



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103917554 B

(45)授权公告日 2017.03.08

(21)申请号 201280051574.0

(22)申请日 2012.10.18

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103917554 A

(43)申请公布日 2014.07.09

(30)优先权数据
11185651.4 2011.10.18 EP
61/548,601 2011.10.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.04.18

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2012/070701 2012.10.18

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/057219 EN 2013.04.25

(73)专利权人 杰特有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

(72)发明人 C·霍恩 S·措尔纳 H·梅茨纳
S·舒尔特

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 韩威威

(51)Int.Cl.
C07K 14/755(2006.01)
A61K 38/37(2006.01)

审查员 赵天

权利要求书1页 说明书21页
序列表17页 附图7页

(54)发明名称

用于改善重构后纯化的因子VIII的稳定性
的方法

(57)摘要

本发明涉及一种用于增加因子VIII分子在
纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法
包括在制造因子VIII分子期间自始至终防止将
因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结
构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结
构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。本发明
还涉及用于改善静脉内和非静脉内注射后因子
VIII的生物利用率的方法。

1. 一种相对于人野生型因子VIII,改善因子VIII分子在静脉内和非静脉内施用后的血浆半寿期的方法,所述方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点,并且,如果存在于因子VIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点,以提供单链因子VIII,其中所述失活步骤包括从所述因子VIII的序列缺失至少Arg1313至Arg1648的氨基酸序列,所述缺失特征在于:氨基酸764与氨基酸1653融合,因而氨基酸765至1652缺失。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中缺失的氨基酸由长度为1-50个氨基酸的肽间隔序列替换。

用于改善重构后纯化的因子VIII的稳定性的方法

[0001] 本发明涉及一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法，所述方法包括在制造因子VIII分子期间自始至终防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。本发明还涉及用于改善静脉内和非静脉内注射后因子VIII的生物利用率的方法。

背景技术

[0002] 经典的血友病或血友病A是一种遗传性出血障碍。它因染色体X连锁的凝血因子VIII缺陷所致，并且几乎排他地侵袭男性，发病率为每10,000人在一位和两位个体之间。X-染色体缺陷由本身不是血友病患者的女性携带者传递。血友病A的临床表现是增加的出血倾向性。在引入因子VIII浓缩物治疗之前，患有严重血友病的人的平均寿命短于20年。使用来自血浆的因子VIII的浓缩物已经明显地改善血友病患者的状况，广泛地增加平均寿命，给予大部分患者过上或多或少正常生活的可能性。然而，伴随血浆衍生的浓缩物和它们的使用，存在某些问题，其中最严重的问题是传播病毒。迄今，造成AIDS、乙型肝炎和非甲非乙型肝炎的病毒已经严重袭击该群体。从那时起，已经新近开发了不同的病毒灭活方法和新的高度纯化的因子VIII浓缩物，它们还对血浆衍生的因子VIII建立了极高的安全性标准。

[0003] 几种重组和血浆衍生的治疗性多肽，例如凝血因子，可商业获得用于人类中的治疗性和预防性使用。FVIII是一种在哺乳动物肝脏中产生的分子量直到约280kDa的血浆糖蛋白。它是导致凝血的凝血反应级联的关键组分。在这个级联内部存在其中因子IXa (FIXa) 连同激活的因子VIII (FVIIIa) 一起使因子X (FX) 转化成激活形式FXa的步骤。FVIIIa在这个步骤充当辅因子，与钙离子和磷脂是最大化FIXa活性所要求的。

[0004] 治疗血友病A方面的一项重要进展是分离了编码2,351个氨基酸的人FVIII完整序列的cDNA克隆(美国专利号4,757,006)和提供人FVIII基因DNA序列及用于其生产的重组方法。

[0005] 将因子VIII合成为具有分子量约280kDa的单条多肽链。当因子VIII转运入内质网时，移除氨基端信号肽，并且成熟(即切除信号肽后)天然因子VIII分子随后在其分泌过程中在第1313和1648位氨基酸残基后以蛋白酶解方式被切割。这导致释放异二聚体，所述异二聚体由按金属离子依赖性方式与约160-200kDa N端重链片段缔合的约80kDa C端轻链组成。(综述见Kaufman, Transfusion Med.Revs.6:235 (1992))。

[0006] 通过凝血酶对蛋白质链的蛋白酶切割，该异二聚体的生理激活发生。凝血酶将重链切割成90kDa蛋白质并随后切割成54kDa和44kDa片段。凝血酶还将80kDa轻链切割成72kDa蛋白质。正是后一种蛋白质和由钙离子结合在一起的两个重链片段(上文54kDa和44kDa片段)才构成活性FVIII。当44kDa A2重链片段从该分子解离或当72kDa和54kDa蛋白质由凝血酶、活化的蛋白C或FXa进一步切割时，失活发生。在血浆中，FVIII通过与50倍摩尔过量的VWF蛋白("VWF")缔合稳定，所述VWF蛋白似乎抑制蛋白酶解性破坏如上文所述的FVIII。

[0007] FVIII的氨基酸序列组织成三个结构域:330个氨基酸的三重A结构域、980个氨基酸的单个B结构域和150个氨基酸的重复C结构域。B结构域与其他蛋白质没有同源性并且提供这种蛋白质的25个潜在天冬酰胺(N)联糖基化位点中的18个。B结构域在凝血中明显没有功能并且可以缺失,而B-结构域缺失的FVIII分子仍具有促凝血活性。

[0008] 市场上的因子VIII产品目前作为因子VIII冻干制剂提供或者通过重组技术产生或从汇集的血浆纯化。冻干产品在施用之前重构。一旦重构,因子VIII的货架期相对短暂。因子VIII是相对不稳定的蛋白质,特别在水溶液中。已经描述在制造和储存期间通过与其他血浆蛋白复合、特别与血管性血友病因子(vWF)和白蛋白复合的稳定化作用见,例如,美国专利号6,228,613。美国专利号5,565,427公开了包含一个氨基酸的因子VIII或其盐或同源物之一及去垢剂或有机聚合物如聚乙二醇的稳定化制剂。美国专利号5,605,884公开了在氯化钙和高浓度氯化钠或氯化钾存在的情况下因子VIII在基于组氨酸缓冲液的高离子强度介质中的稳定化制剂。这类组合物显示显著地改善重构后含水形式的因子VIII的稳定性。通常认可了钙离子在因子VIII制剂中的重要性。根据美国专利号6,599,724,其他二价阳离子即 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 的存在,任选地在 Ca^{2+} 离子或 Mn^{2+} 离子存在的情况下,改善因子VIII的稳定性。WO2011/027152A1还描述了包含各种添加物的稳定的含水因子VIII组合物。

[0009] 考虑到冻干物重构后因子VIII的短货架期,需要增加重构的因子VIII在水溶液中稳定性的方法。出于不同原因,提供在液相具有增加的稳定性的纯化FVIII制备物是合乎需要的。首先,优点是在环境温度具有支持在环境温度制造纯化FVIII产物的足够时间跨度。具体而言,填充步骤需要储存某种液体散货以增加制造灵活性。其次,如果产品不能在重构后直接施加,液态的纯化FVIII的稳定性增加将对医师和患者而言是有优势的。并且最终,在连续输注条件下例如在住院患者中手术时使用FVIII取决于重构后优选高的产物稳定性(Takedani H., Haemophilia 2010, 16:740-746)。具有增加的稳定性的FVIII分子还将有利于开发适于液态条件下长期储存的FVIII制备物。

[0010] 本申请的发明人令人惊讶地发现冻干物重构后纯化因子VIII的稳定性在单链因子VIII构建体中实质地增强。这类构建体可以通过阻止蛋白酶剪切获得,所述蛋白酶剪切一般在因子VIII分泌之前出现在高尔基体区室中。单链构建体在纯化后在溶液中显示更好的稳定性/或当皮下施用时显示更好的生物利用率。

[0011] 发明简述

[0012] 在第一方面,本发明涉及一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包括防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。

[0013] 第一方面涵盖一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包括在制造因子VIII分子期间自始至终防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。

[0014] 第一方面进一步涵盖一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包括在纯化因子VIII分子之前防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。

[0015] 就本发明的这些方法而言,术语“在制造因子VIII分子期间自始至终”和“在纯化因子VIII分子之前”意指本发明的方法防止将因子VIII切割成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段,但是本发明的方法不阻止可以在施用重构的因子VIII分子后发生的因子VIII活化切割。通过本发明方法产生的因子VIII分子仍可以由凝血酶活化,所述凝血酶在Arg372、Arg740和Arg1689后切割因子VIII分子。

[0016] 在第二方面,本发明涉及一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包括失活在表达因子VIII分子的宿主细胞分泌所述因子VIII分子期间被切割的蛋白酶剪切位点,例外是信号序列和成熟因子VIII之间的切割位点。一般,至少50%由宿主细胞表达并分泌的因子VIII分子是单链因子VIII分子。优选地,至少60%、或至少70%、或至少80%、或至少90%、或至少95%由宿主细胞表达并分泌的因子VIII分子是单链因子VIII分子。

[0017] 优选地,该方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点并且如果存在于FVIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。可以通过缺失蛋白酶识别序列的一个或多个残基实现蛋白酶剪切位点的失活。例如,失活步骤可以包含从因子VIII序列缺失至少Arg1648。在一个实施方案中,失活步骤包括从因子VIII序列缺失至少从Arg1313至Arg1648的氨基酸序列。

[0018] 在本发明第一方面的另一个实施方案中,通过置换形成蛋白酶识别序列的一个或多个氨基酸残基实现蛋白酶剪切位点的失活。

[0019] 在又一个实施方案中(涉及保留包含Arg1313的B-结构域部分的那些FVIII变体),该方法进一步包括通过缺失或置换形成蛋白酶识别序列的一个或多个残基失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。在一个特别优选的实施方案中,该方法包括缺失来自因子VIII氨基酸序列的在残基Arg1313和Arg1648后包含两个蛋白酶切割位点的至少部分。

[0020] 进一步优选的是,选自因子VIII序列第741至1647位置处氨基酸的第一氨基酸与选自因子VIII序列第1649至1690位置处氨基酸的第二氨基酸融合,因而Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点和如果存在于FVIII分子中,Arg1313和Ala1314之间的切割位点失活。

[0021] 在另一个优选实施方案中,根据本发明第一或第二方面稳定化的因子VIII分子显示在水溶液中增加的稳定性。在水溶液中在25℃储存7日后,修饰的因子VIII分子的活性丧失优选地是小于15%。

[0022] 在另一个优选实施方案中,根据本发明第一或第二方面稳定化的因子VIII分子显示重构后在水溶液中增加的稳定性。

[0023] 在又一个优选的实施方案中,以相同剂量和以相同方式施用时,与人野生型因子VIII的生物利用率相比或与其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子相比,根据本发明第一或第二方面稳定化的因子VIII分子显示非静脉内注射后增加的生物利用率。在又一个优选的实施方案中,以相同剂量和以相同方式施用时,与其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子的生物利用率相比,根据本发明第一或第二方面稳定化的因子VIII分子显示非静脉内注射后增加的生物利用率。分别以相同剂量和以相同方式施用时,与人野生型因子VIII的生物利用率或其中Asn745与Pro1640融合的B-结

