> hGH序列

<400> 7

Met Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu

1 5 10 15

Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala

20 25

<210> 8

<211> 217

<212> PRT

<213> 智人

<400> 8

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu

1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu

20 25 30

Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln

35 40 45

Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys

50 55 60

Val Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe

65 70 75 80

Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys

85 90 95

Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp

100 105 110

Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val

115 120 125

Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu

130 135 140

Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg

145 150 155 160

Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser

165 170 175

His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe

				180				185				190				
Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	
				195				200				205				
Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe								
				210				215								
<210> 9																
<211> 245																
<212> PRT																
<213> 人工序列																
<220>																
<223> hGH-CTP																
<400> 9																
Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ala	Phe	Gly	Leu	Leu	
1				5				10				15				
Cys	Leu	Pro	Trp	Leu	Gln	Glu	Gly	Ser	Ala	Phe	Pro	Thr	Ile	Pro	Leu	
				20				25				30				
Ser	Arg	Leu	Phe	Asp	Asn	Ala	Met	Leu	Arg	Ala	His	Arg	Leu	His	Gln	
				35				40				45				
Leu	Ala	Phe	Asp	Thr	Tyr	Gln	Glu	Phe	Glu	Glu	Ala	Tyr	Ile	Pro	Lys	
				50				55				60				
Glu	Gln	Lys	Tyr	Ser	Phe	Leu	Gln	Asn	Pro	Gln	Thr	Ser	Leu	Cys	Phe	
65					70				75				80			
Ser	Glu	Ser	Ile	Pro	Thr	Pro	Ser	Asn	Arg	Glu	Glu	Thr	Gln	Gln	Lys	
				85				90				95				
Ser	Asn	Leu	Glu	Leu	Leu	Arg	Ile	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Gln	Ser	Trp	
				100				105				110				
Leu	Glu	Pro	Val	Gln	Phe	Leu	Arg	Ser	Val	Phe	Ala	Asn	Ser	Leu	Val	
				115				120				125				
Tyr	Gly	Ala	Ser	Asp	Ser	Asn	Val	Tyr	Asp	Leu	Leu	Lys	Asp	Leu	Glu	
				130				135				140				
Glu	Gly	Ile	Gln	Thr	Leu	Met	Gly	Arg	Leu	Glu	Asp	Gly	Ser	Pro	Arg	
145					150				155				160			
Thr	Gly	Gln	Ile	Phe	Lys	Gln	Thr	Tyr	Ser	Lys	Phe	Asp	Thr	Asn	Ser	
				165				170				175				
His	Asn	Asp	Asp	Ala	Leu	Leu	Lys	Asn	Tyr	Gly	Leu	Leu	Tyr	Cys	Phe	
				180				185				190				
Arg	Lys	Asp	Met	Asp	Lys	Val	Glu	Thr	Phe	Leu	Arg	Ile	Val	Gln	Cys	
				195				200				205				
Arg	Ser	Val	Glu	Gly	Ser	Cys	Gly	Phe	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys	Ala	Pro	

210	215	220
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr		
225	230	235
Pro Ile Leu Pro Gln		240
	245	
<210> 10		
<211> 273		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> hGH-CTP-CTP		
<400> 10		
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu		
1	5	10
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile Pro Leu		15
	20	25
Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln		30
	35	40
Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys		45
	50	55
Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe		60
65	70	75
Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys		80
	85	90
Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp		95
	100	105
Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val		110
	115	120
Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu		125
	130	135
Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg		140
145	150	155
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser		160
	165	170
His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe		175
	180	185
Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys		190
	195	200
Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro		205

210	215	220
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr		
225	230	235
Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu		240
245	250	255
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro		
260	265	270
Gln		
<210> 11		
<211> 301		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> CTP-hGH-CTP-CTP		
<400> 11		
Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu		
1	5	10
Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala		
20	25	30
Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp		
35	40	45
Thr Pro Ile Leu Pro Gln Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe		
50	55	60
Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp		
65	70	75
Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr		
85	90	95
Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile		
100	105	110
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu		
115	120	125
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val		
130	135	140
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser		
145	150	155
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln		
165	170	175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile		
180	185	190

Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 195 200 205
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270
 Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser
 275 280 285
 Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 290 295 300
 <210> 12
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 截短的-CTP-hGH-CTP-CTP
 <400> 12
 Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15
 Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Ser Ser Ser Ser Lys Ala
 20 25 30
 Pro Pro Pro Ser Leu Pro Phe Pro Thr Ile Pro Leu Ser Arg Leu Phe
 35 40 45
 Asp Asn Ala Met Leu Arg Ala His Arg Leu His Gln Leu Ala Phe Asp
 50 55 60
 Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr
 65 70 75 80
 Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile
 85 90 95
 Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 100 105 110
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 115 120 125
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 130 135 140

Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln			
145	150	155	160
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile			
	165	170	175
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp			
	180	185	190
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met			
	195	200	205
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu			
210	215	220	
Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu			
225	230	235	240
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro			
	245	250	255
Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser			
	260	265	270
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln			
275	280	285	

<210> 13

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-hGH-CTP

<400> 13

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

Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu
 115 120 125
 Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val
 130 135 140
 Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln
 165 170 175
 Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile
 180 185 190
 Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
 195 200 205
 Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met
 210 215 220
 Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu
 225 230 235 240
 Gly Ser Cys Gly Phe Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 245 250 255
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 260 265 270

Gln

<210> 14

<211> 245

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GH-CTP

<400> 14

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

85	90	95
Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln Thr	Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile	
100	105	110
Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu		
115	120	125
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val		
130	135	140
Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser		
145	150	155
Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln		
165	170	175
Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile		
180	185	190
Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp		
195	200	205
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met		
210	215	220
Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu		
225	230	235
Gly Ser Cys Gly Phe		240
245		

<210> 15

<211> 853

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-hGH-CTP

<400> 15

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctcttcttct aaggctccac ccccatctct 120
gccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacacce attctgcccc agttccccac 180
catccccctg agcaggtgtg tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240
ggcctttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300
cttcctgcag aacccccaga cctcctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360
cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420
ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctggtgta 480
cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540
cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600
cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctg ctgaagaact acgggctgct 660

gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720
 aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780
 ctccccaaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgcctcagt gatgaaggtc 840
 tggatgcggc cgc 853

<210> 16

<211> 937

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-hGH-CTP-CTP

<400> 16

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctttctct aaggtccac ccccatctct 120
 gccagcccc agcagactgc cgggccccag cgacacacc attctgcccc agttccccac 180
 catccccctg agcaggctgt tcgacaacgc catgctgagg gctcacaggc tgcaccagct 240
 ggcccttgac acctaccagg agttcgagga agcctacatc cccaaggagc agaagtacag 300
 ctctctgcag aacccccaga cctccctgtg cttcagcgag agcatcccca cccccagcaa 360
 cagagaggag acccagcaga agagcaacct ggagctgctg aggatctccc tgctgctgat 420
 ccagagctgg ctggagcccc tgcagttcct gagaagcgtg ttcgccaaca gcctgggtgta 480
 cggcgccagc gacagcaacg tgtacgacct gctgaaggac ctggaggagg gcatccagac 540
 cctgatgggc cggctggagg acggcagccc caggaccggc cagatcttca agcagacct 600
 cagcaagttc gacaccaaca gccacaacga cgacgcctg ctgaagaact acgggctgct 660
 gtactgcttc agaaaggaca tggacaaggt ggagaccttc ctgaggatcg tgcagtgcag 720
 aagcgtggag ggcagctgcg gcttcagctc cagcagcaag gcccctcccc cgagcctgcc 780
 ctccccaaagc aggctgcctg ggccctccga cacaccaatc ctgccacaga gcagctcctc 840
 taaggccccct cctccatccc tgccatcccc ctccggctg cctggccccct ctgacacccc 900
 tatcctgcct cagtgatgaa ggtctggatg cggccgc 937

<210> 17

<211> 889

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-hGH-CTP-CTP

<400> 17

tctagaggac atggccaccg gcagcaggac cagcctgctg ctggccttcg gcctgctgtg 60
 cctgccatgg ctgcaggagg gcagcgccag ctctttctct aaggtccac ccccgagcct 120
 gcccttcccc accatcccc tgagcaggct gtctgacaac gccatgctga gggctcacag 180
 gctgcaccag ctggccttg acacctacca ggagttcgag gaagcctaca tccccaaaga 240
 gcagaagtac agcttcctgc agaaccccc gacctcctg tgcttcagcg agagcatccc 300

cacccccagc aacagagagg agaccagca gaagagcaac ctggagctgc ttaggatctc 360
cctgctgctg atccagagct ggctggagcc cgtgcagttc ctgagaagcg tgttcgcca 420
cagcctgggtg tacggcgcca gcgacagcaa cgtgtacgac ctgctgaagg acctggagga 480
gggcatccag accctgatgg gccggctgga ggacggcagc cccaggaccg gccagatctt 540
caagcagacc tacagcaagt tcgacaccaa cagccacaac gacgacgccc tgctgaagaa 600
ctacgggctg ctgtactgct tcagaaagga catggacaag gtggagacct tcctgaggat 660
cgtgcagtg cagaagcgtgg agggcagctg cggcttcagc tccagcagca agggccctcc 720
cccagacctg ccctcccca gacagctgcc tgggccctcc gacacaccaa tcctgccaca 780
gagcagctcc tctaaggccc ctctccatc cctgccatcc ccctcccggc tgcttgccc 840
ctctgacacc cctatcctgc ctcatgatg aaggtctgga tgcggccgc 889

<210> 18

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 胃酸调节素

<400> 18

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

<210> 19

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EPO肽

<400> 19

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

65	70	75	80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu			
	85	90	95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser			
	100	105	110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly			
	115	120	125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu			
	130	135	140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile			
145	150	155	160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu			
	165	170	175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp			
	180	185	190
Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser			
	195	200	205
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln			
	210	215	220
<210> 20			
<211> 249			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> EPO-CTP-CTP			
<400> 20			
Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu			
1	5	10	15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ala Pro Pro Arg Leu			
	20	25	30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu			
	35	40	45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu			
	50	55	60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg			
65	70	75	80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu			
	85	90	95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser			

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

100	105	110
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp	Gln Gly Leu Ala Leu Leu	Ser Glu Ala
115	120	125
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu	Leu Val Asn Ser Ser	Gln Pro Trp Glu
130	135	140
Pro Leu Gln Leu His Val Asp	Lys Ala Val Ser Gly Leu	Arg Ser Leu
145	150	155
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu	Gly Ala Gln Lys Glu Ala	Ile Ser Pro
165	170	175
Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala	Pro Leu Arg Thr Ile Thr	Ala Asp Thr
180	185	190
Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val	Tyr Ser Asn Phe Leu Arg	Gly Lys Leu
195	200	205
Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala	Cys Arg Thr Gly Asp Arg	Ser Ser Ser
210	215	220
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser	Leu Pro Ser Pro Ser Arg	Leu Pro Gly
225	230	235
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu	Pro Gln Ser Ser Ser Lys	Ala Pro
245	250	255
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro	Ser Arg Leu Pro Gly Pro	Ser Asp Thr
260	265	270
Pro Ile Leu Pro Gln		
275		
<210> 22		
<211> 387		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> EP0-CTP		
<400> 22		
Met Gly Val His Glu Cys Pro	Ala Trp Leu Trp Leu Leu	Ser Leu
1	5	10
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu	Pro Val Leu Gly Ala Pro	Pro Arg Leu
20	25	30
Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu	Glu Arg Tyr Leu Leu Glu	Ala Lys Glu
35	40	45
Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly	Cys Ala Glu His Cys Ser	Leu Asn Glu
50	55	60
Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr	Lys Val Asn Phe Tyr Ala	Trp Lys Arg

65	70	75	80
Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu			
	85	90	95
Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser			
	100	105	110
Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly			
	115	120	125
Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu			
	130	135	140
Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile			
145	150	155	160
Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu			
	165	170	175
Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp			
	180	185	190
Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser			
	195	200	205
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro			
	210	215	220
Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala			
225	230	235	240
Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu			
	245	250	255
Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp			
	260	265	270
Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu			
	275	280	285
Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn			
	290	295	300
Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val			
305	310	315	320
Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln			
	325	330	335
Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg			
	340	345	350
Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn			
	355	360	365
Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr			
	370	375	380

Gly Asp Arg

385

<210> 23

<211> 221

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-EP0

<400> 23

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys

20 25 30

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser

35 40 45

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser

50 55 60

Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile

65 70 75 80

Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val

85 90 95

Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly

100 105 110

Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala

115 120 125

Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu

130 135 140

Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu

145 150 155 160

Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro

165 170 175

Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr

180 185 190

Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu

195 200 205

Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg

210 215 220

<210> 24

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-EPO-CTP

<400> 24

```

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
1           5           10           15
Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
           20           25           30
Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
           35           40           45
Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser
           50           55           60
Arg Val Leu Glu Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile
65           70           75           80
Thr Thr Gly Cys Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val
           85           90           95
Pro Asp Thr Lys Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly
           100          105          110
Gln Gln Ala Val Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala
           115          120          125
Val Leu Arg Gly Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu
           130          135          140
Pro Leu Gln Leu His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu
145          150          155          160
Thr Thr Leu Leu Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro
           165          170          175
Pro Asp Ala Ala Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr
           180          185          190
Phe Arg Lys Leu Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu
           195          200          205
Lys Leu Tyr Thr Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser
           210          215          220
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
225          230          235          240
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
           245