构域缺失的因子VIII分子的生物利用率相比,修饰的FVIII的生物利用率优选地增加至少25%。在另一个优选实施方案中,非静脉内注射是皮下、经皮或肌内注射。

[0024] 另一个优选实施方案是一种方法,其中(i)相对于人野生型因子VIII,该因子VIII显示出静脉内施用后改善的血浆半寿期;优选地其中相对于人野生型因子VIII,血浆半寿期改善至少40%,或(ii)其中相对于人野生型因子VIII,该因子VIII显示静脉内施用后在血友病A小鼠中随时间推移如凝血酶生成测定法中所测定的凝血酶峰水平降至50nM以下的更长时间段;优选地其中相对于人野生型因子VIII,这个时间段延长至少10个小时,或(iii)其中相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII,因子VIII在已经在37℃于人血浆中温育4日后保留如通过一步FVIII:C测定法所测定的更高活性;优选地其中相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII的活性,保留的因子VIII活性是至少10%更高。

[0025] 该方法还可以包括步骤

[0026] (i) 提供核酸,所述核酸编码其中Arg1648和Glu1649之间以及Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点失活的修饰的因子VIII分子,

[0027] (ii) 用所述核酸转化宿主细胞,

[0028] (iii) 在如此条件下培养转化的宿主细胞,从而表达修饰的因子VIII分子,并且

[0029] (iv) 从宿主细胞或从培养基回收修饰的因子VIII分子。

[0030] 在另一个方面,本发明涉及一种改善因子VIII分子在非静脉内施用后的生物利用率的方法,所述方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点,和如果存在于FVIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。优选地,非静脉内注射是皮下注射。分别以相同剂量和以相同方式施用时,与人野生型因子VIII的生物利用率或其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子的生物利用率相比,皮下注射后的生物利用率优选地增加至少25%。

[0031] 在另一个方面,本发明涉及一种相对于人野生型因子VIII,改善因子VIII分子在静脉内施用后的血浆半寿期的方法,所述方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点,并且如果存在于FVIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。

[0032] 在另一个方面,本发明涉及一种相对于人野生型因子VIII,延长静脉内施用后在血友病A小鼠中随时间推移如凝血酶生成测定法中所测定的凝血酶峰水平降至50nM以下的时间段的方法,所述方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点,和如果存在于FVIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。

[0033] 在另一个方面,本发明涉及一种相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII,保留在已经在37℃于人血浆中温育4日后如通过一步FVIII:C测定法所测定的因子VIII分子更高活性的方法,所述方法包括失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点,并且如果存在于FVIII分子中,失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。

[0034] 上文所述方法的一个优选实施方案是这些方法,其中选自因子VIII序列第741至1647位置处氨基酸的第一氨基酸与选自因子VIII序列第1649至1690位置处氨基酸的第二氨基酸融合,因而Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点和如果存在于FVIII分子中,Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点失活。

[0035] 已作必要修正的情况下,不同方面的优选实施方案是适用的。

[0036] 在又一个方面,本发明涉及一种包含单链因子VIII分子的药物制品,用于通过以下方式治疗或预防出血障碍、优选地血友病A: (i) 在一方面,非静脉内施用,其中以相同剂量和以相同方式施用时,与人野生型因子VIII相比或与其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子相比,所述单链因子VIII分子的生物利用率增加至少25%,或(ii) 在另一方面,静脉内施用,其中(a) 以相同剂量和以相同方式施用时,相对于人野生型因子VIII,所述单链因子VIII分子在静脉内施用后的血浆半寿期增加至少40%、或(b) 以相同剂量和以相同方式施用,相对于人野生型因子VIII,单链因子VIII分子显示出静脉内施用后在血友病A小鼠中随时间推移如凝血酶生成测定法中所测定的凝血酶峰水平降至50nM以下的时间段延长至少10小时。

[0037] 在又一个方面,本发明涉及一种包含单链因子VIII分子的药物制品,用于治疗或预防出血障碍、优选地血友病A,其中相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII,单链因子VIII分子在已经在37℃于人血浆中温育4日后保留如通过一步FVIII:C测定法所测定的至少10%更高活性。

[0038] 在又一个方面,本发明涉及一种包含单链因子VIII分子的药物制品,用于通过非静脉内施用治疗或预防出血障碍、优选地血友病A,其中以相同剂量和以相同方式施用以实现血液中相同的止血活性时,与其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子的剂量相比,所述FVIII分子的剂量可以降低至少25%。

[0039] 在另一个方面,本发明涉及单链因子VIII分子用于实现重构后增加的稳定性或用于治疗出血障碍的药物制品的更长货架期的用途,其中(i) 在重构并且重构后室温储存7日之后,包含单链因子VIII分子的药物制品的因子VIII活性高于包含相同量其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子的药物制品至少10%,或(ii) 其中相对于相同浓度的已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII,单链因子VIII分子在37℃于人血浆中温育4日时保留如通过一步FVIII:C测定法所测定的至少10%更高活性。

[0040] 附图简述

[0041] 图1描述实施例1的结果。各种因子VIII分子已经作为水溶液提供,并且已经在7日时间段范围内监测它们的稳定性。与异二聚(双链)全长因子VIII分子(**Beriate**[®]和**Helixate**[®])并与B-结构域缺失的异二聚(双链)构建体(**ReFacto**[®])相比,对于单链因子VIII分子而言,储存7日后的活性丧失小得多。

[0042] 图2描述实施例2的结果。将多种冻干的因子VIII制备物重构成水溶液,并且已经在7日时间段范围内监测它们的稳定性。与异二聚(双链)全长因子VIII分子(**Advate**[®])和B-结构域缺失的异二聚(双链)构建体(**ReFacto**[®])相比,对于单链因子VIII分子而言,储存7日后的活性丧失小得多。

[0043] 图3描述实施例3的结果。三种不同的因子VIII分子已经在小鼠中皮下注射并且已经如实施例2中所述测定它们的生物利用率。单链因子VIII分子的生物利用率实质地高于双链和全长因子VIII(**Advate**[®])或B-结构域缺失的异二聚(双链)构建体(**ReFacto**[®])。

[0044] 图4描述实施例4的结果。将本发明的因子VIII分子和二种商业可获得的FVIII制品在纯化、冻干和重构后在37℃温育。将FVIII-样品在37℃温育不同的时间段(0、0.25、1、2、4和8日)并且通过一步凝血测定法确定FVIII:C活性。显示的值代表两份样品的均值和标

准偏差(例外是0.25日,仅一份样品)。

[0045] 图5描述实施例5的部分结果。在以剂量250IU/kg单次静脉内注射至食蟹猴后,确定scFVIII和全长rFVIII (**Advate**[®], Baxter Healthcare) 的药物代谢动力学(PK) 曲线。

[0046] 图6描述实施例5的部分结果。在以剂量100IU/kg单次静脉内注射至血友病A小鼠后,确定全长rFVIII (**Advate**[®], Baxter Healthcare) 的药物代谢动力学(PK) 曲线。

[0047] 图7描述实施例6的部分结果。在scFVIII或全长rFVIII (**Advate**[®], Baxter Healthcare) 以剂量250IU/kg施用至血友病A小鼠后确定从第1日-第8日的平均峰凝血酶水平。

[0048] 图8描述实施例7的结果。以剂量100IU/kg单次静脉内注射至VWF缺陷小鼠后确定全长rFVIII (**Advate**[®], Baxter Healthcare) 和B-结构域缺失的因子VIII (**ReFacto**[®], Pfizer) 的药物代谢动力学(PK) 曲线。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明涉及用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包括防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。

[0051] 本发明还涉及一种用于增加因子VIII分子在纯化、冻干和重构后的稳定性的方法,所述方法包含失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点和如果存在于因子VIII分子中,任选地失活Arg1313和Ala1314之间的蛋白酶剪切位点。

[0052] 因子VIII

[0053] 术语“凝血因子VIII)”、“因子VIII”和“FVIII”在本文中互换地使用。成熟人因子VIII由布置在以下结构域结构中的2332个氨基酸组成:

[0054]

A1	a1	A2	a2	B	a3	A3	C1	C2
----	----	----	----	---	----	----	----	----

[0055] A1:残基1-336,

[0056] A2:残基373-710,

[0057] B:残基741-1648,

[0058] A3:残基1690-2019,

[0059] C1:残基2020-2172,和

[0060] C2:残基2173-2332。

[0061] 此外,存在三个酸性区域a1 (337-372)、a2 (711-740) 和a3 (1649-1689)。已知酸性区域a3参与因子VIII分子与凝血中发挥重要作用的血管性血友病因子(vWF) 结合。在分泌期间,FVIII在B-结构域和a3酸性区域之间被切割,产生异二聚多肽。因子VIII异二聚体由一条轻链(包含A3、C1和C2) 和一条大小可变的重链(包含A1、A2和B) 组成。后者是不均一的,原因在于B-结构域内部受有限的蛋白酶解作用。在B-结构域缺失的异二聚构建体的情况下,“重链”包含A1和A2,但是缺少部分或全部的B-结构域。

[0062] 在SEQ ID NO:2中显示成熟野生型形式的人凝血因子VIII的氨基酸序列。具体序列的氨基酸位置的指示意指所述氨基酸在FVIII野生型蛋白质中的位置并且不排除在所指序列中其他位置处存在突变,例如缺失、插入和/或置换。例如,相对于SEQ ID NO:2提到的

“Glu2004”中的突变不排除在修饰的同源物中,在SEQ ID NO:2的第1至2332位置处的一个或多个氨基酸丢失。在SEQ ID NO:1中显示编码SEQ ID NO:2的DNA序列。

[0063] “凝血因子VIII”包括野生型凝血因子VIII以及具有野生型凝血因子VIII促凝血活性的野生型凝血因子VIII衍生物。与野生型因子VIII的氨基酸序列相比,衍生物可以具有缺失、插入和/或添加。优选的衍生物是其中已经缺失全部或部分B-结构域的FVIII分子。本申请中自始至终所指的氨基酸位置总是指全长成熟(即在切除信号肽后)野生型FVIII中相应氨基酸的位置。

[0064] 术语“因子VIII”包括具有至少10%、优选地至少25%、更优选地至少50%、最优选地至少75%的野生型因子VIII生物活性的任何因子VIII变体或突变体。确定因子VIII生物活性的合适试验是一步或两步凝血测定法(Rizza等人,1982.Coagulation assay of FVIII:C and FIXa in Bloom编著,The Hemophilias.NY Churchill活1992)或生色底物FVIII:C测定法(S.Rosen,1984.Scand J Haematol33:139-145,增刊)。这些文献中的内容通过引用的方式并入本文中。