```

<210> 25

<211> 193

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EP0

<400> 25

```

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

```

Arg

<210> 26

<211> 873

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> EP0-CTP-CTP

<400> 26

```

tctagagggtc atcatggggg tgcacgaatg tcttgctgg ctgtggcttc tctgtccct 60
tctgtcgctc cctctgggcc tcccagtcct gggctcctct tctcaaagg cccctcccc 120

```

gagccttcca agtccatccc gactcccggg gccctcggac accccaatat taccacaagc 180
 cccaccacgc ctcatctgtg acagccgagt cctggagagg tacctcttgg aggccaagga 240
 ggccgagaat atcacgacgg gctgtgctga aactgcagc ttgaatgaga atatcactgt 300
 cccagacacc aaagttaatt tctatgcctg gaagaggatg gaggtcgggc agcaggccgt 360
 agaagtctgg cagggcctgg ccctgctgtc ggaagctgtc ctgcggggcc aggccctgtt 420
 ggtcaactct tcccagccgt gggagcccct gcagctgcat gtggataaag ccgtcagtgg 480
 ccttcgcagc ctcaccactc tgcttcgggc tctgggagcc cagaaggaag ccatctcccc 540
 tccagatgcg gcctcagctg ctccactccg aacaatcact gctgacactt tccgcaaact 600
 cttccgagtc tactccaatt tcctccgggg aaagctgaag ctgtacacag gggaggcctg 660
 caggacaggg gacagatcct ctctctcaaa ggcccctccc ccgagccttc caagtccatc 720
 ccgactcccg gggcccctccg acacaccaat cctgccacag agcagctcct ctaaggcccc 780
 tcctccatcc ctgccatccc cctcccggct gcctggcccc tctgacaccc ctatcctgcc 840
 tcagtgatga aggtcttctg gatccgcggc cgc 873

<210> 27

<211> 187

<212> PRT

<213> 智人

<400> 27

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

	165	170	175
Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn			
180	185		
<210> 28			
<211> 589			
<212> DNA			
<213> 智人			
<400> 28			
tctagaggac atgaccaaca agtgctgtct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60			
caccgccctg agcatgagct acaacctgct gggcttcttg cagaggtcca gcaacttcca 120			
gtgccagaag ctgctgtggc agctgaacgg caggttgaa tactgcctga aggacaggat 180			
gaacttcgac atcccagagg aaatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 240			
cctgaccatc tacgagatgc tgcagaacat cttcgccatc ttcaggcagg acagcagcag 300			
caccggctgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc aacgtgtacc accagatcaa 360			
ccacctgaaa accgtgctgg aagagaagct ggaaaaggag gacttcacca ggggcaagct 420			
gatgagcagc ctgcacctga agaggtacta cggcagaatc ctgcactacc tgaaggccaa 480			
ggagtacagc cactgcgcct ggaccatcgt gaggttgag atcctgagga acttctactt 540			
catcaacagg ctgaccggct acctgaggaa ctgatgagtc cgcggccgc 589			
<210> 29			
<211> 211			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 干扰素			
<400> 29			
Thr Phe Leu Gln Pro Phe Glu Ala Phe Ala Leu Ala Gln Gln Val Val			
1 5 10 15			
Gly Asp Thr Val Arg Val Val Asn Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln			
20 25 30			
Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser Thr Thr Ala Leu Ser Met Ser Tyr			
35 40 45			
Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys			
50 55 60			
Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg			
65 70 75 80			
Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln			
85 90 95			
Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe			
100 105 110			

Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile
115 120 125
Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys
130 135 140
Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys
145 150 155 160
Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His
165 170 175
Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg
180 185 190
Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr
195 200 205
Leu Arg Asn
210

<210> 30

<211> 639

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 干扰素

<400> 30

```

acattctaac tgcaaccttt cgaagccttt gctctggcac aacaggtagt aggcgacact 60
gttcgtgttg tcaacatgac caacaagtgt ctctccaaa ttgctctcct gttgtgcttc 120
tccactacag ctctttccat gagctacaac ttgcttggat tcctacaaag aagcagcaat 180
tttcagtgtc agaagctcct gtggcaattg aatgggaggc ttgaatactg cctcaaggac 240
aggatgaact ttgacatccc tgaggagatt aagcagctgc agcagttcca gaaggaggac 300
gccgcattga ccatctatga gatgctccag aacatctttg ctattttcag acaagattca 360
tctagcactg gctggaatga gactattgtt gagaacctcc tggctaattg ctatcatcag 420
ataaaccatc tgaagacagt cctggaagaa aaactggaga aagaagattt caccagggga 480
aaactcatga gcagtctgca cctgaaaaga tattatggga ggattctgca ttacctgaag 540
gccaaggagt acagtcaactg tgcttgacc atagtcagag tggaaatcct aaggaacttt 600
tacttcatta acagacttac aggttacctc cgaaactga 639

```

<210> 31

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IFN-CTP

<400> 31

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

<210> 32

<211> 661

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IFN-CTP

<400> 32

tctagaggac atgaccaaca agtgctgtgt gcagatcgcc ctgctgtgtgt gcttcagcac 60
 caccgccctg agcatgagct acaacctgtt gggcttctg cagaggtcca gcaacttcca 120
 gtgccagaag ctgctgtggc agctgaacgg caggctggaa tactgcctga aggacaggat 180
 gaacttcgac atcccagagg aaatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 240

cctgaccatc tacgagatgc tgcagaacat cttcgccatc ttcaggcagg acagcagcag 300
 caccggctgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc aacgtgtacc accagatcaa 360
 ccacctgaaa accgtgctgg aagagaagct ggaaaaggag gacttcacca ggggcaagct 420
 gatgagcagc ctgcacctga agaggtacta cggcagaatc ctgcactacc tgaaggccaa 480
 ggagtacagc cactgcgctt ggaccatcgt gaggggtggag atcctgagga acttctactt 540
 catcaacagg ctgaccggct acctgaggaa cagctccagc agcaaggccc ctccaccttc 600
 cctgcccagt ccaagccgac tccctgggcc ctccgataca ccaattctgc cacagtgatg 660
 a 661

<210> 33

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IFN-CTP-CTP

<400> 33

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

Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 195 200 205
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
 210 215 220
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
 225 230 235 240

Leu Pro Gln

<210> 34

<211> 765

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> IFN-CTP-CTP

<400> 34

tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60
 caccgccctg agcatgagct acaacctgct gggcttcctg cagaggtcca gcaacttcca 120
 gtgccagaag ctgctgtggc agctgaacgg caggctggaa tactgcctga aggacaggat 180
 gaacttcgac atcccagagg aaatcaagca gctgcagcag ttccagaagg aggacgccgc 240
 cctgaccatc tacgagatgc tgcagaacat cttcgccatc ttcaggcagg acagcagcag 300
 caccggctgg aacgagacca tcgtggagaa cctgctggcc aacgtgtacc accagatcaa 360
 ccacctgaaa accgtgctgg aagagaagct ggaaaaggag gacttcacca ggggcaagct 420
 gatgagcagc ctgcacctga agaggtacta cggcagaatc ctgcactacc tgaaggccaa 480
 ggagtacagc cactgcgctt ggaccatcgt gaggtggag atcctgagga acttctactt 540
 catcaacagg ctgaccggct acctgaggaa cagctccagc agcaaggccc ctccaccttc 600
 cctgcccagt ccaagccgac tccctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag 660
 ctctcttaag gcccctcctc catccctgcc atccccctcc cggctgcctg gcccctctga 720
 caccctatc ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgcg gccgc 765

<210> 35

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN-CTP-CTP

<400> 35

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

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

<210> 36

<211> 849

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN-CTP-CTP

<400> 36

tctagaggac atgaccaaca agtgctgtgt gcagatcgcc ctgctgtgtgt gcttcagcac 60
 caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccaccccc agcctgcccc gccccagcag 120
 actgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180

cctgcagagg tccagcaact tccagtgcc gaagctgctg tggcagctga acggcaggct 240
 ggaatactgc ctgaaggaca ggatgaactt cgacatccca gaggaaatca agcagctgca 300
 gcagttccag aaggaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360
 catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420
 ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480
 ggaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540
 aatcctgcac tacctgaagg ccaaggagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600
 ggagatcctg aggaacttct acttcatcaa caggetgacc ggctacctga ggaacagctc 660
 cagcagcaag gcccctccac ctccctgcc cagtccaagc cgactccctg ggcccctcca 720
 cacaccaatc ctgccacaga gcagctcttc taaggccctt cctccatccc tgccatcccc 780
 ctcccggctg cctggccctt ctgacacccc tatectgctt cagtgatgaa ggtctggatc 840
 cgcggccgc 849

<210> 37

<211> 409

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN (CTP)

<400> 37

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

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

<210> 38

<211> 1261

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN (CTP)

<400> 38

tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60
 caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccaccccc agcctgcccc gccccagcag 120
 gctgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180
 cctgcagagg tccagcaact tccagtgcc gaaactgctg tggcagctga acggcaggct 240
 ggaatactgc ctgaaggacc ggatgaactt cgacatcccc gaagagatca agcagctgca 300
 gcagttccag aaagaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360
 catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaactgtct 420
 ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480
 agaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540
 aatcctgcac tacctgaagg ccaaagagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600
 ggagatcctg cggaacttct acttcatcaa caggetgacc ggctacctga ggaacagctc 660
 cagcagcaag gcccctccac cctccctgcc ctccccaage agactgcccg gaccctccga 720
 cacaccaatt ctgccacaga tgtcctacaa tctgctcgga tttctgcagc gctcctccaa 780
 ctttcagtgt cagaagctcc tctggcagct caatggccgc ctggaatatt gtctgaaaga 840
 cagaatgaat tttgacatcc cagaggaaat taaacagctc cagcagtttc agaaagaaga 900
 tgctgctctc acaatctatg aaatgctcca gaatatcttt gcaatctttc gccaggacag 960
 ctccctccacc ggggtggaatg agacaattgt cgagaatctg ctgcaccaatg tctatcatca 1020
 gatcaatcac ctcaagacag tcctcgaaga aaaactcgaa aaagaagatt tcacacgcgg 1080
 caaactgatg tcctccctgc atctgaagcg ctactatggg cgcacacctgc attatctgaa 1140
 agctaaagaa tactcccact gtgcttgac aattgtgcgc gtcgagatcc tgagaaactt 1200
 ttattttcatt aaccgcctga caggatacct gcgcaactga tgaaggtctg gatgcggccc 1260
 c 1261

<210> 39

<211> 215

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN

<400> 39

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

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

<210> 40

<211> 673

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN

<400> 40

tctagaggac atgaccaaca agtgctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60
 caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccaccccc agcctgcccc gccccagcag 120
 gctgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180
 cctgcagagg tccagcaact tccagtgcc gaaactgctg tggcagctga acggcaggct 240
 ggaatactgc ctgaaggacc ggatgaactt cgacatcccc gaagagatca agcagctgca 300
 gcagttccag aaagaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360
 catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420
 ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480
 agaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540
 aatcctgcac tacctgaagg ccaaagagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600
 ggagatcctg cggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaactgatg 660
 agtccgcggc cgc 673

<210> 41

<211> 243

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN-CTP

<400> 41

```

Met Thr Asn Lys Cys Leu Leu Gln Ile Ala Leu Leu Leu Cys Phe Ser
1           5           10           15
Thr Thr Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
          20           25           30
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
          35           40           45
Gln Met Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe
          50           55           60
Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys
65           70           75           80
Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu
          85           90           95
Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu
          100          105          110
Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp
          115          120          125
Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile
          130          135          140
Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe
145          150          155          160
Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly
          165          170          175
Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp
          180          185          190
Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg
          195          200          205
Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
          210          215          220
Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
225          230          235          240
Leu Pro Gln

```

<210> 42

<211> 763

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-IFN-CTP

<400> 42

```
tctagaggac atgaccaaca agtgcctgct gcagatcgcc ctgctgctgt gcttcagcac 60
caccgccctg agcagcagca gctccaaggc cccaccccc agcctgcccc gccccagcag 120
actgccaggc cccagcgaca cccccatcct gccccagatg agctacaacc tgctgggctt 180
cctgcagagg tccagcaact tccagtgcc gaagctgctg tggcagctga acggcaggct 240
ggaataactgc ctgaaggaca ggatgaactt cgacatccca gaggaaatca agcagctgca 300
gcagttccag aaggaggacg ccgccctgac catctacgag atgctgcaga acatcttcgc 360
catcttcagg caggacagca gcagcaccgg ctggaacgag accatcgtgg agaacctgct 420
ggccaacgtg taccaccaga tcaaccacct gaaaaccgtg ctggaagaga agctggaaaa 480
ggaggacttc accaggggca agctgatgag cagcctgcac ctgaagaggt actacggcag 540
aatcctgcac tacctgaagg ccaaggagta cagccactgc gcctggacca tcgtgagggt 600
ggagatcctg aggaacttct acttcatcaa caggctgacc ggctacctga ggaacagctc 660
cagcagcaag gcccctccac cttccctgcc cagtccaagc cgactccctg ggccctccga 720
tacaccaatt ctgccacagt gatgaaggtc tggatgcggc cgc 763
```