[0065] 作为非限制性例子,因子VIII分子包括阻止或减少APC切割的因子VIII突变体(Amano1998.Thromb.Haemost.79:557-563)、融合白蛋白的FVIII分子(W02011/020866A2)、FVIII-Fc融合分子(W004/101740A)、进一步稳定化A2结构域的因子VIII突变体(W097/40145)、导致表达增加的FVIII突变体(Swaroop等人,1997.JBC272:24121-24124)、免疫原性降低的因子VIII突变体(Lollar1999.Thromb.Haemost.82:505-508)、从差异表达的重链和轻链重构的FVIII(Oh等人,1999.Exp.Mol.Med.31:95-100)、减少与受体结合从而导致FVIII样HSPG(硫酸类肝素蛋白聚糖)和/或LRP(低密度脂蛋白受体相关蛋白)分解代谢的FVIII突变体(Ananyeva等人,2001.TCM,11:251-257)、二硫键稳定化的FVIII变体(Gale等人,2006.J.Thromb.Hemost.4:1315-1322)、分泌特改善的FVIII突变体(Miao等人,2004.Blood103:3412-3419)、辅因子特异活性增加的FVIII突变体(Wakabayashi等人,2005.Biochemistry44:10298-304)、生物合成及分泌改善、ER伴侣蛋白相互作用降低、ER-高尔基体运输改善、活化或抗失活性增加和半寿期改善的FVIII突变体(Pipe2004年综述,Sem.Thromb.Hemost.30:227-237)和缺失全部或部分B-结构域的FVIII突变体(见,例如,W02004/067566A1、W002/102850A2、W000/24759A1和美国专利号4868,112)。全部这些因子VIII突变体和变体均通过引用方式完整并入本文。

[0066] 术语“单链因子VIII”指从表达所述FVIII分子的细胞分泌期间尚未以蛋白酶解方式切割成两条链(例如重链和轻链)并因此作为单条多肽链存在的因子VIII分子。

[0067] 防止切割

[0068] 本发明的方法包括防止将因子VIII分子经蛋白酶剪切成基本上包含A1结构域和A2结构域的第一片段和基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域的第二片段。术语“防止蛋白酶剪切”包括部分防止蛋白酶剪切和彻底防止蛋白酶剪切。它进一步包括实施方案“减少蛋白酶剪切”。换言之,“防止因子VIII分子的蛋白酶剪切”不需要彻底取消任何蛋白酶剪切,从而基本上100%由宿主细胞表达并分泌的因子VIII分子是单链分子(不过,这个实施方案由本发明的方法涵盖)。通常,以如此方式防止因子VIII分子的蛋白酶剪切,从而至少50%、优选地至少60%、更优选地至少70%、更优选地至少80%、更优选地至少90%、最优选地至少95%由宿主细胞表达并分泌的因子VIII分子是单链分子。不彻底地防止裂解可以至少部

分地归因于以下事实：在B结构域内部可能存在一些次要切割位点，所述次要切割位点可以导致小部分因子VIII分子的蛋白酶剪切，即便主要切割位点（在R1313和R1648处）不存在。根据本发明可以防止或可以不防止这种次要裂解。

[0069] 第一片段基本上包含因子VIII的A1结构域和A2结构域。第一片段可以包含A1结构域和A2结构域，每个结构域精确地具有上文所示的氨基酸序列。例如，第一片段可以至少包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的第1至740位氨基酸。可选地，第一片段可以包含这种序列的变体，其具有基本上不影响因子VIII活性的氨基酸缺失、置换和/或插入。第一片段可以额外地包含因子VIII的B结构域的N端部分。

[0070] 第二片段基本上包含A3结构域、C1结构域和C2结构域。第二片段可以包含A3结构域、C1结构域和C2结构域，每个结构域精确地具有上文所示的氨基酸序列。例如，第二片段可以至少包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列的第1690至2332位氨基酸。可选地，第二片段可以包含这种序列的变体，其具有基本上不影响因子VIII活性的氨基酸缺失、置换和/或插入。第二片段可以额外地包含酸性a3区域的C端部分。

[0071] 本发明的方法包括在重组表达的FVIII分子分泌期间防止将导致异二聚（双链）多肽的蛋白酶剪切。即，该方法包括获得单链因子VIII分子。这可以按多种方式实现，例如通过失活参与将成熟单链FVIII胞内加工成最终由宿主细胞分泌的异二聚FVIII的蛋白酶剪切位点。

[0072] 在一个实施方案中，失活Arg1648和Glu1649之间的蛋白酶剪切位点的步骤包括缺失形成蛋白酶识别序列的一个或多个氨基酸。残基1648后的切割位点是弗林蛋白酶型切割位点。因子VIII序列中该蛋白酶的识别序列是LKRHRQR。优选地，失活步骤包括缺失形成该识别序列的这些氨基酸残基中的1个、2个、3个、4个、5个或更多个氨基酸。优选地，失活步骤包括缺失识别序列内部的至少一个碱性氨基酸，更优选地，失活步骤包括缺失至少第1648位置处的精氨酸。仍更优选地，失活步骤包括缺失因子VIII序列的至少第1643至1648位氨基酸。如果相应的FVIII衍生物包含Arg1313，则失活步骤还包括缺失至少位置Arg1313处的精氨酸。仍优选地是缺失因子VIII序列的至少第1313至1648位氨基酸以分别失活第1313和1648位置后的两个切割位点。

[0073] 最优选地，失活步骤包括缺失至少来自因子VIII序列的从第800至1648位残基的氨基酸序列，例如来自因子VIII序列的从第741至1648位残基的氨基酸序列。在另一个优选实施方案中，选自因子VIII序列第741至1647位置处氨基酸的第一氨基酸与选自因子VIII序列第1649至1690位置处氨基酸的第二氨基酸融合，从而防止分泌期间的蛋白酶剪切。优选的缺失如下：

[0074] 氨基酸740与氨基酸1650融合，因而氨基酸741至1649缺失；

[0075] 氨基酸740与氨基酸1690融合，因而氨基酸741至1689缺失；

[0076] 氨基酸740与氨基酸1669融合，因而氨基酸741至1668缺失；

[0077] 氨基酸743与氨基酸1650融合，因而氨基酸744至1649缺失；

[0078] 氨基酸764与氨基酸1650融合，因而氨基酸765至1649缺失；

[0079] 氨基酸764与氨基酸1653融合，因而氨基酸765至1652缺失；

[0080] 氨基酸764与氨基酸1656融合，因而氨基酸765至1655缺失；

[0081] 氨基酸745与氨基酸1650融合，因而氨基酸746至1649缺失；

- [0082] 氨基酸745与氨基酸1653融合,因而氨基酸746至1652缺失;
- [0083] 氨基酸745与氨基酸1656融合,因而氨基酸746至1655缺失;
- [0084] 氨基酸757与氨基酸1650融合,因而氨基酸758至1649缺失;
- [0085] 氨基酸757与氨基酸1653融合,因而氨基酸758至1652缺失;
- [0086] 氨基酸757与氨基酸1656融合,因而氨基酸758至1655缺失;
- [0087] 氨基酸793与氨基酸1649融合,因而氨基酸794至1648缺失;
- [0088] 氨基酸793与氨基酸1690融合,因而氨基酸794至1689缺失;
- [0089] 氨基酸747与氨基酸1649融合,因而氨基酸748至1648缺失;
- [0090] 氨基酸751与氨基酸1649融合,因而氨基酸752至1648缺失;
- [0091] 氨基酸776与氨基酸1649融合,因而氨基酸777至1648缺失;
- [0092] 氨基酸770与氨基酸1667融合,因而氨基酸771至1666缺失。
- [0093] 因缺失产生的分子通常以单链因子VIII分子形式获得。

[0094] 优选的单链FVIII分子具有全部或部分B-结构域的缺失和全部或部分酸性a3区域的缺失,从而在Arg1648的切割位点(通常在分泌期间被切除)缺失。单链FVIII分子在例如W02004/067566A1;US2002/132306A1;Krishnan等人,(1991)European Journal of Biochemistry第195卷,第3期,第637-644页;Herlitschka等人,(1998)Journal of Biotechnology,第61卷,第3期,第165-173页;Donath等人,(1995)Biochem.J.,第312卷,第49-55页中公开。这些参考文献中所述的这些单链因子VIII分子通过引用方式并入本文。

[0095] 上文所提及的融合物可以是直接融合物或间接融合物。在后一种情况下,缺失的氨基酸由异源间隔序列替换。本文中更详细地描述这个实施方案。可能将缺失的个氨基酸替换为由约1个至约500个氨基酸,或约2个至250个氨基酸,或约3个至约100个氨基酸,或约4个至约50个氨基酸,或约5个至约10个氨基酸组成的肽接头。肽接头应当是柔性的并且没有免疫原性(Robinson等人,PNAS(1998),第95卷,第5929页)。肽接头可以由Gly组成,其中相对于所述Gly在N端前接由氨基酸序列多聚体GlyGlySer或GlyGlySerSer或其任意组合,在一个具体实施方案中,肽接头由80至120个氨基酸组成。

[0096] 在一个备选实施方案中,在残基1313和1648处形成蛋白酶识别位点的一个或多个氨基酸可以用另一种氨基酸置换,从而切割不发生。例如,可以将碱性氨基酸替换为疏水性氨基酸。

[0097] 单链因子VIII的制备

[0098] 在纯化、冻干和重构因子VIII之前实施“防止蛋白酶剪切”或“失活蛋白酶剪切位点”的步骤。“防止蛋白酶剪切”或“失活蛋白酶剪切位点”的步骤一般在制备因子VIII分子期间实施。本发明的方法可以包括在(宿主细胞中)表达因子VIII分子期间防止蛋白酶剪切或在制备编码因子VIII分子的核酸期间失活Arg1313和/或Arg1648处的蛋白酶剪切位点。

[0099] 根据上文描述的实施方案,这些“防止蛋白酶剪切”或“失活蛋白酶剪切位点”的步骤可以包括从编码因子VIII的核酸移除编码Arg1313和/或Arg1648处的蛋白酶剪切位点的部分。这一般导致编码单链因子VIII的核酸。通常,本发明的方法还可以包括提供编码单链因子VIII的核酸,例如在表达质粒或载体中。

[0100] 随后可以将该核酸、表达载体或表达质粒引入宿主细胞、优选地哺乳动物宿主细胞中用于表达。本发明的方法还可以包括在合适条件下培养该宿主细胞,从而表达修饰的

因子VIII分子,例如单链因子VIII分子;和任选地从该宿主细胞或从培养基回收(例如纯化)修饰的因子VIII分子。通常,操作编码因子VIII的核酸、培养哺乳动物细胞以允许因子VIII表达和从细胞培养基纯化因子VIII的技术是本领域已知的。

[0101] 优选将单链因子VIII分子纯化至 $\geq 80\%$ 纯度,更优选地 $\geq 95\%$ 纯度并且特别优选是相对于掺杂性大分子,尤其其他蛋白质或/和核酸而言纯度大于99.9%的药用纯状态并且不含传染介质和致热物质。优选地,分离或纯化的修饰因子VIII分子基本上不含其他多肽。

[0102] 本发明的方法还可以包括纯化、冻干和重构单链因子VIII的步骤。重构优选地通过使用水,例如“注射用水”实施。

[0103] 稳定性

[0104] 相对于全长因子VIII和/或相对于其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即B基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的-结构域缺失的因子VIII分子),根据本发明制备的因子VIII分子显示出增强的稳定性。

[0105] 如本文所用,术语“稳定性”指在水溶液中的稳定性,优选地指冻干的因子VIII制备物重构后水溶液中的稳定性,例如通过添加水至冻干的因子VIII制备物。一般,冻干的因子VIII制备物用“注射用水”重构。

[0106] 水溶液中的稳定性可以通过提供水溶液中的因子VIII分子并将它温育某个时间段来确定。在一个优选实施方案中,用于确定因子VIII分子储存稳定性的条件如下:

[0107] 在具有以下组成的水溶液中提供因子VIII分子:

	L-组氨酸	25mM
[0108]	NaCl	225mM
	氯化钙	4mM
	Tween®80	0.03%(w/w)
	蔗糖	2%(w/w)
[0109]	D-甘露醇	8%(w/w)
	pH7.0.	