<210> 43

<211> 166

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IFN- β

<400> 43

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

115	120	125
Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr		
130	135	140
Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu		
145	150	155
Thr Gly Tyr Leu Arg Asn		160
165		
<210> 44		
<211> 242		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> AP0-A1		
<400> 44		
Asp Glu Pro Pro Gln Ser Pro Trp Asp Arg Val Lys Asp Lys Ala Thr		
1	5	10
Val Tyr Val Asp Val Leu Lys Asp Ser Gly Arg Asp Tyr Val Ser Gln		
20	25	30
Phe Glu Gly Ser Ala Gly Lys Gly Leu Asn Leu Lys Leu Leu Asp Asn		
35	40	45
Trp Asp Ser Val Thr Ser Thr Phe Ser Lys Leu Arg Glu Gln Leu Gly		
50	55	60
Pro Val Thr Gln Glu Phe Trp Asp Asn Leu Glu Lys Glu Thr Glu Gly		
65	70	75
Leu Arg Gly Glu Met Ser Lys Asp Leu Glu Glu Val Lys Ala Lys Val		
85	90	95
Gln Pro Tyr Leu Asp Asp Phe Gln Lys Lys Trp Gln Glu Glu Met Glu		
100	105	110
Leu Tyr Arg Gln Lys Val Glu Pro Leu Arg Ala Glu Leu Gln Glu Gly		
115	120	125
Ala Arg Gln Lys Leu His Glu Leu Gln Glu Lys Leu Ser Pro Leu Gly		
130	135	140
Glu Glu Met Arg Asp Arg Ala Arg Ala His Val Asp Ala Leu Arg Thr		
145	150	155
His Leu Ala Pro Tyr Ser Asp Glu Leu Arg Gln Arg Leu Ala Ala Arg		
165	170	175
Leu Glu Ala Leu Lys Glu Asn Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His		
180	185	190
Ala Lys Ala Thr Glu His Leu Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro		

195	200	205
Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe		
210	215	220
Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn		
225	230	235
240		
Thr Gln		
<210> 45		
<211> 444		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 45		
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln		
1	5	10
15		
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val		
20	25	30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro		
35	40	45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu		
50	55	60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile		
65	70	75
80		
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly		
85	90	95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro		
100	105	110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile		
115	120	125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr		
130	135	140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala		
145	150	155
160		
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile		
165	170	175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val		
180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220

Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg			
225	230	235	240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly			
	245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr			
	260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln			
	275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg			
	290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser			
305	310	315	320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met			
	325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser			
	340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala			
	355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly			
	370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val			
385	390	395	400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr			
	405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu			
	420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro			
	435	440	
<210> 46			
<211> 448			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 46			
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln			
1	5	10	15
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val			
	20	25	30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro			
	35	40	45

Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu		
50	55	60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile		
65	70	75 80
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly		
85	90	95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro		
100	105	110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile		
115	120	125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr		
130	135	140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala		
145	150	155 160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile		
165	170	175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val		
180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235 240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315 320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		

355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Gly Cys Gly Arg		
435	440	445

<210> 47

<211> 1356

<212> DNA

<213> 智人

<400> 47

```

ctcaggagaca tggctctccca ggccctcagg ctctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60
tgcctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180
gagcagtgct ccttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360
aactgtgaga cgacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480
ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660
gggacctga tcaacaccat ctgggtgggc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780
gagcagagcc ggcggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840
aaccacgaca tcgcgtgct ccgctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900
cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatgggc 1020
ctcaactgac cccggctgat gaccaggac tgctgcagc agtcacgga ggtgggagac 1080
tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggtact cggatggcag caaggactcc 1140
tgcaaggggg acagtggagg cccacatgcc acccactacc ggggcacgtg gtacctgacg 1200
ggcatcgta gctggggcca gggctgcgca accgtgggcc actttggggt gtacaccagg 1260
gtctcccagt acatcgagt gctgcaaaag ctcatgcgt cagagccacg cccaggagtc 1320
ctctgcgag cccatttcc ctgaggatgc ggccgc 1356

```

<210> 48

<211> 1442

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子VII-CTP

<400> 48

```

ctcgaggaca tggctctccca ggccctcagg ctctctctgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60
tgcctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180
gagcagtgtc ctttcgagga ggcccgggag atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240
ttctggattt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcttctgcc tccctgcctt cgagggccgg 360
aactgtgaga cgacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccaag cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480
ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660
gggacctga tcaacaccat ctgggtgtgc tccgcggccc actgtttcga caaatcaag 720
aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780
gagcagagcc ggcgggtggc gcaggtcatc atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840
aaccacgaca tcgcgctgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900
cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960
ttggtcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020
ctcaacgtgc ccggtgat gaccaggac tgctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080
tcccaaata tcacggagta catgttctgt gccggctact cggatggcag caaggactcc 1140
tgcaaggggg acagtggagg ccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200
ggcatcgtga gctggggcca gggctgcgcc accgtgggcc acttcggcgt gtacaccagg 1260
gtgtcccagt acatcgagtg gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320
ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctccccctag cctgccagc 1380
cctagcagac tgcctgggcc cagcgacacc cccatcctgc ccagtgagg atccgcggcc 1440
gc 1442

```

<210> 49

<211> 472

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子VII-CTP

<400> 49

Met	Val	Ser	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Gly	Leu	Gln
1				5					10					15	
Gly	Cys	Leu	Ala	Ala	Val	Phe	Val	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala	His	Gly	Val
			20					25					30		
Leu	His	Arg	Arg	Arg	Arg	Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Glu	Glu	Leu	Arg	Pro
		35					40						45		
Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys	Lys	Glu	Glu	Gln	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu
		50				55					60				
Ala	Arg	Glu	Ile	Phe	Lys	Asp	Ala	Glu	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile
65					70					75					80
Ser	Tyr	Ser	Asp	Gly	Asp	Gln	Cys	Ala	Ser	Ser	Pro	Cys	Gln	Asn	Gly
			85						90					95	
Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Gln	Leu	Gln	Ser	Tyr	Ile	Cys	Phe	Cys	Leu	Pro
			100					105					110		
Ala	Phe	Glu	Gly	Arg	Asn	Cys	Glu	Thr	His	Lys	Asp	Asp	Gln	Leu	Ile
			115					120					125		
Cys	Val	Asn	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Glu	Gln	Tyr	Cys	Ser	Asp	His	Thr
			130				135					140			
Gly	Thr	Lys	Arg	Ser	Cys	Arg	Cys	His	Glu	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Ala
145					150					155					160
Asp	Gly	Val	Ser	Cys	Thr	Pro	Thr	Val	Glu	Tyr	Pro	Cys	Gly	Lys	Ile
					165					170				175	
Pro	Ile	Leu	Glu	Lys	Arg	Asn	Ala	Ser	Lys	Pro	Gln	Gly	Arg	Ile	Val
			180						185					190	
Gly	Gly	Lys	Val	Cys	Pro	Lys	Gly	Glu	Cys	Pro	Trp	Gln	Val	Leu	Leu
			195				200					205			
Leu	Val	Asn	Gly	Ala	Gln	Leu	Cys	Gly	Gly	Thr	Leu	Ile	Asn	Thr	Ile
			210				215					220			
Trp	Val	Val	Ser	Ala	Ala	His	Cys	Phe	Asp	Lys	Ile	Lys	Asn	Trp	Arg
225					230					235					240
Asn	Leu	Ile	Ala	Val	Leu	Gly	Glu	His	Asp	Leu	Ser	Glu	His	Asp	Gly
					245					250				255	
Asp	Glu	Gln	Ser	Arg	Arg	Val	Ala	Gln	Val	Ile	Ile	Pro	Ser	Thr	Tyr
			260					265						270	
Val	Pro	Gly	Thr	Thr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Arg	Leu	His	Gln
			275					280					285		
Pro	Val	Val	Leu	Thr	Asp	His	Val	Val	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Glu	Arg
			290				295				300				
Thr	Phe	Ser	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Val	Arg	Phe	Ser	Leu	Val	Ser

305	310	315	320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met			
	325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser			
	340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala			
	355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly			
	370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val			
385	390	395	400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr			
	405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu			
	420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser			
	435	440	445
Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro			
	450	455	460
Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln			
465	470		

<210> 50

<211> 1535

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子VII-CTP-CTP

<400> 50

```

ctcaggagaca tggctctccca ggccctcagg ctctcttgcc ttctgcttgg gcttcagggc 60
tgccctggctg cagtcttcgt aaccaggag gaagcccacg gcgtcctgca ccggcgccgg 120
cgcgccaacg cgttcctgga ggagctgcgg ccgggctccc tggagaggga gtgcaaggag 180
gagcagtgtc ctttcgagga ggcccgagg atcttcaagg acgcggagag gacgaagctg 240
ttctggatatt cttacagtga tggggaccag tgtgcctcaa gtccatgcca gaatgggggc 300
tcctgcaagg accagctcca gtcctatata tgcctctgccc tccctgcctt cgaggggccg 360
aactgtgaga cgacaagga tgaccagctg atctgtgtga acgagaacgg cggctgtgag 420
cagtactgca gtgaccacac gggcaccacg cgctcctgtc ggtgccacga ggggtactct 480
ctgctggcag acgggggtgc ctgcacaccc acagttgaat atccatgtgg aaaaatacct 540
attctagaaa aaagaaatgc cagcaaacc caaggccgaa ttgtgggggg caaggtgtgc 600
cccaaagggg agtgtccatg gcaggtcctg ttgttggtga atggagctca gttgtgtggg 660

```

gggaccctga tcaacaccat ctgggtggtc tccgcggccc actgtttcga caaaatcaag 720
 aactggagga acctgatcgc ggtgctgggc gagcacgacc tcagcgagca cgacggggat 780
 gagcagagcc ggcggggtggc gcaggtcac atccccagca cgtacgtccc gggcaccacc 840
 aaccacgaca tcgcgtgct ccgcctgcac cagcccgtgg tcctcactga ccatgtggtg 900
 cccctctgcc tgcccgaacg gacgttctct gagaggacgc tggccttcgt gcgcttctca 960
 ttggctcagcg gctggggcca gctgctggac cgtggcgcca cggccctgga gctcatggtc 1020
 ctcaacgtgc cccggctgat gaccaggac tgcctgcagc agtcacggaa ggtgggagac 1080
 tccccaaata tcacggagta catgttctgt gccggtact cggatggcag caaggactcc 1140
 tgcaaggggg acagtggagg ccacatgcc accactacc ggggcacgtg gtacctgacc 1200
 ggcacgtga gctggggcca gggctgcgc accgtgggcc atttcggcgt gtacaccagg 1260
 gtgtcccagt acatcgagt gctgcagaaa ctgatgagaa gcgagcccag acccggcgtg 1320
 ctgctgagag ccccttccc cagcagcagc tccaaggccc ctcccctag cctgcccagc 1380
 cctagcagac tgctgggcc ctccgacaca ccaatctgc cacagagcag ctctctaaag 1440
 gcccctctc catccctgcc atccccctc cggtgccag gcccctctga caccctatc 1500
 ctgcctcagt gatgaaggtc tggatccgc gccgc 1535

<210> 51

<211> 500

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子VII-CTP-CTP

<400> 51

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

130	135	140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala		
145	150	155
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile		160
165	170	175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val		
180	185	190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser		
435	440	445

Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro
 450 455 460
 Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro
 465 470 475 480
 Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro
 485 490 495
 Ile Leu Pro Gln
 500

<210> 52

<211> 528

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子VII-CTP-CTP-CTP

<400> 52

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

Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu		
195	200	205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile		
210	215	220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg		
225	230	235 240
Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315 320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395 400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser		
435	440	445
Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro		
450	455	460
Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro		
465	470	475 480
Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro		
485	490	495
Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro		

	500		505		510
Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln					
	515		520		525
<210> 53					
<211> 556					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 因子VII-CTP-CTP-CTP-CTP					
<400> 53					
Met Val Ser Gln Ala Leu Arg Leu Leu Cys Leu Leu Leu Gly Leu Gln					
1	5		10		15
Gly Cys Leu Ala Ala Val Phe Val Thr Gln Glu Glu Ala His Gly Val					
	20		25		30
Leu His Arg Arg Arg Arg Ala Asn Ala Phe Leu Glu Glu Leu Arg Pro					
	35		40		45
Gly Ser Leu Glu Arg Glu Cys Lys Glu Glu Gln Cys Ser Phe Glu Glu					
	50		55		60
Ala Arg Glu Ile Phe Lys Asp Ala Glu Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile					
65	70		75		80
Ser Tyr Ser Asp Gly Asp Gln Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly					
	85		90		95
Gly Ser Cys Lys Asp Gln Leu Gln Ser Tyr Ile Cys Phe Cys Leu Pro					
	100		105		110
Ala Phe Glu Gly Arg Asn Cys Glu Thr His Lys Asp Asp Gln Leu Ile					
	115		120		125
Cys Val Asn Glu Asn Gly Gly Cys Glu Gln Tyr Cys Ser Asp His Thr					
	130		135		140
Gly Thr Lys Arg Ser Cys Arg Cys His Glu Gly Tyr Ser Leu Leu Ala					
145	150		155		160
Asp Gly Val Ser Cys Thr Pro Thr Val Glu Tyr Pro Cys Gly Lys Ile					
	165		170		175
Pro Ile Leu Glu Lys Arg Asn Ala Ser Lys Pro Gln Gly Arg Ile Val					
	180		185		190
Gly Gly Lys Val Cys Pro Lys Gly Glu Cys Pro Trp Gln Val Leu Leu					
	195		200		205
Leu Val Asn Gly Ala Gln Leu Cys Gly Gly Thr Leu Ile Asn Thr Ile					
	210		215		220
Trp Val Val Ser Ala Ala His Cys Phe Asp Lys Ile Lys Asn Trp Arg					