[0110] 这种溶液在下文称作“缓冲液A”。水溶液中的因子VIII初始活性优选地在100IU/ml和1,500IU/ml之间,优选地其是100IU/ml。

[0111] 如此制备的因子VIII溶液随后可以在25℃温育至少24小时,优选地至少两日,更优选地至少五日,最优选地七日或八日。在温育时间后,通过测量溶液中的因子VIII活性,优选地通过使用生色底物测定法(例如Coamatic®因子VIII,Chromogenix)确定稳定性。活性相对于初始活性丧失得越低,则因子VIII分子的稳定性越高。最优选地,如下文实施例1或2中那样确定稳定性。

[0112] 根据本发明,在以上确定的条件下储存7日后单链因子VIII的因子VIII活性丧失小于15%、优选地小于12%、最优选地小于10%。

[0113] 一般,将温育时间开始(t=0)处的因子VIII初始活性归一化至100%。在25℃在缓冲液A中储存24小时后的因子VIII残余活性优选地是因子VIII初始活性的至少95%。在25℃在

缓冲液A中储存48小时后的因子VIII残余活性优选地是因子VIII初始活性的至少95%。在25℃在缓冲液A中储存4日后的因子VIII残余活性优选地是因子VIII初始活性的至少90%、更优选地至少95%。在25℃在缓冲液A中储存7日后的因子VIII残余活性优选地是因子VIII初始活性的至少85%、更优选地至少90%、最优选地至少95%。在25℃在缓冲液A中储存8日后的因子VIII残余活性优选地是因子VIII初始活性的至少85%、更优选地至少90%、最优选地至少95%。

[0114] 单链因子VIII的因子VIII残余活性是通常高于双链因子VIII分子的因子VIII残余活性(假定两种分子已经在相同条件下温育相同时间段)。

[0115] 术语“人全长双链因子VIII”在本文中可与术语“人野生型因子VIII”互换使用。

[0116] 在一个实施方案中,单链因子VIII的因子VIII残余活性高于人全长双链因子VIII的因子VIII残余活性。在另一个实施方案中,单链因子VIII的因子VIII残余活性高于其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子)的因子VIII残余活性。

[0117] 优选地,在25℃在缓冲液A中储存48小时后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过人全长双链因子VIII的因子VIII残余活性至少4个百分点。还优选,在25℃在缓冲液A中储存48小时后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子)的因子VIII残余活性至少4个百分点。

[0118] 在另一个实施方案中,在25℃在缓冲液A中储存4日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过人全长双链因子VIII的因子VIII残余活性至少5个百分点。还优选,在25℃在缓冲液A中储存4日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子)的因子VIII残余活性至少5个百分点。

[0119] 在另一个实施方案中,在25℃在缓冲液A中储存7日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过人全长双链因子VIII的因子VIII残余活性至少5个百分点、优选地至少10个百分点。还优选,在25℃在缓冲液A中储存7日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子)的因子VIII残余活性至少5个百分点、优选地至少10个百分点。

[0120] 在另一个实施方案中,在25℃在缓冲液A中储存8日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过人全长双链因子VIII的因子VIII残余活性至少5个百分点、优选地至少10个百分点。还优选,在25℃在缓冲液A中储存8日后单链因子VIII的因子VIII残余活性超过其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子)的因子VIII残余活性至少5个百分点、优选地至少10个百分点。

[0121] 对于缓冲液A,可选地也可以使用其他缓冲液,例如在本发明的实施例2中使用的缓冲液。

[0122] 本发明缓冲液的优选pH范围是从5.5至9.0的pH范围,优选地是从6.0至8.5的pH范

围并特别优选是从6.5至8.0的pH范围。

[0123] 可以通过生色性或凝血测定法或任何其他生物测定法确定因子VIII的活性。优选地,如下文实施例1中所显示那样确定因子VIII活性。

[0124] 生物利用率

[0125] 在另一个实施方案中,与双链人野生型因子VIII相比或与B-结构域缺失的双链人因子VIII相比,根据本发明稳定化的因子VIII分子显示在非静脉内注射后改善的生物利用率。非静脉内注射优选地是皮下、经皮或肌内注射。最优选地,非静脉内注射是皮下注射。

[0126] 如本文所用,术语“生物利用率”指在皮下、静脉内或皮内施用后可以在血浆中在预定时间直至最终时间点检测到的因子VIII或FVIII相关制备物的所施用剂量的比例。一般,在试验动物中通过以下方式测量生物利用率:施用10IU/kg和1000IU/kg制备物之间的剂量(例如400IU/kg体重);在施用后的预定时间点获得血浆样品;并且使用一种或多种生色或凝血测定法(或任何生物测定法)、免疫测定法或其等同物确定样品中因子VIII或因子VIII相关多肽的含量。生物利用率表述为y-轴上血浆中凝血因子浓度或活性的曲线下面积(AUC)和x-轴上施用后的时间直至施用后预定最终时间点。优选地,这个预定时间点是施用后72小时或48小时。最优选地,如下文实施例3中所显示那样确定生物利用率。试验制备物的相对生物利用率指试验制备物(这里,单链因子VIII)的AUC和按照与试验制备物相同的剂量和方式(例如静脉内、皮下或皮内)施用的参考制备物(例如全长重组双链因子VIII或B-结构域缺失的双链因子VIII)的AUC之间的比率。

[0127] 根据本发明,皮下注射后单链因子VIII的生物利用率高于双链人野生型因子VIII或B-结构域缺失的双链人因子VIII的生物利用率。优选地,相对于野生型FVIII,生物利用率(皮下注射后72范围内的AUC)增加至少10%、更优选地至少25%、更优选地至少50%、最优选地至少75%。在另一个实施方案中,相对于其中Asn745与Pro1640融合的B-结构域缺失的因子VIII分子(即基本上由SEQ ID NO:2的第1-745位和第1640-2332位氨基酸组成的B-结构域缺失的因子VIII分子),生物利用率(皮下注射后72范围内的AUC)增加至少10%、更优选地至少20%、更优选地至少至少30%、最优选地至少40%。

[0128] 改善(体内)血浆半寿期

[0129] 在另一个实施方案中,根据本发明稳定化的因子VIII分子显示出增加的药物代谢动力学(PK)参数。

[0130] 可以通过例如分别以如生色测定法中所确定的剂量100IU/kg或250IU/kg静脉内注射至不同物种如血友病A小鼠或食蟹猴中测试本发明的因子VIII分子。在施用后的各个时间点例如在血友病A小鼠中直至72小时(hrs)和例如在食蟹猴中直至24小时抽取血液样品。立即制备柠檬酸盐血浆并且将其用于例如通过生色测定系统(FVIII:C) (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA,米兰,意大利)定量FVIII:C。

[0131] 使用线性梯形法计算血浆中FVIII水平的AUC以计算AUC_{最后}:从t=0至最后观察结果。使用通过调整的R²标准所选择的终末期的多个点,通过对数线性回归确定终末半寿期($t_{1/2\beta}$)。AUC:从自t=0至无限(通过使用终末期的回归模型外推)。

[0132] 相比于以相同剂量和以相同方式施用的人野生型因子VIII的终末半寿期,本发明的单链FVIII分子显示至少40%、优选地至少50%、甚至更优选地至少60%增加的终末半寿期。

[0133] 优选地如实施例5中所示那样确定血浆半寿期。

[0134] 延长如凝血酶生成测定法中所测定的功效(体内)

[0135] 在另一个实施方案中,根据本发明稳定化的因子VIII分子显示出相对于人野生型因子VIII,在静脉内施用后在血友病A小鼠中随时间推移如凝血酶生成测定法中所测定的凝血酶峰水平降至50nM以下的更长时间段。这个试验显示FVIII的功能性也在本发明分子中稳定化。

[0136] 可以通过首先以等摩尔剂量(例如以250IU/kg)静脉内施用本发明的FVIII分子至血友病A小鼠中,测试本发明的FVIII分子。在不同时间点(例如从第1日至第8日每天),采集柠檬酸化血液并且进行凝血酶生成测定法(TGA),例如在磷脂(例如Rossix, **Mölndal**,瑞典)/**Pathromtin**[®]SL(Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH,Marburg,德国)(1:30)存在下内在活化后通过校准的凝血酶记录法(thrombinography)(CAT)(Thrombinoscope,荷兰)进行。记录凝血酶峰水平。通过线性梯形法计算从第1-8日凝血酶峰水平的平均AUC。在每个时间点和治疗组存在变量方差的线性模型中使用近似F-检验针对AUC的差异比较两种因子VIII产品的AUC,产生估计的时间直至凝血酶峰水平降低范围50nM的限定限值以下。

[0137] 优选地,如实施例6中所示那样确定凝血酶生成测定法中的功效。

[0138] 在血友病A小鼠中,与人野生型因子VIII相比,scFVIII显示有利的止血活性。这转换成在凝血酶峰水平下降低于50nM水平之前,相对于全长rFVIII,scFVIII的平均化至少10小时更长、优选地至少15小时更长和甚至更优选地至少20小时更长的凝血酶生成活性值。

[0139] 在血浆中保留更高FVIII:C活性(离体)

[0140] 在另一个实施方案中,根据本发明稳定化的因子VIII分子保留相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII,在已经在37℃于人血浆中温育4日后保留如通过一步FVIII:C测定法所测定的更高活性;优选地其中相对于已经在37℃于人血浆中温育4日后的人野生型因子VIII的活性,保留的因子VIII活性是至少10%更高。

[0141] 具有本发明因子VIII分子的样品可以通过将它们随缺乏FVIII的血浆(例如来自Siemens Healthcare Diagnostics)一起稀释成1IU/mL FVIII:C(基于通过生色底物测定法确定的值)来测试。随后将FVIII-样品在0.05%叠氮钠存在下在37℃温育不同的时间段(例如0、0.25、1、2、4和8日)。在每个温育时间后,FVIII:C随后由一步凝血测定法确定,例如通过使用Pathromtin-SL(Siemens Healthcare Diagnostics)作为激活物来确定,针对t=0(%FVIII:C)处的值归一化并且相对于温育时间作图。

[0142] 在37℃温育4日后,本发明的因子VIII分子已经保留至少10%更高的FVIII:C活性、优选地至少15%更高的FVIII:C活性、优选地至少20%更高的FVIII:C活性、优选地至少25%更高的FVIII:C活性、优选地至少30%更高的FVIII:C活性。