225	230	235	240
Asn Leu Ile Ala Val	Leu Gly Glu His Asp	Leu Ser Glu His Asp	Gly
245	250	255	
Asp Glu Gln Ser Arg Arg	Val Ala Gln Val Ile Ile	Pro Ser Thr Tyr	
260	265	270	
Val Pro Gly Thr Thr	Asn His Asp Ile Ala Leu Leu	Arg Leu His Gln	
275	280	285	
Pro Val Val Leu Thr	Asp His Val Val Pro Leu Cys	Leu Pro Glu Arg	
290	295	300	
Thr Phe Ser Glu Arg Thr	Leu Ala Phe Val Arg Phe	Ser Leu Val Ser	
305	310	315	320
Gly Trp Gly Gln Leu Leu	Asp Arg Gly Ala Thr Ala	Leu Glu Leu Met	
325	330	335	
Val Leu Asn Val Pro Arg	Leu Met Thr Gln Asp Cys	Leu Gln Gln Ser	
340	345	350	
Arg Lys Val Gly Asp Ser	Pro Asn Ile Thr Glu Tyr	Met Phe Cys Ala	
355	360	365	
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser	Lys Asp Ser Cys Lys Gly	Asp Ser Gly Gly	
370	375	380	
Pro His Ala Thr His Tyr	Arg Gly Thr Trp Tyr Leu	Thr Gly Ile Val	
385	390	395	400
Ser Trp Gly Gln Gly Cys	Ala Thr Val Gly His Phe	Gly Val Tyr Thr	
405	410	415	
Arg Val Ser Gln Tyr Ile	Glu Trp Leu Gln Lys Leu	Met Arg Ser Glu	
420	425	430	
Pro Arg Pro Gly Val Leu	Leu Arg Ala Pro Phe Pro	Ser Ser Ser Ser	
435	440	445	
Lys Ala Pro Pro Pro Ser	Leu Pro Ser Pro Ser Arg	Leu Pro Gly Pro	
450	455	460	
Ser Asp Thr Pro Ile Leu	Pro Gln Ser Ser Ser Ser	Lys Ala Pro Pro	
465	470	475	480
Pro Ser Leu Pro Ser Pro	Ser Arg Leu Pro Gly Pro	Ser Asp Thr Pro	
485	490	495	
Ile Leu Pro Gln Ser Ser	Ser Ser Lys Ala Pro Pro	Pro Ser Leu Pro	
500	505	510	
Ser Pro Ser Arg Leu Pro	Gly Pro Ser Asp Thr Pro	Ile Leu Pro Gln	
515	520	525	
Ser Ser Ser Ser Lys Ala	Pro Pro Pro Ser Leu	Pro Ser Pro Ser Arg	
530	535	540	

225 230 235 240

Asn Leu Ile Ala Val Leu Gly Glu His Asp Leu Ser Glu His Asp Gly		
245	250	255
Asp Glu Gln Ser Arg Arg Val Ala Gln Val Ile Ile Pro Ser Thr Tyr		
260	265	270
Val Pro Gly Thr Thr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Arg Leu His Gln		
275	280	285
Pro Val Val Leu Thr Asp His Val Val Pro Leu Cys Leu Pro Glu Arg		
290	295	300
Thr Phe Ser Glu Arg Thr Leu Ala Phe Val Arg Phe Ser Leu Val Ser		
305	310	315
Gly Trp Gly Gln Leu Leu Asp Arg Gly Ala Thr Ala Leu Glu Leu Met		
325	330	335
Val Leu Asn Val Pro Arg Leu Met Thr Gln Asp Cys Leu Gln Gln Ser		
340	345	350
Arg Lys Val Gly Asp Ser Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Met Phe Cys Ala		
355	360	365
Gly Tyr Ser Asp Gly Ser Lys Asp Ser Cys Lys Gly Asp Ser Gly Gly		
370	375	380
Pro His Ala Thr His Tyr Arg Gly Thr Trp Tyr Leu Thr Gly Ile Val		
385	390	395
Ser Trp Gly Gln Gly Cys Ala Thr Val Gly His Phe Gly Val Tyr Thr		
405	410	415
Arg Val Ser Gln Tyr Ile Glu Trp Leu Gln Lys Leu Met Arg Ser Glu		
420	425	430
Pro Arg Pro Gly Val Leu Leu Arg Ala Pro Phe Pro Ser Ser Ser Ser		
435	440	445
Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro		
450	455	460
Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro		
465	470	475
Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro		
485	490	495
Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro		
500	505	510
Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln		
515	520	525
Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg		
530	535	540
Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser		

545	550	555	560
Lys Ala Pro Pro Pro	Ser Leu Pro Ser Pro	Ser Arg Leu Pro	Gly Pro
	565	570	575
Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln			
580			

<210> 55

<211> 1404

<212> DNA

<213> 智人

<400> 55

```

gcgatcgcca tgcagcgcg t gaacatgatc atggcagaat caccaggcct catcaccatt 60
gccttttagg atatctactc agtgetgaat gtacagtttt tcttgatcat gaaaacgcca 120
acaaaattct gaatcggcca aagaggtata attcaggtaa attggaagag tttgttcaag 180
ggaaccttga gagagaatgt atggaagaaa agtgtagttt tgaagaagca cgagaagttt 240
ttgaaaacac tgaaagaaca actgaatttt ggaagcagta tgttgatgga gatcagtgtg 300
agtccaatcc atgtttaaat ggcggcagtt gcaaggatga cattaattcc tatgaatgtt 360
gggtgtccctt tggatttgaa ggaaagaact gtgaattaga tgtaacatgt aacattaaga 420
atggcagatg cgagcagttt tgtaaaaata gtgctgataa caaggtggtt tgctcctgta 480
ctgagggata tcgacttgca gaaaaccaga agtcctgtga accagcagtg ccatttccat 540
gtggaagagt ttctgtttca caaacttcta agctcacccg tgctgagact gtttttctg 600
atgtggacta tgtaaatctt actgaagctg aaaccatttt ggataacatc actcaaagca 660
cccaatcatt taatgacttc actcgagttg ttgggtggaga agatgccaaa ccaggtcaat 720
tcccttggca gggtgttttg aatggtaaag ttgatgcatt ctgtggaggc tctatcgta 780
atgaaaaatg gattgtaact gctgcccact gtgttgaaac tgggtgttaa attacagttg 840
tcgcaggtga acataatatt gaggagacag aacatacaga gcaaaagcga aatgtgattc 900
gaattattcc tcaccacaac tacaatgcag ctattaataa gtacaacatc gacattgccc 960
ttctggaact ggacgaaccc ttagtgctaa acagctacgt tacacctatt tgcattgctg 1020
acaaggaata cacgaacatc ttcctcaaat ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080
gagtcttcca caaagggaga tcagcttttag ttctccagta ccttagagtt ccacttggtg 1140
accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260
aagtgggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga 1320
aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380
caaagctcac ttgaacgcgg ccgc 1404

```

<210> 56

<211> 461

<212> PRT

<213> 智人

<400> 56

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35					40					45			
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55					60				
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65				70					75					80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
			85					90					95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145				150					155					160	
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
			165					170					175		
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
		180						185					190		
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
	195					200						205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210					215						220			
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225				230					235					240	
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
			245					250					255		
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
		260					265						270		
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
	275					280						285			
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
	290					295						300			
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu

305	310	315	320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile			
	325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr			
	340	345	350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val			
	355	360	365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg			
	370	375	380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His			
385	390	395	400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val			
	405	410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly			
	420	425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser			
	435	440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr			
	450	455	460

<210> 57

<211> 1502

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP

<400> 57

gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgata atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60
tgccttttag gatatctact cagtgtgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaacacgcc 120
aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180
gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240
tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt 300
gagtccaatc catgttttaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360
tggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420
aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgtgata acaaggtggg ttgctcctgt 480
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540
tgtggaagag tttctgtttc acaaacttct aagtcacccc gtgctgagac tgtttttcct 600
gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660
accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgccaa accaggtcaa 720
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcggt 780

aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840
 gtcgcaggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900
 cgaattattc ctcaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960
 cttctggaac tggacgaacc cttagtgtta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020
 gacaaggaat acacgaacat cttcctcaaa tttggatctg gctatgtaag tggctgggga 1080
 agagtcttcc acaaaggag atcagcttta gttcttcagt accttagagt tccacttggt 1140
 gaccgagcca catgtcttcg atctacaaag ttcaccatct ataacaacat gttctgtgct 1200
 ggcttccatg aaggaggtag agattcatgt caaggagata gtgggggacc ccatgttact 1260
 gaagtggaag ggaccagttt cttactgga attattagct ggggtgaaga gtgtgcaatg 1320
 aaaggcaaat atggaatata taccaaggta tcccggtagt tcaactggat taaggaaaaa 1380
 acaaagctca ctagctccag cagcaaggcc cctccccga gctgcctc cccaagcagg 1440
 ctgcctgggc cctccgacac accaatcctg ccacagtgat gaaggtctgg atccgcggcc 1500
 gc 1502

<210> 58

<211> 489

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP

<400> 58

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

145	150	155	160
Tyr Arg Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Cys Glu Pro Ala Val Pro Phe			
	165	170	175
Pro Cys Gly Arg Val Ser Val Ser Gln Thr Ser Lys Leu Thr Arg Ala			
	180	185	190
Glu Thr Val Phe Pro Asp Val Asp Tyr Val Asn Ser Thr Glu Ala Glu			
	195	200	205
Thr Ile Leu Asp Asn Ile Thr Gln Ser Thr Gln Ser Phe Asn Asp Phe			
	210	215	220
Thr Arg Val Val Gly Gly Glu Asp Ala Lys Pro Gly Gln Phe Pro Trp			
225	230	235	240
Gln Val Val Leu Asn Gly Lys Val Asp Ala Phe Cys Gly Gly Ser Ile			
	245	250	255
Val Asn Glu Lys Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Thr Gly			
	260	265	270
Val Lys Ile Thr Val Val Ala Gly Glu His Asn Ile Glu Glu Thr Glu			
	275	280	285
His Thr Glu Gln Lys Arg Asn Val Ile Arg Ile Ile Pro His His Asn			
	290	295	300
Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu			
305	310	315	320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile			
	325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr			
	340	345	350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val			
	355	360	365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg			
	370	375	380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His			
385	390	395	400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val			
	405	410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly			
	420	425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser			
	435	440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser			
450	455	460	

Ser Lys Ala Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly
 465 470 475 480
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 485

<210> 59

<211> 1585

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP-CTP

<400> 59

```
gcgatcgcca tgcagcgcgt gaacatgata atggcagaat caccaggcct catcaccatc 60
tgccttttag gatattact cagtgtgaa tgtacagttt ttcttgatca tgaaaacgcc 120
aacaaaattc tgaatcggcc aaagaggtat aattcaggta aattggaaga gtttgttcaa 180
gggaaccttg agagagaatg tatggaagaa aagtgtagtt ttgaagaagc acgagaagtt 240
tttgaaaaca ctgaaagaac aactgaattt tggaagcagt atgttgatgg agatcagtgt 300
gagtccaatc catgtttaaa tggcggcagt tgcaaggatg acattaattc ctatgaatgt 360
tggtgtccct ttggatttga aggaaagaac tgtgaattag atgtaacatg taacattaag 420
aatggcagat gcgagcagtt ttgtaaaaat agtgtgata acaaggtggt ttgctcctgt 480
actgagggat atcgacttgc agaaaaccag aagtcctgtg aaccagcagt gccatttcca 540
tgtggaagag ttctgtttc acaaacttct aagtcaccc gtgctgagac tgttttctct 600
gatgtggact atgtaaattc tactgaagct gaaaccattt tggataacat cactcaaagc 660
accaatcat ttaatgactt cactcgagtt gttggtggag aagatgccaa accaggtcaa 720
ttcccttggc aggttgtttt gaatggtaaa gttgatgcat tctgtggagg ctctatcggt 780
aatgaaaaat ggattgtaac tgctgcccac tgtgttgaaa ctggtgttaa aattacagtt 840
gtcgcagggtg aacataatat tgaggagaca gaacatacag agcaaaagcg aaatgtgatt 900
cgaattattc ctaccacaa ctacaatgca gctattaata agtacaacca tgacattgcc 960
cttctggaac tggacgaacc cttagtgcta aacagctacg ttacacctat ttgcattgct 1020
acaaggaata cacgaacatc ttctcaaatt ttggatctgg ctatgtaagt ggctggggaa 1080
gagtcttcca caaagggaga tcagcttttag ttcttcagta ccttagagtt ccacttggtg 1140
accgagccac atgtcttcga tctacaaagt tcaccatcta taacaacatg ttctgtgctg 1200
gcttccatga aggaggtaga gattcatgtc aaggagatag tgggggaccc catgttactg 1260
aagtggaagg gaccagtttc ttaactggaa ttattagctg ggggtgaagag tgtgcaatga 1320
aaggcaaata tggaatatat accaaggtat cccggtatgt caactggatt aaggaaaaaa 1380
caaagctcac tagctccagc agcaaggccc ctccccgag cctgccctcc ccaagcaggc 1440
tgcttgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctcttaag gccctctctc 1500
catccctgcc atccccctcc cggtgcctg gccctctga caccctatc ctgcctcagt 1560
gatgaagggtc tggatccgcg gccgc 1585
```