[0143] 优选地如实施例4中所示那样确定血浆中的活性。

[0144] 治疗和预防

[0145] 可以在治疗或预防出血障碍时施用重构后具有增加的稳定性的本发明单链因子VIII构建体。

[0146] 如本文所用,术语“出血障碍”包括家族性和获得性血友病A和B,家族性或获得性von Willebrand病,家族性或获得性任何凝血因子缺乏症、导致从单个器官、骨折或从多发伤严重出血的全部类型的创伤、钝器伤或穿刺伤、手术操作期间出血(包括手术前后或术

后出血)、因心脏手术所致的出血(包括患者在儿科心脏手术中接受体外循环和血液稀释)、脑内出血、蛛网膜下出血,硬膜下或硬膜外出血、因失血和血液稀释所致、因导致受累患者凝血因子水平降低的非血浆容积置换所致的出血、因弥漫性血管内凝血(DIC)和消耗性凝血病、血小板功能障碍、耗尽和凝血病所致的出血、因肝硬化,肝功能障碍和暴发性肝衰竭,肝病患者中肝脏活组织检查所致的出血、肝脏和其他器官移植后出血、来自胃血管曲张的出血和消化性溃疡出血、妇科出血如功能障碍性子官出血(DUB)、胎盘早剥、低出生体重儿童中脑室周围出血、产后出血、新生儿致死性呼吸窘迫、与相关的出血烧伤、与淀粉样变相关的出血、与血小板疾病相关的造血干细胞移植、与恶性肿瘤相关的出血、出血性病毒感染、与胰腺炎相关的出血。

[0147] 药物制品的组分可以溶解于常规生理相容性缓冲水溶液中,其中可以向所述水溶液任选地添加药物赋形剂以提供该药物制品。药物制品的组分可以已经含有全部必需药物、生理相容性赋形剂并可以溶解于注射用水中以提供该药物制品。

[0148] 这类药用载体和赋形剂以及适宜药物制剂的制备是本领域熟知的(见例如“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”,Frokjaer等人,Taylor和Francis(2000)或“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第3版,Kibbe等人,Pharmaceutical Press(2000))。在某些实施方案中,药物组合物可以包含至少一种添加物如填充剂、缓冲剂或稳定剂。标准药物制剂技术是本领域技术人员熟知的(见,例如,2005Physicians' Desk **Reference**®,Thomson Healthcare:Montvale,NJ,2004;Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Gennaro等人,编著Lippincott Williams&Wilkins:Philadelphia,PA,2000)。合适的药物添加物包括例如糖,如甘露醇、山梨醇、乳糖、蔗糖、海藻糖或其他、氨基酸,如组氨酸、精氨酸、赖氨酸、甘氨酸、丙氨酸、亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、苯丙氨酸或其他、实现等渗条件的添加物,如氯化钠或其他盐、稳定剂,如聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、聚乙二醇、丙二醇、氯化钙或其他、生理学pH缓冲剂,如三(羟甲基)氨基甲烷等。在某些实施方案中,药物组合物可以含有pH缓冲试剂和润湿剂或乳化剂。在其他实施方案中,组合物可以含有防腐剂或稳定剂。具体而言,包含凝血因子的药物制品可以按冻干或稳定可溶性形式配制。凝血因子可以通过本领域已知的多种方法冻干。在使用之前,通过添加一种或多种药学上可接受的稀释剂如无菌注射用水或无菌生理盐水溶液或合适的缓冲溶液使冻干制剂重构。

[0149] 在本发明的药物制品中所含有的组合物可以通过任何药学上合适的手段递送至个体。各种递送系统是已知的并且可以用来通过任何便利途径施用组合物。优选地,通过非静脉内注射递送在本发明的药物制品中所含有的组合物至个体。更优选地,配制本发明的组合物用于皮下、肌内、腹膜内、脑内、肺内、鼻内、皮内或经皮施用,最优选地根据常规方法用于皮下、肌内或透皮施用。可以通过输注或通过快速浓注连续地施用制剂。一些制剂可以包含缓释系统。

[0150] 将本发明的药物制品的组合物以治疗有效剂量施用至患者,所述治疗有效剂量意指足以在没有达到产生不可忍受不良副作用的剂量的情况下,产生所需作用、防止或减轻正在治疗的病状或适应症的严重性或扩散的剂量。确切剂量取决于许多因素,例如适应症、制剂、施用模式并且不得不在临床前试验和临床试验中针对每种相应的适应症确定。

[0151] 在本发明的一个实施方案中,凝血因子在治疗的受试者中的血浆水平在注射后5小时至非静脉内注射后8小时的时段期间连续地高于健康受试者中凝血因子的正常血浆水平2%、优选地高于5%、更优选地高于8%、最优选地高于10%。如下文实施例3中所示那样确定血浆水平。

[0152] 在本发明的一个实施方案中,凝血因子在治疗的受试者中的血浆水平在注射后4小时至非静脉内注射后16小时的时段期间连续地高于健康受试者中凝血因子的正常血浆水平2%、优选地高于5%、更优选地高于8%、最优选地高于10%。

[0153] 在本发明的另一个实施方案中,凝血因子在治疗的受试者中的血浆水平在注射后3小时至非静脉内注射后24小时的时段期间连续地高于健康受试者中凝血因子的正常血浆水平2%、优选地高于4%、更优选地高于6%、最优选地高于8%。

[0154] 在本发明的另一个实施方案中,凝血因子在治疗的受试者中的血浆水平在注射后2小时至非静脉内注射后32小时的时段期间连续地高于健康受试者中凝血因子的正常血浆水平2%、优选地高于3%、更优选地高于4%、最优选地高于5%。

[0155] 优选地,用于一次非静脉内注射的单链因子VIII剂量小于1,000IU/kg体重、或小于800IU/kg体重、或小于600IU/kg体重或小于400IU/kg体重,例如处于以下剂量:从约10IU/kg体重至约1,000IU/kg体重、或从约20IU/kg体重至约800IU/kg体重、或从约30IU/kg体重至约700IU/kg体重、或从约40IU/kg体重至约600IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约500IU/kg体重、或从约75IU/kg体重至约400IU/kg体重、或从约100IU/kg体重至约300IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约1,000IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约800IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约700IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约600IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约500IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约400IU/kg体重、或从约50IU/kg体重至约300IU/kg体重、或约50IU/kg体重至约200IU/kg体重。FVIII可以独自施用,或作为与VWF的复合物施用。

[0156] 本发明的药物组合物可以单独施用或与其他治疗剂一起施用。这些药剂可以作为同一种药物的部分掺入。

实施例

[0157] 实施例1:重构后纯化的因子VIII分子的稳定性

[0158] 该实施例中使用以下因子VIII制备物:

[0159] **Beriate**[®] (冻干的人凝血因子VIII) 浓缩物) 从CSL Behring GmbH获得。

Beriate[®] 包含异二聚形式的血浆衍生的因子VIII。

[0160] **Helixate**[®] (冻干的重组凝血因子VIII) 从CSL Behring GmbH获得。**Helixate**[®] 含有重组产生的异二聚因子VIII。

[0161] **ReFacto**[®] 是冻干的因子VIII制备物,其含有通过重组技术产生的B-结构域缺失的异二聚因子VIII。它可以从例如德国Pfizer Pharma GmbH获得。

[0162] **Beriate**[®]、**Helixate**[®] 和 **ReFacto**[®] 优势地是异二聚双链多肽。

[0163] 称作“scFVIII”的构建体是通过在哺乳动物细胞培养物细胞中重组表达产生的单链因子VIII。该实施例中使用的单链因子VIII通过Asn764与Thr1653直接融合而获得并且

在纯化后以冻干的形式提供。即,“scFVIII”是基本上由SEQ ID NO:2的第1-764和第1653-2332位氨基酸组成的单链多肽。

[0164] 根据如包装物插页中给出的制造商的说明书,使 **Beriate®**、**Helixate®** 和 **ReFacto®** 重构。通过在注射用水中溶解纯化和冻干的FVIII制备物使“scFVIII”重构,从而产生导致含有25mM L-组氨酸,225mM NaCl、4mM CaCl₂、0.03%Tween80、2%蔗糖、8%D-甘露醇、pH7.0的组合物。

[0165] 在25℃温育重构的FVIII产物。通过生色底物测定法(**Coamatic®**因子VIII, Chromogenix)在以下时间点:0小时、6小时、1日、2日、4日、7日一式两份测定产物的FVIII活性。将活性值针对时间点0归一化。

[0166] 在下表和图1中显示结果。

[0167] 表1:因子VIII随时间推移的活性

[0168]

时间(日)	第 0 日	第 0.25 日	第 1 日	第 2 日	第 4 日	第 7 日
Beriate®	100.0	103.8	92.7	97.9	90.0	82.7
Helixate®	100.0	101.4	103.3	95.5	85.0	78.6
ReFacto®	100.0	106.7	83.7	94.0	93.6	77.3
scFVIII	100.0	107.8	99.4	102.0	99.0	93.3

[0169] 如可以见到,“scFVIII”显示最低活性丧失并且因此是最稳定的因子VIII分子。

[0170] 实施例2:重构后纯化的因子VIII分子的稳定性

[0171] 该实施例中使用以下因子VIII制备物:

[0172] **ReFacto®**和“scFVIII”与实施例1中所用相同,差异在于由CSL Behring GmbH提供的“scFVIII”在含有不同赋形剂的制剂中应用。**Advate®**是以冻干形式从Baxter购买的全长异二聚重组因子VIII制备物。

[0173] 根据如包装物插页中给出的制造商的说明书,使**Advate®**和**ReFacto®**重构。“scFVIII”在注射用水中重构,产生含有20mM L-组氨酸、280mM NaCl、3.4mM CaCl₂、0.02% Tween80,0.6%蔗糖,pH7.0的组合物。样品“scFVIII001”具有100IU/ml的FVIII初始活性,样品“scFVIII0006”具有400IU/ml的FVIII初始活性。在25℃温育重构的FVIII产物。通过生色底物测定法(**Coamatic®**因子VIII,Chromogenix)在以下时间点:0小时、6小时、1日、2日、4日、8日一式两份测定产物的FVIII活性。将活性值针对时间点0归一化。

[0174] 在下表和图2中显示结果。

[0175] 表2:因子VIII随时间推移的活性

[0176]

时间(日)	第0日	第0.25日	第1日	第2日	第4日	第8日
Advate	100.0	94.9	100.6	89.8	74.1	73.7
ReFacto	100.0	92.0	88.8	92.1	74.3	80.6

scFVIII001	100.0	99.2	95.6	99.2	89.0	95.1
scFVIII006	100.0	96.8	97.6	100.0	88.9	92.3

[0177] 如可以见到,“scFVIII”显示最低活性丧失并且因此是最稳定的因子VIII分子。

[0178] 实施例3:因子VIII分子的生物利用率

[0179] 将**Advate®**、**ReFacto®**和“scFVIII”与实施例2中所用相同并且如实施例2中所述那样重构。

[0180] 使用因子VIII敲除小鼠作为血友病A动物模型。这些小鼠缺少外显子16和17并且因此不表达FVIII (Bi L.等人,Nature genetics,1995,第10卷(1),119-121;Bi L.等人,Blood,1996,第88卷(9),3446-3450)。这允许通过定量ko小鼠血浆中的FVIII活性分析治疗后的FVIII水平。

[0181] 为了评估血管外注射是否可能是改善采用人FVIII治疗的选项,选择皮下注射。下表3中详述了所进行的非临床药物代谢动力学研究的设计。在单次皮下注射相应的FVIII制备物(表3中的详述治疗组)至血友病A模型后确定因子VIII活性的血浆水平。

[0182] 相应的组用相同剂量的FVIII:chromogen活性治疗。对于单次施加,在皮下施加至体重约25g的FVIII敲除(ko)小鼠之前,将因子VIII以200μL体积(对于全部组,体积相同)提供。表3中总结治疗组。

[0183] 在短期麻醉下,抽取血液样品,使用柠檬酸钠使其抗凝成10%柠檬酸盐血液,加工成血浆并储存在-70℃用于确定FVIII活性。在表4中详述采样时间点。通过基于aPTT的标准方案(Behring Coagulation Timer)进行血浆中FVIII活性的定量。将动物在标准居住条件维持。

[0184] 表3:治疗组

[0185]

编号	治疗	FVIII:色原/ 添加物剂量	体积 [mL/kg]	方案	途径	N
1	Advate®	400 IU/kg	8	单次注射 (t=0)	皮下	25
2	ReFacto®	400 IU/kg	8	单次注射 (t=0)	皮下	25
3	"scFVIII"	400 IU/kg	8	单次注射 (t=0)	皮下	20

[0186] 结果

[0187] 表4和图3中汇总结果。

[0188] 表4:

[0189]

时间点 [小时]	scFVIII			ReFacto [®]			Advate [®]		
	均值	SD	n	均值	SD	n	均值	SD	n
1	5.83	1.84	5	6.35	7.62	5	3.82	3.30	5
4	11.53	5.35	5	4.77	3.47	5	3.16	2.72	5
8	20.03	9.91	5	9.81	6.06	5	5.52	3.92	5
16	7.75	4.78	5	4.91	1.98	5	2.77	2.10	5
24	3.00	3.25	5	0.66	0.69	5	0.31	0.68	5
32	3.30	2.36	5	2.11	1.53	5	3.13	1.78	5
48	3.71	1.52	5	6.01	5.28	5	4.15	1.95	5
72	1.23	2.63	5	0.00	0.00	5	0.00	0.00	5
AUC _{0-72 小时} (h × %标准)	383.9			275.1			195.1		

[0190] 与施用异二聚全长FVIII (**Advate[®]**) 或B-结构域缺失的异二聚FVIII (**ReFacto[®]**) 相比,皮下注射400IU/kg单链FVIII (“scFVIII”) 至FVIII ko小鼠导致血浆水平中FVIII活性显著增加。即,在皮下注射入小鼠后,单链因子VIII分子显示最高体内生物利用率。双链全长构建体**Advate[®]**以及B-结构域缺失的双链制备物**ReFacto[®]**显示相当更低的生物利用率。

[0191] 实施例4:因子VIII分子在血浆中的(体外)稳定性

[0192] 将不同FVIII产品 (**Advate[®]**、**ReFacto AF[®]**和如实施例2中使用的两个批号的scFVIII) 用缺乏FVIII的血浆(Siemens Healthcare Diagnostics) 稀释至1IU/mL FVIII:C(基于通过生色底物测定法确定的值)。将FVIII-样品在0.05%叠氮钠存在下在37℃温育不同的时间段(0、0.25、1、2、4和8日)。在每个温育时间后,随后使用Pathromtin-SL(Siemens Healthcare Diagnostics) 作为激活物,通过一步凝血测定法确定FVIII:C,针对t=0 (%FVIII:C) 处的值归一化并且相对于温育时间作图。显示的值代表两份样品的均值和标准偏差(例外是0.25日,仅一份样品)。

[0193] 表5:与时间0相比的平均%活性

[0194]

	第0日	第0.25日	第1日	第2日	第4日	第8日

Advate	100.00	90.63	81.25	79.69	70.31	59.38
ReFacto	100.00	92.31	86.15	83.08	70.77	58.46
scFVIII001	100.00	93.33	93.33	96.67	93.33	93.33
scFVIII006	100.00	96.88	96.88	93.75	93.75	90.63

[0195] 实施例5:因子VIII分子在血浆中的(体内)稳定性

[0196] 在分别以剂量250IU/kg和100IU/kg单次静脉内注射至食蟹猴猴(图5和表6)和血友病A小鼠(图6和表7)后确定scFVIII和全长rFVIII (**Advate®**, Baxter Healthcare) 的药物代谢动力学(PK)曲线。根据 **Advate®** 的标称活性和scFVIII的生色活性(FVIII:C)给予测试物。在给药前(仅猴)和在施用后的各个时间点直至血友病A小鼠中72小时(hrs)和直至食蟹猴中24小时抽取血液样品。立即制备柠檬酸盐血浆并且将其用于通过生色测定系统(FVIII:C) (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA, 米兰, 意大利) 定量FVIII:C。

[0197] 使用线性梯形法计算血浆中FVIII水平的AUC以计算AUC_{最后}:从t=0至最后观察结果。使用通过调整的R²标准所选择的终末期的多个点,通过对数线性回归确定终末半寿期($t_{1/2\beta}$)。AUC:从自t=0至无限(通过使用终末期的回归模型外推)。

[0198] 在食蟹猴中,scFVIII显示提高约1.6倍的AUC_{0-t最后}或 $t_{1/2\beta}$,伴随相应地约2倍较低的清除率(CL),同时相对于全长rFVIII,代表体内回收率(IVR)和稳态分布容积(V_{ss})的FVIII活性峰水平(C_{max})似乎更相似。在采用250IU/kg scFVIII的GLP-毒性研究期间给药时,在来自额外8只猴的毒代动力学数据后包括从n=10只动物获得的这些PK参数结果(表6和图5)。

[0199] 在血友病A小鼠中,对于scFVIII,AUC_{0-t最后}的提高、平均滞留时间(MRT)的提高、直至5%FVIII活性谷底水平时间、终末半寿期和相应较低的CL在1.6-2倍之间,而相比于全长rFVIII,代表IVR的 C_{max} 和 V_{ss} 显示相似。在rFVIII-单链治疗后获得的AUC_{0-t最后}和 $t_{1/2\beta}$ 结果显著地好于全长rFVIII,AUC_{0-t最后}比率为1.97(90%置信区间(CI):1.7-2.3;p-值(比率=1):<0.0001),并且 $t_{1/2\beta}$ 比率为1.65(90%CI:1.11-2.70;p-值(比率=1):0.036(表7和图6)。

[0200] 表6:食蟹猴中scFVIII和全长rFVIII的PK参数

参数	scFVIII (n=10)	全长 rFVIII (n=2)
AUC _{0-t最后} (小时·IU/mL)	78.4	49.1
C_{max} (IU/mL)	7.8	8.7
CL ((mL/小时)/kg)	2.1	4.7
$t_{1/2\beta}$ (小时)	11.0	6.8

[0202] 表7:血友病A小鼠中scFVIII和全长rFVIII的PK参数

[0203]

参数	scFVIII	全长rFVIII
AUC _{0-t最后} (小时·IU/mL)	35	18
C_{max} (IU/mL)	2.3	2.2
CL ((mL/小时)/kg)	2.7	5.5
MRT(小时)	18	10

Vss (ml/kg)	50	57
t _{1/2β} (小时)	15.9	9.7
直至0.05IU/mL的时间 (小时)	73	39

[0204] 两组PK参数均反映在施用至测试的两个动物物种后,纯化、冻干、血浆中体内重构后的scFVIII的稳定性增加。

[0205] 实施例6:血友病A小鼠中的凝血酶生成测定法(离体)

[0206] 当scFVIII或全长rFVIII (**Advate**[®])以250IU/kg的水平投予时,最终在深度麻醉下在不同时间点(第1-8日)采集柠檬酸盐-(10%v/v)血友病A小鼠血液。在磷脂(例如Rossix, **Möln dal**,瑞典)/**Pathromtin**[®]SL (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH, Marburg, 德国)(1:30)存在下内在活化后,通过校准的凝血酶记录法(thrombinography) (CAT) (Thrombinoscope, 荷兰)进行TGA。记录凝血酶峰水平。通过线性梯形法计算从第1-8日凝血酶峰水平的平均AUC。在每个时间点和治疗组存在变量方差的线性模型中使用近似F-检验针对AUC的差异比较两种因子VIII产品的AUC,产生估计的时间直至凝血酶峰水平降低范围在50-250nM的限定限值以下。

[0207] 在血友病A小鼠中,与全长rFVIII相比,scFVIII显示有利的止血活性,如通过直至凝血酶峰水平降低到范围从50-250nm峰水平的限定限值以下的估计时间所示(图8和表8)。相对于凝血酶峰水平间距在50和250nM之间的全长rFVIII,这转换成scFVIII的凝血酶生成活性值平均20小时更长。当评估第1-8日之间峰曲线下面积时,与全长FVIII相比,scFVIII的凝血酶生成活性显著更好, p (AUC_{TGA峰}-比率=1)=0.0002 (估计的比率1.26, 90%CI:1.14-1.39),或换言之,scFVIII在施用后耗去比人野生型因子VIII **Advate**[®]显著更长的时间降至50nm凝血酶峰水平以下。

[0208] 这些结果再次证实scFVIII在纯化、冻干和重构后的功能稳定性增加。

表 8: 峰 nm 凝血酶

	CSL627 (N=8-14)		Advate (N=7-14)	
	均值	SD	均值	SD
时间(小时)				
0	0	0	0	0
24	325.5	40.2	343.4	40.41
[0209] 32	294	102.8	305.2	72.13
48	277.1	22.44	279.6	30.92
72	283.1	42.88	163.6	79.87
96	115.4	29.63	75.44	35.28
120	91.85	57.63	55.17	30.89
144	45.6	36.15	24.61	13.52
168	8.453	12.66	14.13	19.44
192	3.901	9.384	4.71	8.1

[0210] 实施例6:因子VIII分子在缺乏vWF的血浆中的(体内)稳定性

[0211] scFVIII在2.5mL注射用水中重构。ReFactoAF®和Advate®根据包装物插页中的描述重构。将全部供试品等分并立即在大约-70℃冷冻存储。在施用之前,将供试品用CSL627的配制缓冲液稀释以获得确保可靠施用的最小实用体积。

[0212] 每组12只VWF ko小鼠(6只雌性/6只雄性)基于生色FVIII活性接受单次静脉内注射100IU/kg的scFVIII至外侧尾静脉中并且基于标称FVIII活性接受单次静脉内注射ReFactoAF®或Advate®至外侧尾静脉中。在施用不同测试物后,在0.083、0.5、1、2、4、7、16和24小时从每个时间点n=2-3只小鼠抽取血液样品用于确定FVIII血浆水平。将血液样品加工成10%柠檬酸盐(3.13%w/v)血浆并随后使用生色测定系统进行FVIII血浆水平分析使用来自意大利Chromogenix的COAMATIC®FVIII检验试剂盒确定生色FVIII活性。