<210> 60

<211> 517

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP-CTP

<400> 60

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
1				5				10					15		
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35					40					45			
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55				60					
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65					70					75				80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
				85					90				95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105				110			
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145					150					155				160	
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
				165					170				175		
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
			180					185				190			
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
		195					200					205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210						215				220				
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225					230					235				240	
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
				245					250				255		
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly

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

<210> 61

<211> 545

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP-CTP-CTP

<400> 61

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35					40					45			
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55					60				
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65					70				75					80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
				85				90					95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145					150				155				160		
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
			165					170					175		
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
		180						185					190		
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
	195					200						205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210					215					220				
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225					230				235					240	
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
			245					250					255		
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
		260						265					270		
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
	275					280						285			
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
	290					295					300				

Tyr Asn Ala Ala Ile Asn Lys Tyr Asn His Asp Ile Ala Leu Leu Glu			
305	310	315	320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile			
	325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr			
	340	345	350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val			
	355	360	365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg			
	370	375	380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His			
385	390	395	400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val			
	405	410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly			
	420	425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser			
	435	440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser			
	450	455	460
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly			
465	470	475	480
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro			
	485	490	495
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr			
	500	505	510
Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu			
	515	520	525
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro			
	530	535	540
Gln			
545			
<210> 62			
<211> 573			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 因子IX-CTP-CTP-CTP-CTP			
<400> 62			

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35					40					45			
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55					60				
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65				70					75					80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
			85					90					95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120						125		
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145				150					155					160	
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
			165					170					175		
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
		180						185					190		
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
	195					200						205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210					215						220			
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225				230					235					240	
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
			245					250					255		
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
		260					265						270		
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
	275					280						285			
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
	290					295					300				
Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Asn	Lys	Tyr	Asn	His	Asp	Ile	Ala	Leu	Leu	Glu

305	310	315	320
Leu Asp Glu Pro Leu Val Leu Asn Ser Tyr Val Thr Pro Ile Cys Ile			
	325	330	335
Ala Asp Lys Glu Tyr Thr Asn Ile Phe Leu Lys Phe Gly Ser Gly Tyr			
	340	345	350
Val Ser Gly Trp Gly Arg Val Phe His Lys Gly Arg Ser Ala Leu Val			
	355	360	365
Leu Gln Tyr Leu Arg Val Pro Leu Val Asp Arg Ala Thr Cys Leu Arg			
	370	375	380
Ser Thr Lys Phe Thr Ile Tyr Asn Asn Met Phe Cys Ala Gly Phe His			
385	390	395	400
Glu Gly Gly Arg Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro His Val			
	405	410	415
Thr Glu Val Glu Gly Thr Ser Phe Leu Thr Gly Ile Ile Ser Trp Gly			
	420	425	430
Glu Glu Cys Ala Met Lys Gly Lys Tyr Gly Ile Tyr Thr Lys Val Ser			
	435	440	445
Arg Tyr Val Asn Trp Ile Lys Glu Lys Thr Lys Leu Thr Ser Ser Ser			
450	455	460	
Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly			
465	470	475	480
Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro			
	485	490	495
Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr			
	500	505	510
Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu			
	515	520	525
Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro			
	530	535	540
Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser			
545	550	555	560
Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln			
	565	570	

<210> 63

<211> 601

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 因子IX-CTP-CTP-CTP-CTP-CTP

<400> 63

Met	Gln	Arg	Val	Asn	Met	Ile	Met	Ala	Glu	Ser	Pro	Gly	Leu	Ile	Thr
1				5					10					15	
Ile	Cys	Leu	Leu	Gly	Tyr	Leu	Leu	Ser	Ala	Glu	Cys	Thr	Val	Phe	Leu
			20					25					30		
Asp	His	Glu	Asn	Ala	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Arg	Pro	Lys	Arg	Tyr	Asn
		35					40					45			
Ser	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Phe	Val	Gln	Gly	Asn	Leu	Glu	Arg	Glu	Cys
	50					55					60				
Met	Glu	Glu	Lys	Cys	Ser	Phe	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu	Asn
65					70				75					80	
Thr	Glu	Arg	Thr	Thr	Glu	Phe	Trp	Lys	Gln	Tyr	Val	Asp	Gly	Asp	Gln
				85				90					95		
Cys	Glu	Ser	Asn	Pro	Cys	Leu	Asn	Gly	Gly	Ser	Cys	Lys	Asp	Asp	Ile
			100					105					110		
Asn	Ser	Tyr	Glu	Cys	Trp	Cys	Pro	Phe	Gly	Phe	Glu	Gly	Lys	Asn	Cys
		115					120					125			
Glu	Leu	Asp	Val	Thr	Cys	Asn	Ile	Lys	Asn	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Phe
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Ser	Ala	Asp	Asn	Lys	Val	Val	Cys	Ser	Cys	Thr	Glu	Gly
145					150				155					160	
Tyr	Arg	Leu	Ala	Glu	Asn	Gln	Lys	Ser	Cys	Glu	Pro	Ala	Val	Pro	Phe
			165					170					175		
Pro	Cys	Gly	Arg	Val	Ser	Val	Ser	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Thr	Arg	Ala
		180						185					190		
Glu	Thr	Val	Phe	Pro	Asp	Val	Asp	Tyr	Val	Asn	Ser	Thr	Glu	Ala	Glu
	195					200						205			
Thr	Ile	Leu	Asp	Asn	Ile	Thr	Gln	Ser	Thr	Gln	Ser	Phe	Asn	Asp	Phe
	210					215					220				
Thr	Arg	Val	Val	Gly	Gly	Glu	Asp	Ala	Lys	Pro	Gly	Gln	Phe	Pro	Trp
225					230				235					240	
Gln	Val	Val	Leu	Asn	Gly	Lys	Val	Asp	Ala	Phe	Cys	Gly	Gly	Ser	Ile
			245					250					255		
Val	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His	Cys	Val	Glu	Thr	Gly
		260						265					270		
Val	Lys	Ile	Thr	Val	Val	Ala	Gly	Glu	His	Asn	Ile	Glu	Glu	Thr	Glu
	275					280						285			
His	Thr	Glu	Gln	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Arg	Ile	Ile	Pro	His	His	Asn
	290					295					300				

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

<210> 64

<211> 2413

<212> DNA

<213> 智人

<400> 64

```

tctagagtcg accccgccat ggagctgagg ccctggttgc tatgggtggt agcagcaaca 60
ggaaccttgg tcctgctagc agctgatgct cagggccaga aggtcttcac caacacgtgg 120
gctgtgcgca tccctggagg cccagcgggtg gccaacagtg tggcacggaa gcatgggttc 180
ctcaacctgg gccagatctt cggggactat taccattctt ggcatcgagg agtgacgaag 240
cggtccctgt cgcctcaccg cccgcggcac agccggctgc agagggagcc tcaagtacag 300
tggctggaac agcaggtggc aaagcgacgg actaaacggg acgtgtacca ggagcccaca 360
gaccccaagt ttctcagca gtggtacctg tctggtgtca ctacagcggga cctgaatgtg 420
aaggcggcct gggcgaggg ctacacaggg cacggcattg tggctctccat tctggacgat 480
ggcatcgaga agaaccaccc ggacttggca ggcaattatg atcctggggc cagttttgat 540
gtcaatgacc aggacctga cccccagcct cggtacacac agatgaatga caacaggcac 600
ggcacacggt gtgcggggga agtggctgcg gtggccaaca acggtgtctg tgggttaggt 660
gtggcctaca acgcccgcac tggaggggtg cgcatgctgg atggcgaggt gacagatgca 720
gtggaggcac gctcgtctgg cctgaacccc aaccacatcc acatctacag tgccagctgg 780
ggccccgagg atgacggcaa gacagtggat gggccagccc gcctcgccga ggaggccttc 840
ttccgtgggg ttagccaggg ccgagggggg ctgggctcca tctttgtctg ggcctcgggg 900
aacggggggc gggaacatga cagctgcaac tgcgacggct acaccaacag tatctacacg 960
ctgtccatca gcagcgccac gcagtttggc aacgtgccgt ggtacagcga ggcctgctcg 1020
tccacactgg ccacgacctc cagcagtggc aaccagaatg agaagcagat cgtgacgact 1080
gacttgccgc agaagtgcac ggagtctcac acgggcacct cagcctctgc ccccttagca 1140
gccggcatca ttgctctcac cctggaggcc aataagaacc tcacatggcg ggacatgcaa 1200
cacctggtgg tacagacctc gaagccagcc cacctcaatg ccaacgactg ggccaccaat 1260
ggtgtggggc ggaaagtgag ccaactcatat ggctacgggc ttttggacgc aggcgccatg 1320
gtggccctgg ccagaattg gaccacagtg gccccccagc ggaagtgcac catcgacatc 1380
ctcaccgagc ccaaagacat cgggaaacgg ctcgaggtgc ggaagaccgt gaccgcgtgc 1440
ctgggcgagc ccaaccacat cactcggtcg gagcacgtc aggcgcggtc caccctgtcc 1500
tataatcgcc gtggcgacct ggccatccac ctggctagcc ccatgggcac ccgctccacc 1560
ctgctggcag ccaggccaca tgactactcc gcagatgggt ttaatgactg ggccttcacg 1620
acaactcatt cctgggatga ggatccctct ggcgagtggg tcctagagat tgaaaacacc 1680
agcgaagcca acaactatgg gacgtgacc aagttcacc tcgtactcta tggcaccgcc 1740
cctgaggggc tgcccgtacc tccagaaagc agtggctgca agaccctcac gtccagtcag 1800
gcctgtgtgg tgtgcgagga aggtttctcc ctgcaccaga agagctgtgt ccagcactgc 1860
cctccaggct tcgcccccca agtcctcgat acgcactata gcaccgagaa tgacgtggag 1920
accatccggg ccagcgtctg cgccccctgc cacgcctcat gtgccacatg ccaggggccg 1980
gccctgacag actgcctcag ctgccccagc cacgcctcct tggaccctgt ggagcagact 2040
tgctcccggc aaagccagag cagccgagag tccccgccac agcagcagcc acctcggctg 2100

```

cccccgagg tggaggcggg gcaacggctg cgggcagggc tgctgccctc acacctgcct 2160
 gaggtggtgg cgggcctcag ctgcgccttc atcgtgctgg tcttcgtcac tgtcttcctg 2220
 gtcctgcagc tgcgctctgg ctttagtttt cgggggggtga aggtgtacac catggaccgt 2280
 ggcctcatct cctacaagg gctgccccct gaagcctggc aggaggagtg cccgtctgac 2340
 tcagaagagg acgagggccg gggcgagagg accgccttta tcaaagacca gagcgccctc 2400
 tgaacgcggc cgc 2413

<210> 65

<211> 794

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

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

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

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

<210> 66

<211> 249

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-CTP-EPO

<400> 66

Met Gly Val His Glu Cys Pro Ala Trp Leu Trp Leu Leu Leu Ser Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Leu Pro Leu Gly Leu Pro Val Leu Gly Ser Ser Ser Ser Lys
 20 25 30
 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 35 40 45
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
 50 55 60
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
 65 70 75 80
 Leu Pro Gln Ala Pro Pro Arg Leu Ile Cys Asp Ser Arg Val Leu Glu
 85 90 95
 Arg Tyr Leu Leu Glu Ala Lys Glu Ala Glu Asn Ile Thr Thr Gly Cys
 100 105 110
 Ala Glu His Cys Ser Leu Asn Glu Asn Ile Thr Val Pro Asp Thr Lys
 115 120 125
 Val Asn Phe Tyr Ala Trp Lys Arg Met Glu Val Gly Gln Gln Ala Val
 130 135 140
 Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
 145 150 155 160
 Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu
 165 170 175
 His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu
 180 185 190
 Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala
 195 200 205
 Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu
 210 215 220
 Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr
 225 230 235 240
 Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg
 245

<210> 67

<211> 762

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-CTP-EPO

<400> 67

atgggcgtgc acgagtgtcc tgcttggctg tggctgctgc tgagcctgct gtccctgcct 60
 ctgggcctgc ctgtgctggg cagcagcagc tctaaggccc ctccaccag cctgcccagc 120
 ccttctagac tgctggccc cagcgacacc cccatcctgc ctgagagcag cagcagcaag 180
 gccccaccac catccctgcc tagccccagc agactgccag gcccttccga taccccaatc 240
 ctgccccagg cccctcccag actgatctgc gacagccggg tgctggaaag atacctgctg 300
 gaagccaaaag aggccgagaa catcaccacc ggctgcgccg agcactgcag cctgaacgag 360
 aatatcaccg tgcccagacac caaagtgaac ttctacgcct ggaagcggat ggaagtgggc 420
 cagcaggccg tggaagtgtg gcagggactg gcctgctga gcgaggccgt gctgagagga 480
 caggccctgc tggatgaacag cagccagccc tgggagcccc tgcagctgca tgtggataag 540
 gccgtgtccg gcctgcggag cctgaccaca ctgctgagag ccctgggcgc tcagaaagag 600
 gccatctctc cccctgatgc cgctctgcc gccctctga gaaccatcac cgccgacacc 660
 ttccggaagc tgttccgggt gtacagcaac ttctgcggg gcaagctgaa gctgtacacc 720
 ggcgaggcct gccggaccgg cgatagataa gcttggcgcg cc 762

<210> 68

<211> 305

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-CTP-EPO-CTP-CTP

<400> 68

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

Glu Val Trp Gln Gly Leu Ala Leu Leu Ser Glu Ala Val Leu Arg Gly
 145 150 155 160
 Gln Ala Leu Leu Val Asn Ser Ser Gln Pro Trp Glu Pro Leu Gln Leu
 165 170 175
 His Val Asp Lys Ala Val Ser Gly Leu Arg Ser Leu Thr Thr Leu Leu
 180 185 190
 Arg Ala Leu Gly Ala Gln Lys Glu Ala Ile Ser Pro Pro Asp Ala Ala
 195 200 205
 Ser Ala Ala Pro Leu Arg Thr Ile Thr Ala Asp Thr Phe Arg Lys Leu
 210 215 220
 Phe Arg Val Tyr Ser Asn Phe Leu Arg Gly Lys Leu Lys Leu Tyr Thr
 225 230 235 240
 Gly Glu Ala Cys Arg Thr Gly Asp Arg Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro
 245 250 255
 Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr
 260 265 270
 Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu
 275 280 285
 Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro
 290 295 300

Gln

305

<210> 69

<211> 930

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> CTP-CTP-EPO-CTP-CTP

<400> 69

atgggctgc acgagtgtcc tgcttggtg tggtctgtgc tgagcctgct gtccctgcct 60
 ctgggcctgc ctgtgctggg cagcagcagc tctaaggccc ctccaccag cctgcccagc 120
 ccttctagac tgccctggccc cagcgacacc cccatcctgc ctgagagcag cagcagcaag 180
 gccccaccac catccctgcc tagccccagc agactgccag gcccttccga taccccaatc 240
 ctgccccagg cccctcccag actgatctgc gacagccggg tgctggaaag atacctgctg 300
 gaagccaaag aggccgagaa catcaccacc ggctgcgccg agcactgcag cctgaacgag 360
 aatatcaccg tgcccgcacac caaagtgaac ttctacgcct ggaagcggat ggaagtgggc 420
 cagcaggccg tggaagtgtg gcagggactg gccctgctga gcgaggccgt gctgagagga 480
 caggccctgc tggatgaacag cagccagccc tgggagcccc tgcagctgca tgttgataag 540
 gccgtgtccg gcctgcggag cctgaccaca ctgctgagag ccctgggcgc tcagaaagag 600

gccatctctc cccctgatgc cgcctctgcc gccctctga gaaccatcac cgccgacacc 660
ttccggaagc tgttccgggt gtacagcaac ttctgcggg gcaagctgaa gctgtacacc 720
ggcgaggcct gccggaccgg cgatagaagc agctccagca aggctccacc cccagcctg 780
ccatcccaaa gtagactgcc cgggccctct gacacaccta tcctgccaca gtccagcagc 840
tccaaagctc cccaccatc cctcccatcc ccatccagac tgcctggacc atccgacact 900
ccaattctgc ctgagtaagc ttggcgcgcc 930

<210> 70

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AP0-A1-CTP

<400> 70

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

Gly Gly Ala Arg Leu Ala Glu Tyr His Ala Lys Ala Thr Glu His Leu
 210 215 220
 Ser Thr Leu Ser Glu Lys Ala Lys Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Gln
 225 230 235 240
 Gly Leu Leu Pro Val Leu Glu Ser Phe Lys Val Ser Phe Leu Ser Ala
 245 250 255
 Leu Glu Glu Tyr Thr Lys Lys Leu Asn Thr Gln Ser Ser Ser Ser Lys
 260 265 270
 Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser
 275 280 285
 Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln
 290 295

<210> 71

<211> 911

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> APO-A1-CTP

<400> 71

atgaaggccg ccgtgctgac cctggccgtg ctgtttctga ccggtctctca ggccccggcac 60
 ttctggcagc aggacgagcc tccccagtcc ccctgggaca gagtgaagga cctggccacc 120
 gtgtacgtgg acgtgctgaa ggactccggc agagactacg tgtcccagtt cgagggtctt 180
 gccctgggca agcagctgaa cctgaagctg ctggacaact gggactccgt gacctccacc 240
 ttctccaagc tgcgcgaaca gctgggacct gtgaccagg aattctggga caacctggaa 300
 aaagagacag agggcctgag acaggaaatg tccaaggacc tggaagaggt caaagccaag 360
 gtgcagccct acctggacga cttccagaag aaatggcagg aagagatgga actgtaccgg 420
 cagaaggtgg aacccctgcg ggccgagctg caggaggcg ctagacagaa gctgcacgaa 480
 ctgcaggaaa agctgtcccc cctgggagag gaaatgcggg acagagccag agcccacgtg 540
 gacgccctga gaacccacct ggccccctac tctgacgagc tgcggcagag gctggccgcc 600
 agactggaag ccctgaaaga gaacggcgga gcccggtgg ccgagtacca cgctaaggct 660
 accgagcacc tgtccaccct gtccgagaag gccaaagccc ccctggaaga tctgcggcag 720
 ggctgtctgc ccgtgctgga atccttcaag gtgtccttcc tgtccgtctt ggaagagtac 780
 accaagaagc tgaacaccca gtctccagc tccaaggccc ctccaccctc cctgcctagc 840
 cctagtagac tgctggggcc ctccgacacc cccatcctgc ccagtgatg aggatccgcg 900
 gccgcgagct c 911

<210> 72

<211> 323

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> APO-A1-CTP-CTP

<400> 72

Met	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Phe	Leu	Thr	Gly	Ser
1				5					10					15	
Gln	Ala	Arg	His	Phe	Trp	Gln	Gln	Asp	Glu	Pro	Pro	Gln	Ser	Pro	Trp
			20					25					30		
Asp	Arg	Val	Lys	Asp	Leu	Ala	Thr	Val	Tyr	Val	Asp	Val	Leu	Lys	Asp
		35					40					45			
Ser	Gly	Arg	Asp	Tyr	Val	Ser	Gln	Phe	Glu	Gly	Ser	Ala	Leu	Gly	Lys
	50					55					60				
Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Leu	Leu	Asp	Asn	Trp	Asp	Ser	Val	Thr	Ser	Thr
65				70					75					80	
Phe	Ser	Lys	Leu	Arg	Glu	Gln	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Gln	Glu	Phe	Trp
				85				90						95	
Asp	Asn	Leu	Glu	Lys	Glu	Thr	Glu	Gly	Leu	Arg	Gln	Glu	Met	Ser	Lys
			100					105					110		
Asp	Leu	Glu	Glu	Val	Lys	Ala	Lys	Val	Gln	Pro	Tyr	Leu	Asp	Asp	Phe
		115					120					125			
Gln	Lys	Lys	Trp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Leu	Tyr	Arg	Gln	Lys	Val	Glu
	130						135					140			
Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Arg	Gln	Lys	Leu	His	Glu
145				150					155					160	
Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Ser	Pro	Leu	Gly	Glu	Glu	Met	Arg	Asp	Arg	Ala
			165					170					175		
Arg	Ala	His	Val	Asp	Ala	Leu	Arg	Thr	His	Leu	Ala	Pro	Tyr	Ser	Asp
		180						185					190		
Glu	Leu	Arg	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala	Arg	Leu	Glu	Ala	Leu	Lys	Glu	Asn
	195						200					205			
Gly	Gly	Ala	Arg	Leu	Ala	Glu	Tyr	His	Ala	Lys	Ala	Thr	Glu	His	Leu
	210					215					220				
Ser	Thr	Leu	Ser	Glu	Lys	Ala	Lys	Pro	Ala	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Gln
225				230					235					240	
Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Ser	Phe	Lys	Val	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala
			245					250					255		
Leu	Glu	Glu	Tyr	Thr	Lys	Lys	Leu	Asn	Thr	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Lys
		260					265					270			
Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Ser	Pro	Ser	Arg	Leu	Pro	Gly	Pro	Ser
	275						280					285			

Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro
 290 295 300
 Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile
 305 310 315 320
 Leu Pro Gln

<210> 73

<211> 995

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> AP0-A1-CTP-CTP

<400> 73

```

atgaaggccg ccgtgctgac cctggccgtg ctgtttctga ccggctctca ggcccggcac 60
ttctggcagc aggacgagcc tccccagtcc ccctgggaca gagtgaagga cctggccacc 120
gtgtacgtgg acgtgctgaa ggactccggc agagactacg tgtcccagtt cgagggtctt 180
gccctgggca agcagctgaa cctgaagctg ctggacaact gggactccgt gacctccacc 240
ttctccaagc tgcgcgaaca gctgggacct gtgaccagg aattctggga caacctggaa 300
aaagagacag agggcctgag acaggaaatg tccaaggacc tggaagaggt caaagccaag 360
gtgcagccct acctggacga cttccagaag aaatggcagg aagagatgga actgtaccgg 420
cagaaggtgg aaccctgcg ggccgagctg caggaaggcg ctagacagaa gctgcacgaa 480
ctgcaggaaa agctgtcccc cctgggagcg gaaatgcggg acagagccag agcccacgtg 540
gacgccctga gaaccacact ggccccctac tctgacgagc tgcggcagag gctggccgcc 600
agactggaag ccctgaaaga gaacggcgga gcccggctgg ccgagtacca cgctaaggct 660
accgagcacc tgtccaccct gtccgagaag gccaagcccc ccctggaaga tctgcggcag 720
ggcctgctgc ccgtgctgga atccttcaag gtgtccttcc tgtccgctct ggaagagtac 780
accaagaagc tgaacaccca gtcctccagc tccaaggccc ctccaccctc cctgcctagc 840
cctagtagac tgcctgggcc ctccgacaca ccaatcctgc cacagagcag ctctcttaag 900
gccccctctc catccctgcc atccccctcc cggtgcctg gcccctctga caccctatc 960
ctgcctcagt gatgaaggctc tggatccgcg gccgc 995