[0213] 使用线性梯形法计算血浆中FVIII水平的AUC以计算AUC_{最后}:从t=0至最后观察结果。

[0214] 与静脉内施用FVIII ko小鼠和正常猴以及皮下施用至FVIII ko小鼠分析后所获得的结果相似,ReFactoAF®和Advate®相比,对CSL627的暴露量更高。自从分析AUC用来,与ReFactoAF®和Advate®相比,在施用CSL627后,全身暴露量的最相关和最有代表性的PK参数产生30%更高的AUC值。再次,这些观察结果反映在施用至缺少全身性、循环性VWF的小鼠后,因此在不存在其针对全身性、循环性FVIII的屏蔽和保护作用情况下,scFVIII在纯化、冻干、血浆中体内重构后的内在稳定性增加。

[0215] 表9:以剂量水平100IU/kg施用至缺乏VWF的小鼠后与Advate®和ReFacto AF®相比的血浆scFVIII水平

	CSL627	Advate®	ReFacto AF®
基线	0,0	0,0	0,0
总面积	2427	1654	1714
总峰面积	2427	1654	1714
峰数	1,000	1,000	1,000
峰 1			
第一 X=	0.0830	0.0830	0.0830
最末 X=	24.00	24.00	24.00
峰 X=	0.0830	0.0830	0.0830
峰 Y=	1770	1131	1248
曲线下面积=	2427	1654	1714
%面积=	100.0	100.0	100.0

[0216]

序列表

<110>	CSL Behring GmbH	
<120>	用于改善因子VIII的稳定性的方法	
<130>	A186	
<150>	EP 11185651.4	
<151>	2011-10-18	
<150>	US 61/548601	
<151>	2011-10-18	
<160>	2	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	6996	
<212>	DNA	
<213>	homo sapiens	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (6996)	
<400>	1	
	gcc acc aga aga tac tac ctg ggt gca gtg gaa ctg tca tgg gac tat	48
	Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr	
	1 5 10 15	
	atg caa agt gat ctc ggt gag ctg cct gtg gac gca aga ttt cct cct	96
	Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro	
	20 25 30	
[0001]	aga gtg cca aaa tct ttt cca ttc aac acc tca gtc gtg tac aaa aag	144
	Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys	
	35 40 45	
	act ctg ttt gta gaa ttc acg gat cac ctt ttc aac atc gct aag cca	192
	Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro	
	50 55 60	
	agg cca ccc tgg atg ggt ctg cta ggt cct acc atc cag gct gag gtt	240
	Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val	
	65 70 75 80	
	tat gat aca gtg gtc att aca ctt aag aac atg gct tcc cat cct gtc	288
	Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val	
	85 90 95	
	agt ctt cat gct gtt ggt gta tcc tac tgg aaa gct tct gag gga gct	336
	Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala	
	100 105 110	
	gna tat gat gat cag acc agt caa agg gag aaa gaa gat gat aaa gtc	384
	Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val	
	115 120 125	
	ttc cct ggt gga agc cat aca tat gtc tgg cag gtc ctg aaa gag aat	432
	Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn	
	130 135 140	
	ggt cca atg gcc tct gac cca ctg tgc ctt acc tac tca taf ctt tct	480
	Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser	
	145 150 155 160	
	cat gtg gac ctg gta aaa gac ttg aat tca ggc ctc att gga gcc cta	528
	His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu	
	165 170 175	
	cta gta tgt aga gaa ggg agt ctg gcc aag gaa aag aca cag acc ttg	576
	Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu	
	180 185 190	

	cac aaa ttt ata cta ctt ttt gct gta ttt gat gaa ggg aaa agt tgg His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp 195 200 205	624
	cac tca gaa aca aag aac tcc ttg atg cag gat agg gat gct gca tct His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser 210 215 220	672
	gct cgg gcc tgg cct aaa atg cac aca gtc aat ggt tat gta aac agg Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg 225 230 235 240	720
	tct ctg cca ggt etg att gga tgc cac agg aaa tca gtc tat tgg cat Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His 245 250 255	768
	gtg att gga atg ggc acc act cct gaa gtg cac tca ata ttc ctc gaa Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu 260 265 270	816
	ggt cac aca ttt ctt gtg agg aac cat cgc cag gcg tcc ttg gaa atc Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile 275 280 285	864
	teg cca ata act ttc ctt act gct caa aca ctc ttg atg gac ctt gga Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly 290 295 300	912
	cag ttt cta etg ttt tgt cat atc tct tcc cac caa cat gat ggc atg Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met 305 310 315 320	960
	gaa gct tat gtc aaa gta gac agc tgt cca gag gaa ccc caa cta cga Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg 325 330 335	1008
[0002]	atg aaa aat aat gaa gaa gcg gaa gac tat gat gat gat ctt act gat Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp 340 345 350	1056
	tct gaa atg gat gtg gtc agg ttt gat gat gac aac tct cct tcc ttt Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe 355 360 365	1104
	atc caa att cgc tca gti gcc aag aag cat cct aaa act tgg gta cat Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His 370 375 380	1152
	tac att gct gct gaa gag gag gac tgg gac tat gct ccc tta gtc ctc Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu 385 390 395 400	1200
	gcc ccc gat gac aga agt tat aaa agt caa tat ttg aac aat ggc cct Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro 405 410 415	1248
	cag cgg att ggt agg aag tac aaa aaa gtc cga ttt atg gca tac aca Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr 420 425 430	1296
	gat gaa acc ttt aag act cgt gaa gct att cag cat gaa tca gga atc Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile 435 440 445	1344
	ttg gga cct tta ctt tat ggg gaa gtt gga gac aca ctg ttg att ata Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile 450 455 460	1392
	ttt aag aat caa gca agc aga cca tat aac atc tac cct cac gga atc Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile 465 470 475 480	1440
	act gat gtc cgt cct ttg tat tca agg aga tta cca aaa ggt gta aaa Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys 485 490 495	1488

	cat ttg aag gat ttt cca att ctg cca gga gaa ata ttc aaa tat aaa His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys 500 505 510	1536
	tgg aca gtg act gta gaa gat ggg cca act aaa tca gat cct cgg tgc Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys 515 520 525	1584
	ctg acc cgc tat tac tct agt ttc gtt aat atg gag aga gat cta gct Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala 530 535 540	1632
	tca gga ctc att ggc cct ctc ctc atc tgc tac aaa gaa tct gta gat Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp 545 550 555 560	1680
	caa aga gga aac cag ata atg tca gac aag agg aat gtc atc ctg ttt Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe 565 570 575	1728
	tct gta ttt gat gag aac cga agc tgg tac ctc aca gag aat ata caa Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln 580 585 590	1776
	cgc ttt ctc ccc aat cca gct gga gtg cag ctt gag gat cca gag ttc Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe 595 600 605	1824
	caa gcc tcc aac atc atg cac agc atc aat ggc tat gtt ttt gat agt Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser 610 615 620	1872
	ttg cag ttg tca gtt tgt ttg cat gag gtg gca tac tgg tac att cta Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu 625 630 635 640	1920
[0003]	agc att gga gca cag act gac ttc ctt tct gtc ttc ttc tct gga tat Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr 645 650 655	1968
	acc ttc aaa cac aaa atg gtc tat gaa gac aca ctc acc cta ttc cca Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro 660 665 670	2016
	ttc tca gga gaa act gtc ttc atg teg atg gaa aac cca ggt cta tgg Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp 675 680 685	2064
	att ctg ggg tgc cac aac tca gac ttt cgg aac aga ggc atg acc gcc Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala 690 695 700	2112
	tta ctg aag gtt tct agt tgt gac aag aac act ggt gat tat tac gag Leu Leu Lys Val Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu 705 710 715 720	2160
	gac agt tat gaa gat att tca gca tac ttg ctg agt aaa aac aat gcc Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala 725 730 735	2208
	att gaa cca aga agc ttc tcc cag aat tca aga cac cgt agc act agg Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Arg Ser Thr Arg 740 745 750	2256
	caa aag caa ttt aat gcc acc aca att cca gaa aat gac ata gag aag Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys 755 760 765	2304
	act gac cct tgg ttt gca cac aga aca cct atg cct aaa ata caa aat Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn 770 775 780	2352
	gtc tcc tct agt gat ttg ttg atg ctc ttg cga cag agt cct act cca Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro 785 790 795 800	2400

	cat ggg cta tcc tta tct gat ctc caa gaa gcc aaa tat gag act ttt His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe 805 810 815	2448
	tct gat gat cca tca cct gga gca ata gac agt aat aac agc ctg tct Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser 820 825 830	2496
	gaa atg aca cac ttc agg cca cag ctc cat cac agt ggg gac atg gta Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val 835 840 845	2544
	ttt acc cct gag tca ggc ctc caa tta aga tta aat gag aaa ctg ggg Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly 850 855 860	2592
	aca act gca gca aca gag ttg aag aaa ctt gat ttc aaa gtt tct agt Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser 865 870 875 880	2640
	aca tca aat aat ctg att tca aca att cca tca gac aat ttg gca gca Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala 885 890 895	2688
	ggg act gat aat aca agt tcc tta gga ccc cca agt atg cca gtt cat Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His 900 905 910	2736
	tat gat agt caa tta gat acc act cta ttt ggc aaa aag tca tct ccc Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro 915 920 925	2784
	ctt act gag tct ggt gga cct ctg agc ttg agt gaa gaa aat aat gat Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp 930 935 940	2832
[0004]	tca aag ttg tta gaa tca ggt tta atg aat agc caa gaa agt tca tgg Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp 945 950 955 960	2880
	gga aaa aat gta tct tca aca gag agt ggt agg tta ttt aaa ggg aaa Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys 965 970 975	2928
	aga gct cat gga cct gct ttg ttg act aaa gat aat gcc tta ttc aaa Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys 980 985 990	2976
	ggt agc atc tct ttg tta aag aca aac aaa act tcc aat aat tca gca Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala 995 1000 1005	3024
	act aat aga aag act cac att gat ggc cca tca tta tta att gag Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu 1010 1015 1020	3069
	aat agt cca tca gtc tgg caa aat ata tta gaa agt gac act gag Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu 1025 1030 1035	3114
	ttt aaa aaa gtg aca cct ttg att cat gac aga atg ctt atg gac Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp 1040 1045 1050	3159
	aaa aat gct aca gct ttg agg cta aat cat atg tca aat aaa act Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr 1055 1060 1065	3204
	act tca tca aaa aac atg gaa atg gtc caa cag aaa aaa gag ggc Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly 1070 1075 1080	3249
	ccc att cca cca gat gca caa aat cca gat atg tct ttc ttt aag Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys 1085 1090 1095	3294