```

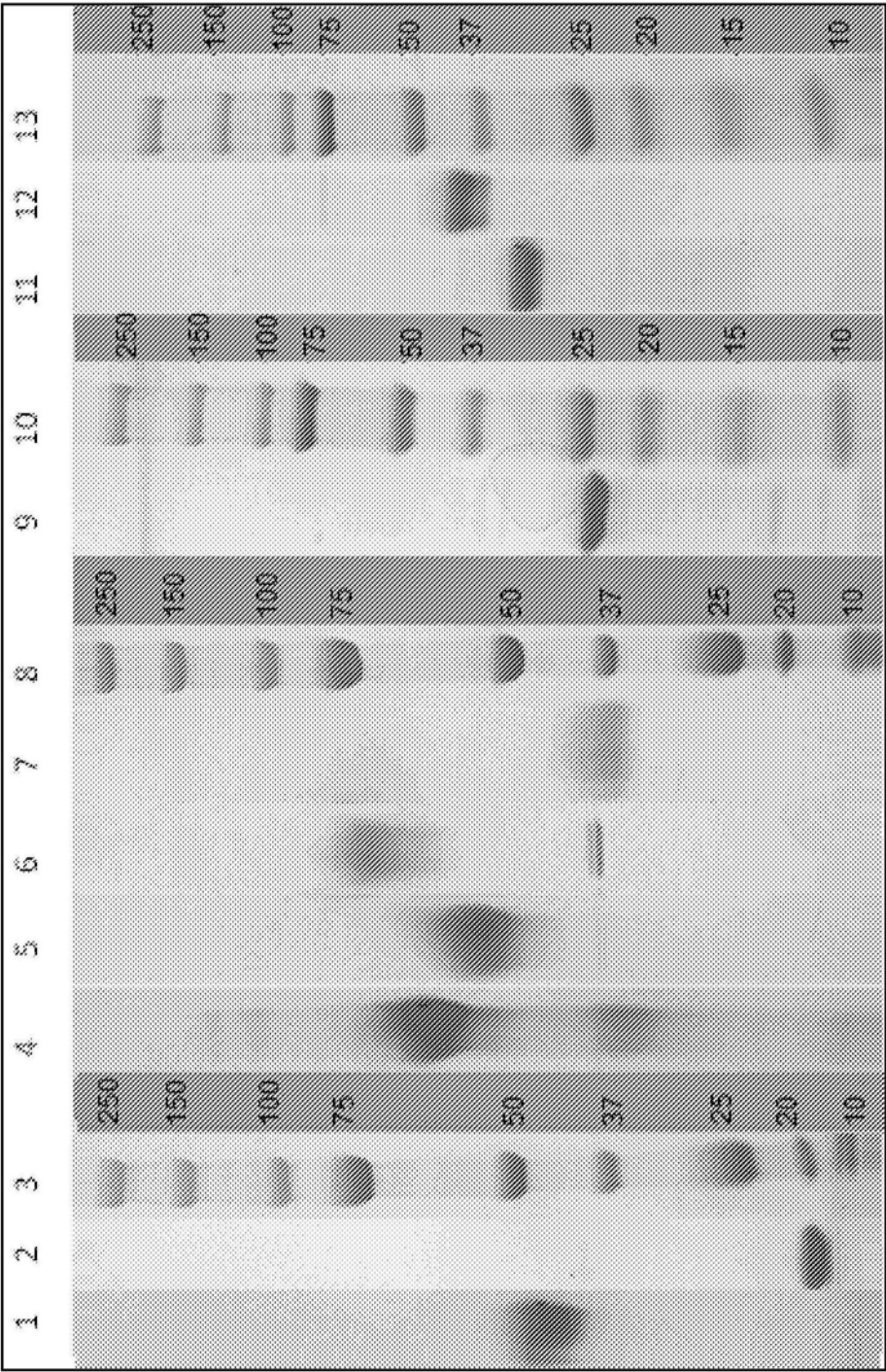


图1

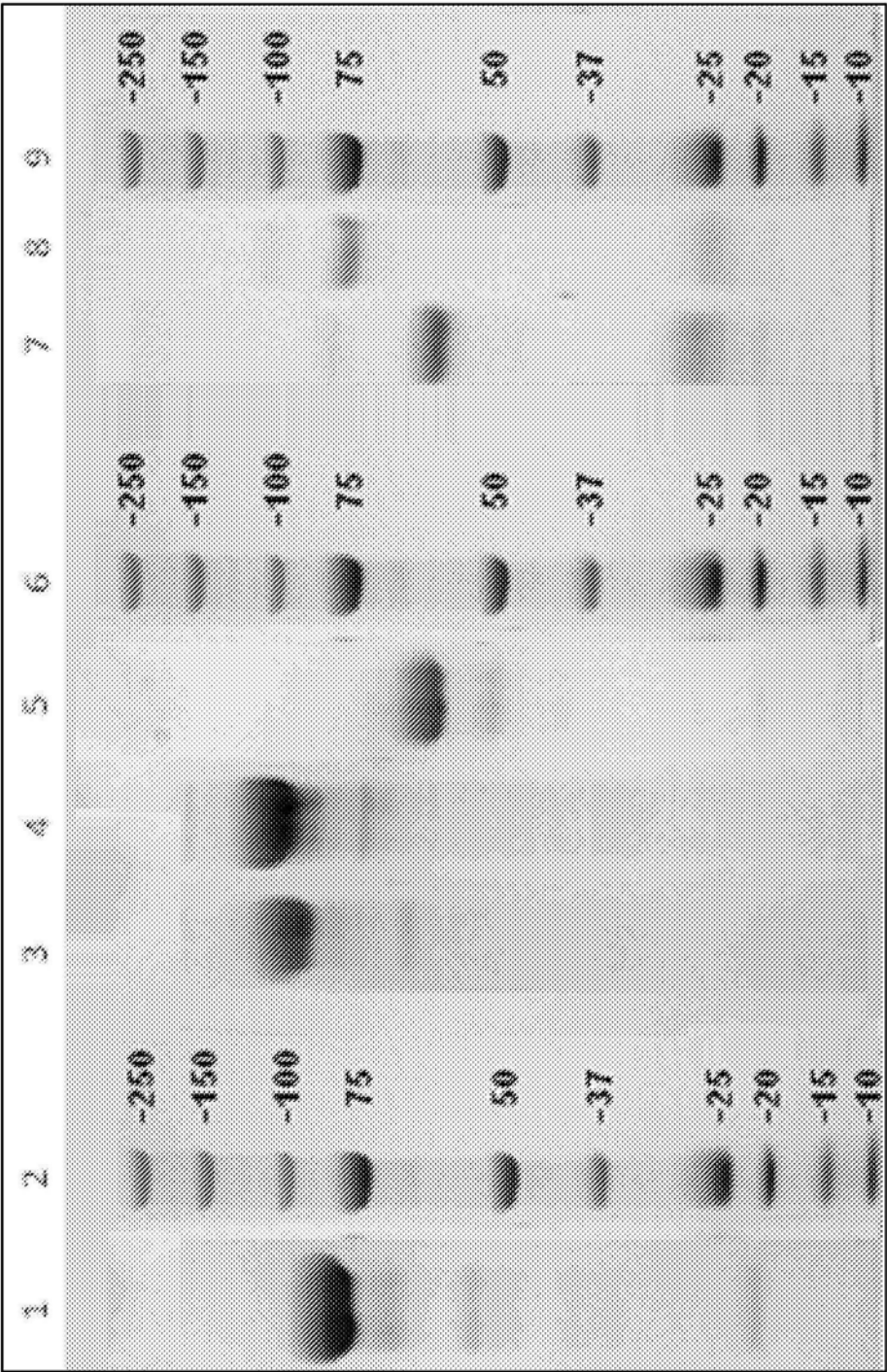


图2

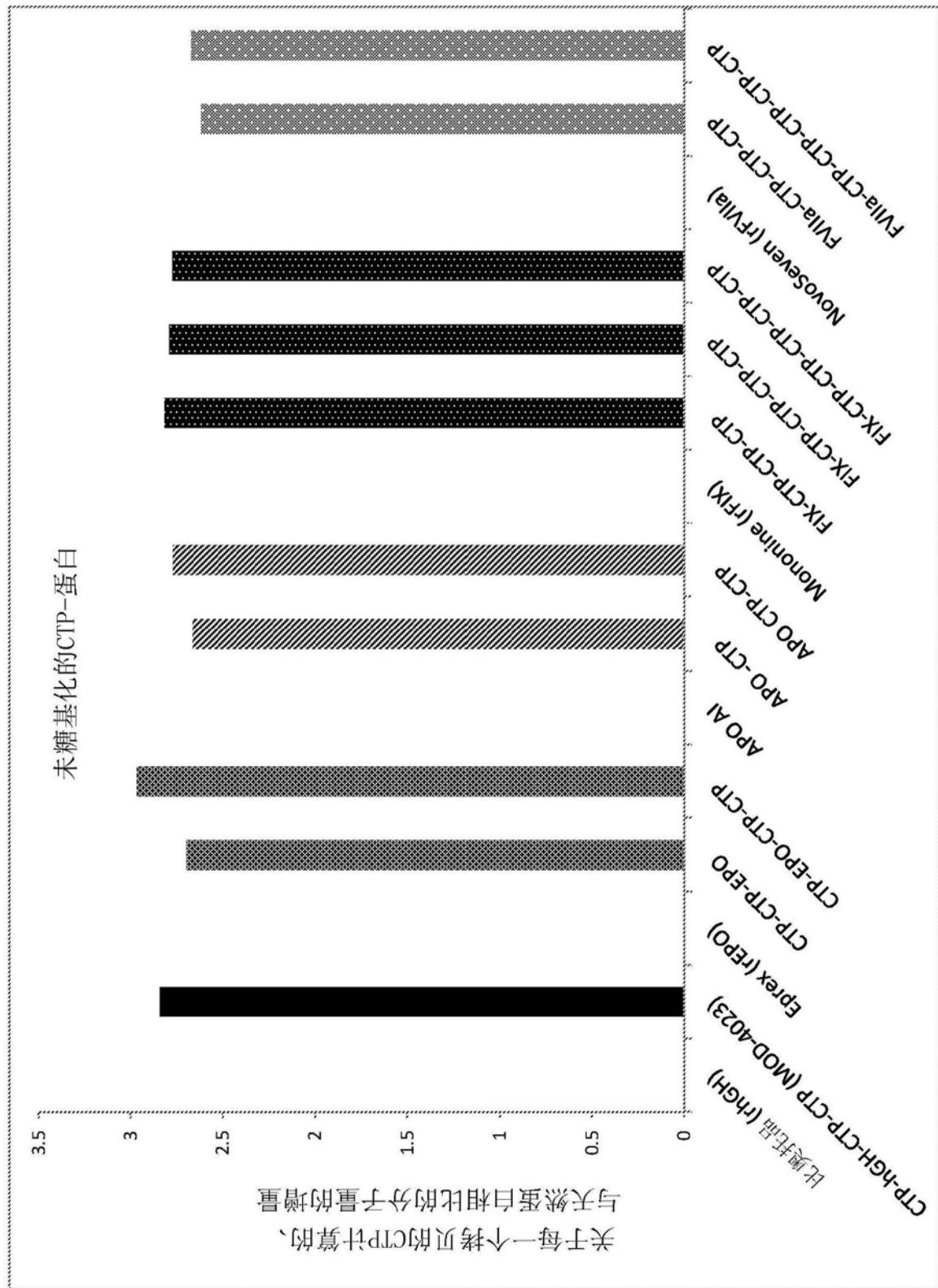


图3A

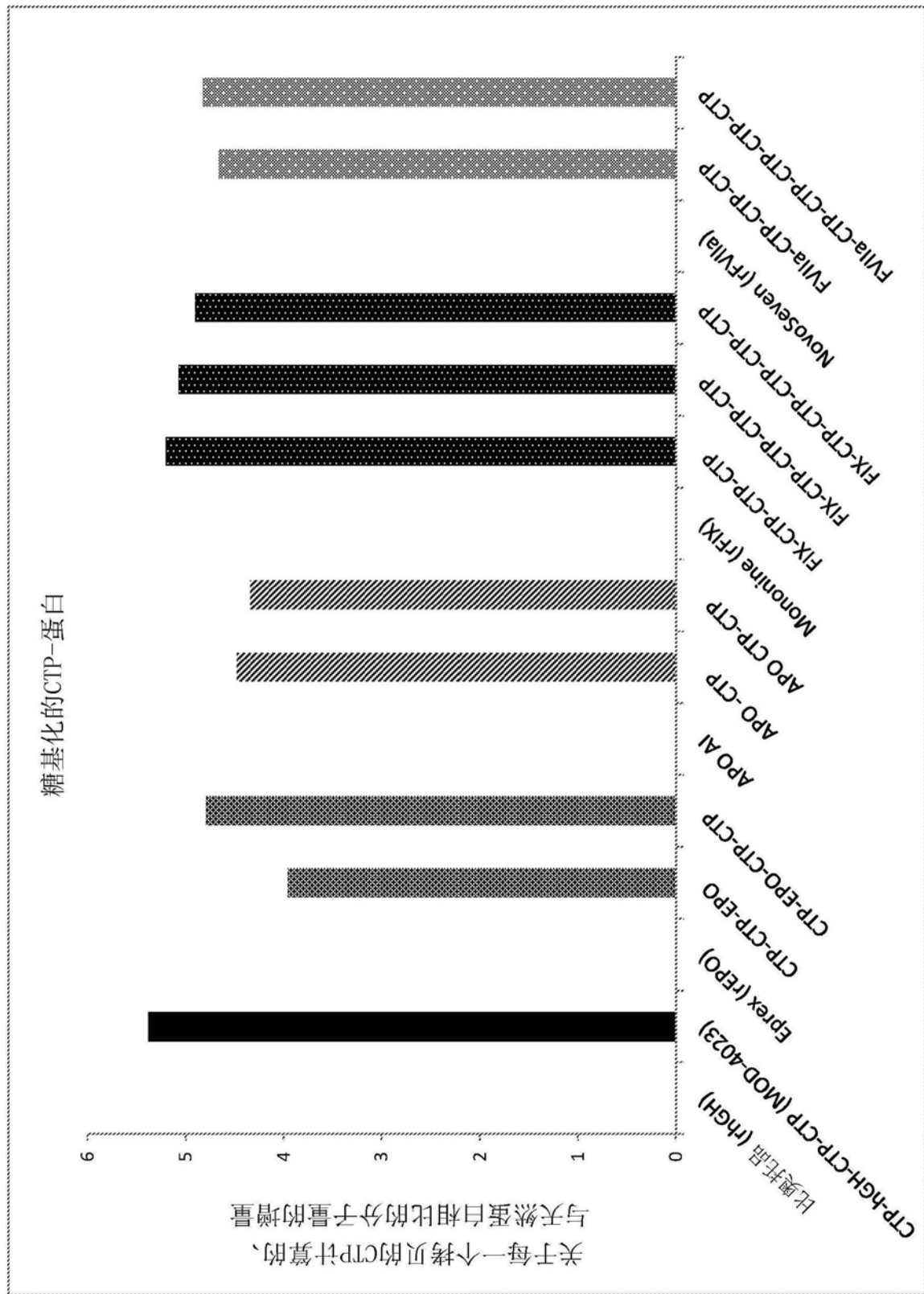


图3B

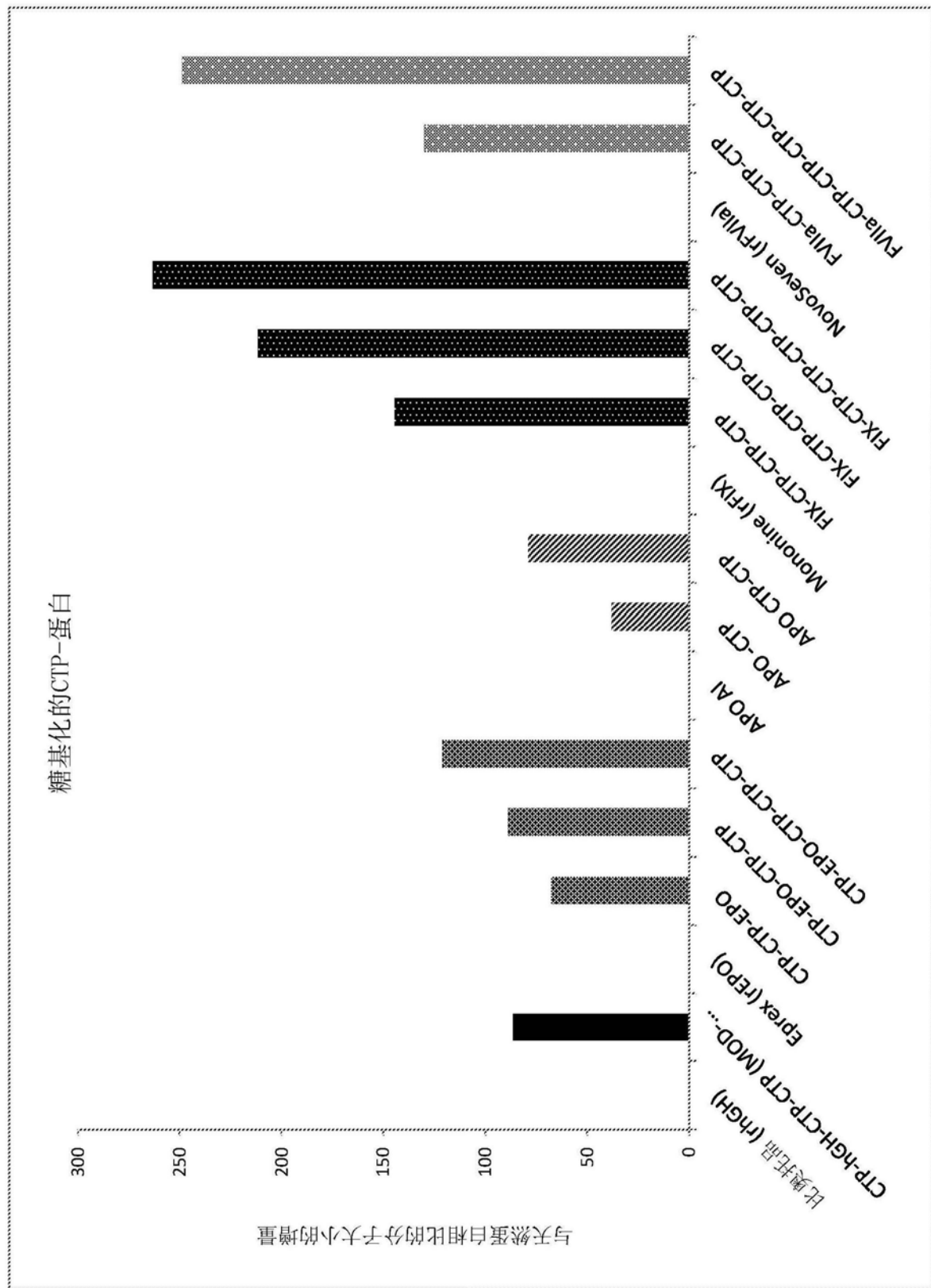


图4A

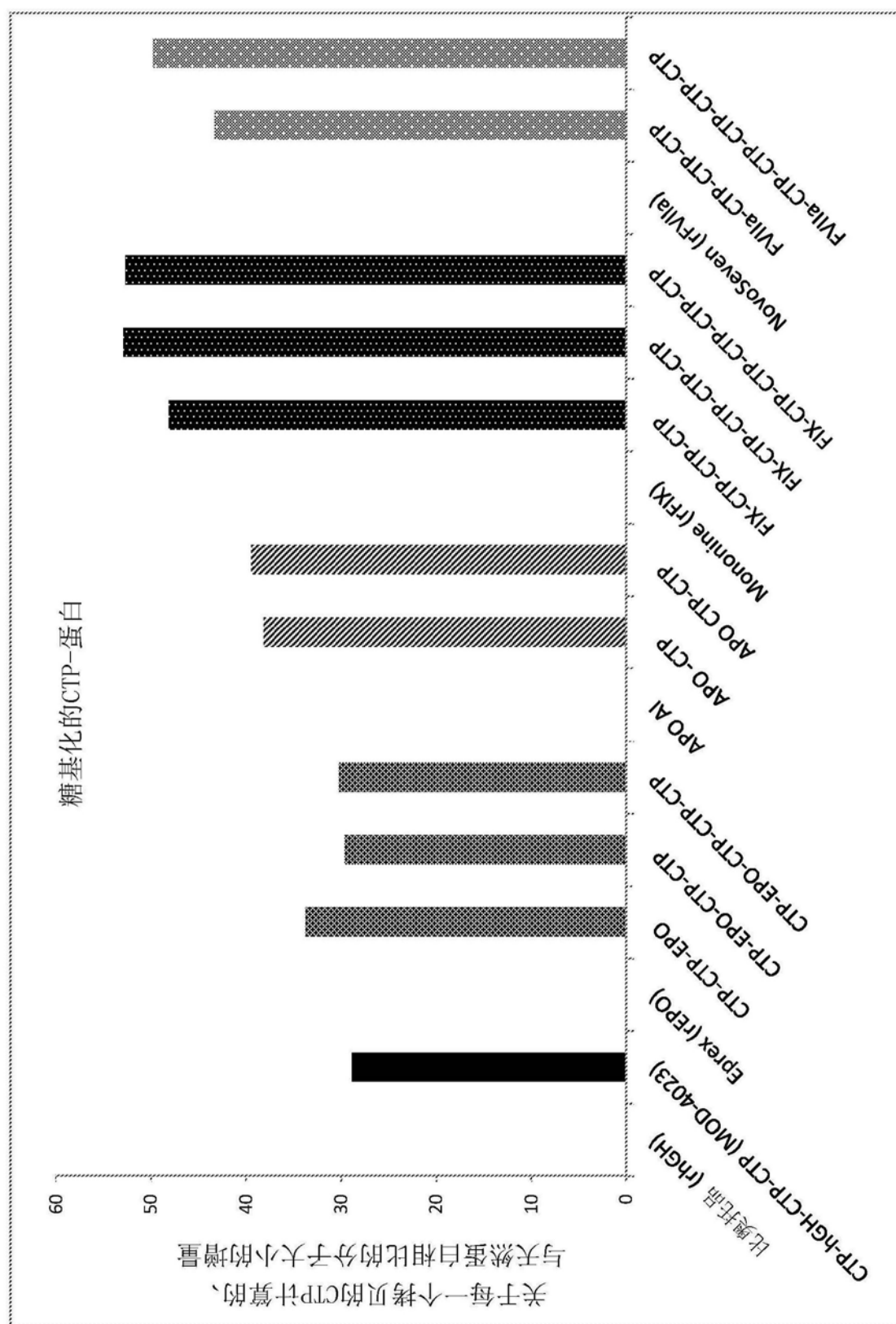


图4B

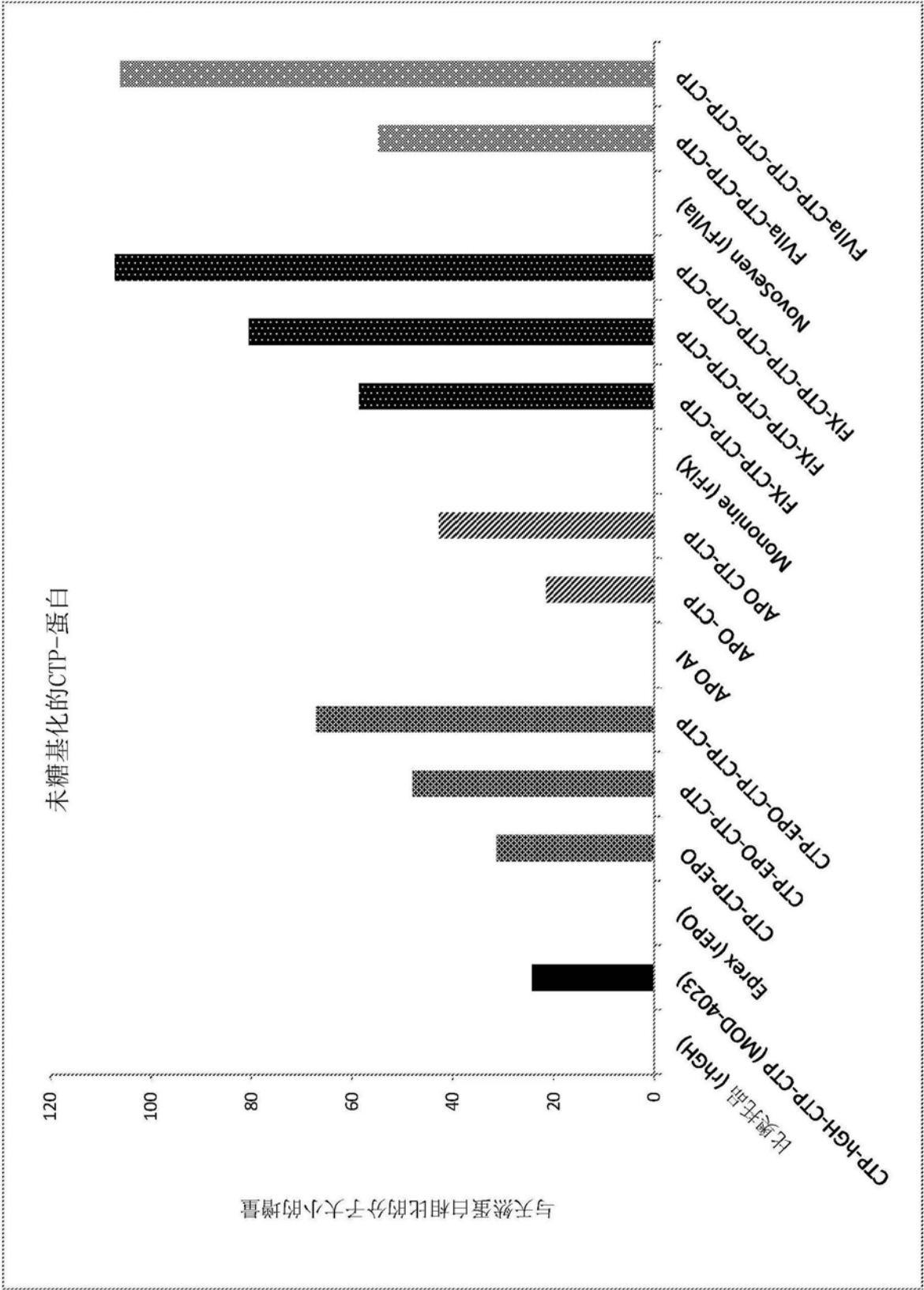


图5A

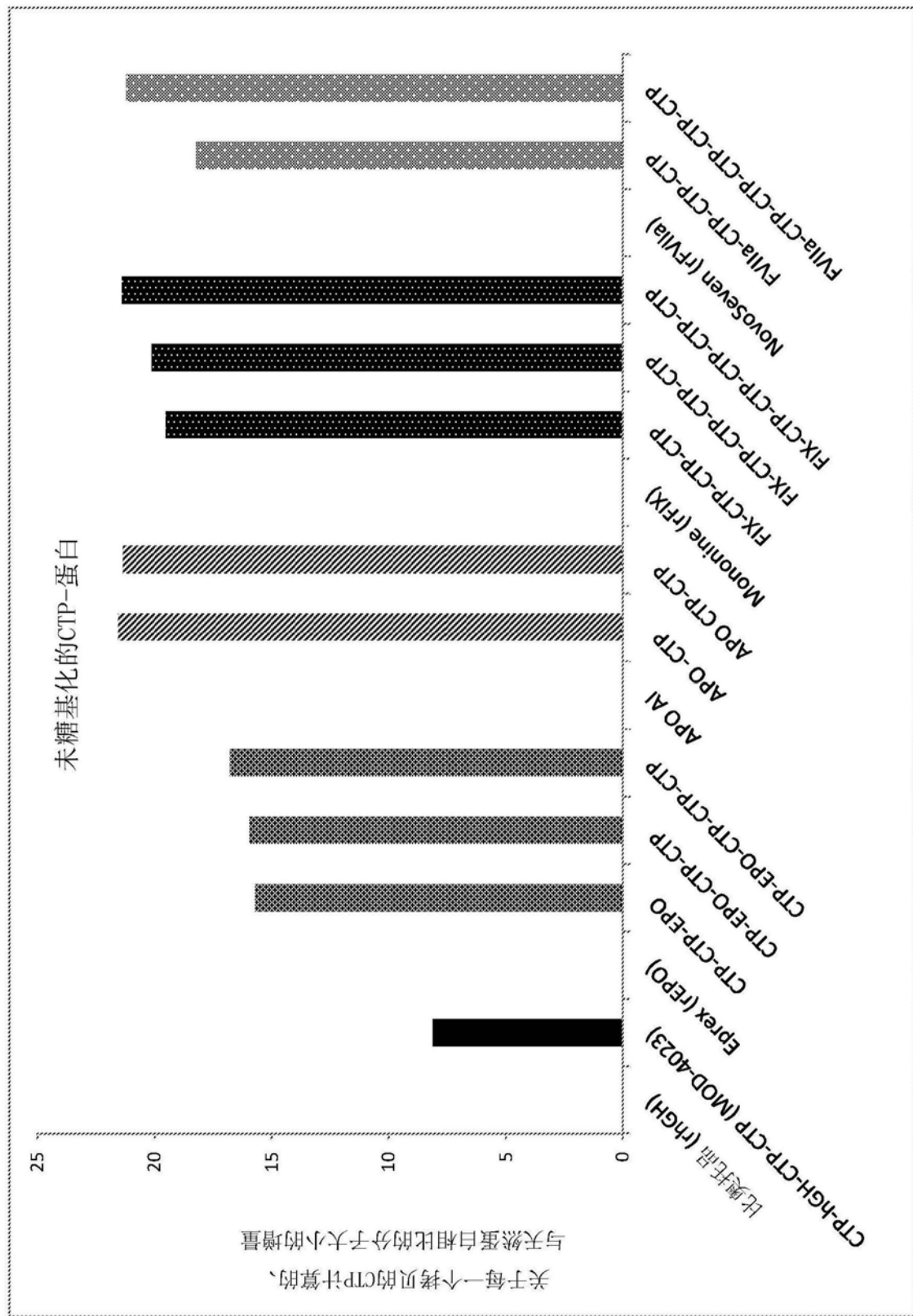


图5B