	atg cta ttc ttg cca gaa tca gca agg tgg ata caa agg act cat Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His 1100 1105 1110	3339
	gga aag aac tct ctg aac tct ggg caa ggc ccc agt cca aag caa Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln 1115 1120 1125	3384
	tta gta tcc tta gga cca gaa aaa tct gtg gaa ggt cag aat ttc Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe 1130 1135 1140	3429
	ttg tct gag aaa aac aaa gtg gta gta gga aag ggt gaa ttt aca Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr 1145 1150 1155	3474
	aag gac gta gga ctc aaa gag atg gtt ttt cca agc agc aga aac Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn 1160 1165 1170	3519
	cta ttt ctt act aac ttg gat aat tta cat gaa aat aat aca cac Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asn Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His 1175 1180 1185	3564
	aal caa gaa aaa aaa att cag gaa gaa ata gaa aag aag gaa aca Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr 1190 1195 1200	3609
	tta atc caa gag aat gta gtt ttg cct cag ata cat aca gtg act Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr 1205 1210 1215	3654
	ggc act aag aat ttc atg aag aac ctt ttc tta ctg agc act agg Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg 1220 1225 1230	3699
[0005]	caa aat gta gaa ggt tca tat gac ggg gca tat gct cca gta ctt Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu 1235 1240 1245	3744
	caa gat ttt agg tca tta aat gat tca aca aat aga aca aag aaa Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys 1250 1255 1260	3789
	cac aca get cat ttc tca aaa aaa ggg gag gaa gaa aac ttg gaa His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu 1265 1270 1275	3834
	ggc ttg gga aat caa acc aag caa att gta gag aaa tat gca tgc Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys 1280 1285 1290	3879
	acc aca agg ata tct cct aat aca agc cag cag aat ttt gtc acg Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr 1295 1300 1305	3924
	caa cgt agt aag aga gct ttg aaa caa ttc aga ctc cca cta gaa Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu 1310 1315 1320	3969
	gaa aca gaa ctt gaa aaa agg ata att gtg gat gac acc tca acc Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr 1325 1330 1335	4014
	cag tgg tcc aaa aac atg aaa cat ttg acc ccg agc acc ctc aca Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr 1340 1345 1350	4059
	cag ata gac tac aat gag aag gag aaa ggg gcc att act cag tct Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser 1355 1360 1365	4104
	ccc tta tca gat tgc ctt acg agg agt cat agc atc cct caa gca Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala 1370 1375 1380	4149

	aat aga tct cca tta ccc att gca aag gta tca tca ttt cca tct Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser 1385 1390 1395	4194
	att aga cct ata tat ctg acc agg gtc cta ttc caa gac aac tct Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser 1400 1405 1410	4239
	tct cat ctt cca gca gca tct tat aga aag aaa gat tct ggg gtc Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val 1415 1420 1425	4284
	caa gaa agc agt cat ttc tta caa gga gcc aaa aaa aat aac ctt Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu 1430 1435 1440	4329
	tct tta gcc att cta acc ttg gag atg act ggt gat caa aga gag Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu 1445 1450 1455	4374
	gtt ggc tcc ctg ggg aca agt gcc aca aat tca gtc aca tac aag Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys 1460 1465 1470	4419
	aaa gtt gag aac act gtt ctg ceg aaa cca gac ttg ccc aaa aca Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr 1475 1480 1485	4464
	tct ggc aaa gtt gaa ttg ctt cca aaa gtt cac att tat cag aag Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys 1490 1495 1500	4509
	gac cta ttc cct acg gaa act agc aat ggg tct cct ggc cat ctg Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu 1505 1510 1515	4554
[0006]	gat ctg gtg gaa ggg agc ctt ctt cag gga aca gag gga gcg att Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile 1520 1525 1530	4599
	aag tgg aat gaa gca aac aga cct gga aaa gtt ccc ttt ctg aga Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg 1535 1540 1545	4644
	gta gca aca gaa agc tct gca aag act ccc tcc aag cta ttg gat Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp 1550 1555 1560	4689
	cct ctt get tgg gat aac cac tat ggt act cag ata cca aaa gaa Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu 1565 1570 1575	4734
	gag tgg aaa tcc caa gag aag tca cca gaa aaa aca gct ttt aag Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys 1580 1585 1590	4779
	aaa aag gat acc att ttg tcc ctg aac gct tgt gaa agc aat cat Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His 1595 1600 1605	4824
	gca ata gca gca ata aat gag gga caa aat aag ccc gaa ata gaa Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu 1610 1615 1620	4869
	gtc acc tgg gca aag caa ggt agg act gaa agg ctg tgc tct caa Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln 1625 1630 1635	4914
	aac cca cca gtc ttg aaa cgc cat caa egg gaa ata act cgt act Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr 1640 1645 1650	4959
	act ctt cag tca gat caa gag gaa att gac tat gat gat acc ata Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile 1655 1660 1665	5004

	tca gtt gaa atg aag aag gaa gat ttt gac att tat gat gag gat Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp 1670 1675 1680	5049
	gaa aat cag agc ccc cgc agc ttt caa aag aaa aca cga cac tat Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr 1685 1690 1695	5094
	ttt att gct gca gtg gag agg ctc tgg gat tat ggg atg agt agc Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser 1700 1705 1710	5139
	tcc cca cat gtt cta aga aac agg gct cag agt ggc agt gtc cct Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro 1715 1720 1725	5184
	cag ttc aag aaa gtt gtt ttc cag gaa ttt act gat ggc tcc ttt Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe 1730 1735 1740	5229
	act cag ccc tta tac cgt gga gaa cta aat gaa cat ttg gga ctc Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu 1745 1750 1755	5274
	ctg ggg cca tat ata aga gca gaa gtt gaa gat aat atc atg gta Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val 1760 1765 1770	5319
	act ttc aga aat cag gcc tct cgt ccc tat tcc ttc tat tct agc Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser 1775 1780 1785	5364
	ctt att tct tat gag gaa gat cag agg caa gga gca gaa cct aga Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg 1790 1795 1800	5409
[0007]	aaa aac ttt gtc aag cct aat gaa acc aaa act tac ttt tgg aaa Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys 1805 1810 1815	5454
	gtg caa cat cat atg gca ccc act aaa gat gag ttt gac tgc aaa Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys 1820 1825 1830	5499
	gcc tgg gct tat ttc tct gat gtt gac ctg gaa aaa gat gtg cac Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His 1835 1840 1845	5544
	tca ggc ctg att gga ccc ctt ctg gtc tgc cac act aac aca ctg Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu 1850 1855 1860	5589
	aac cct gct cat ggg aga caa gtg aca gta cag gaa ttt gct ctg Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu 1865 1870 1875	5634
	ttt ttc acc atc ttt gat gag acc aaa agc tgg tac ttc act gaa Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu 1880 1885 1890	5679
	aat atg gaa aga aac tgc agg gct ccc tgc aat atc cag atg gaa Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu 1895 1900 1905	5724
	gat ccc act ttt aaa gag aat tat cgc ttc cat gca atc aat ggc Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly 1910 1915 1920	5769
	tac ata atg gat aca cta cct ggc tta gta atg gct cag gat caa Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1925 1930 1935	5814
	agg att cga tgg tat ctg ctc agc atg ggc agc aat gaa aac atc Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1940 1945 1950	5859

[0008]	cat tct att cat ttc agt gga cat gtg ttc act gta cga aaa aaa 5904 His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys 1955 1960 1965
	gag gag tat aaa atg gca ctg tac aat ctc tat cca ggt gtt ttt 5949 Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1970 1975 1980
	gag aca gtg gaa atg tta cca tcc aaa gct gga att tgg cgg gtg 5994 Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1985 1990 1995
	gaa tgc ctt att ggc gag cat cta cat gct ggg atg agc aca ctt 6039 Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2000 2005 2010
	ttt ctg gtg tac agc aat aag tgt cag act ccc ctg gga atg gct 6084 Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2015 2020 2025
	tct gga cac att aga gat ttt cag att aca gct tca gga caa tat 6129 Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2030 2035 2040
	gga cag tgg gcc cca aag ctg gcc aga ctt cat tat tcc gga tca 6174 Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2045 2050 2055
	atc aat gcc tgg agc acc aag gag ccc ttt tct tgg atc aag gtg 6219 Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2060 2065 2070
	gat ctg ttg gca cca atg att att cac ggc atc aag acc cag ggt 6264 Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly 2075 2080 2085
	gcc cgt cag aag ttc tcc agc ctc tac atc tct cag ttt atc atc 6309 Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 2090 2095 2100
	atg tat agt ctt gat ggg aag aag tgg cag act tat cga gga aat 6354 Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn 2105 2110 2115
	tcc act gga acc tta atg gtc ttc ttt ggc aat gtg gat tca tct 6399 Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser 2120 2125 2130
	ggg ata aaa cac aat att ttt aac cct cca att att gct cga tac 6444 Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr 2135 2140 2145
	atc cgt ttg cac cca act cat tat agc att cgc agc act ctt cgc 6489 Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg 2150 2155 2160
	atg gag ttg atg ggc tgt gat tta aat agt tgc agc atg cca ttg 6534 Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu 2165 2170 2175
	gga atg gag agt aaa gca ata tca gat gca cag att act gct tca 6579 Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser 2180 2185 2190
	tcc iac ttt acc aat atg ttt gcc acc tgg tct cct tca aaa gct 6624 Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala 2195 2200 2205
	cga ctt cac ctc caa ggg agg agt aat gcc tgg aga cct cag gtg 6669 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val 2210 2215 2220
	aat aat cca aaa gag tgg ctg caa gtg gac ttc cag aag aca atg 6714 Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met 2225 2230 2235

```

aaa gtc aca gga gta act act cag gga gta aaa tct ctg ctt acc 6759
Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

agc atg tat gtg aag gag ttc ctc atc tcc agc agt caa gat ggc 6804
Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

cat cag tgg act ctc ttt ttt cag aat ggc aaa gta aag gtt ttt 6849
His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

cag gga aat caa gac tcc ttc aca cct gtg gtg aac tct cta gac 6894
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

cca ccg tta ctg act cgc tac ctt cga att cac ccc cag agt igg 6939
Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

gtg cac cag att gcc ctg agg atg gag gtt ctg ggc tgc gag gca 6984
Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala
2315 2320 2325

cag gac ctc tac 6996
Gln Asp Leu Tyr
2330

```

<210> 2
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 2

[0009]

```

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
1      5      10      15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
20      25      30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
35      40      45

Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
50      55      60

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
65      70      75      80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
85      90      95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
100     105     110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
115     120     125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
130     135     140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
145     150     155     160

```

	His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu	165	170	175
	Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu	180	185	190
	His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp	195	200	205
	His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser	210	215	220
	Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg	225	230	235
	Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His	245	250	255
	Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu	260	265	270
	Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile	275	280	285
	Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly	290	295	300
[0010]	Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met	305	310	315
	Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg	325	330	335
	Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp	340	345	350
	Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe	355	360	365
	Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His	370	375	380
	Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu	385	390	395
	Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro	405	410	415
	Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr	420	425	430
	Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile	435	440	445
	Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile	450	455	460

[0011]

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

[0012]

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

	Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly	
	1070	1075 1080
	Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys	
	1085	1090 1095
	Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His	
	1100	1105 1110
	Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln	
	1115	1120 1125
	Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe	
	1130	1135 1140
	Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr	
	1145	1150 1155
	Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn	
	1160	1165 1170
	Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His	
	1175	1180 1185
	Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr	
	1190	1195 1200
[0013]	Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr	
	1205	1210 1215
	Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg	
	1220	1225 1230
	Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu	
	1235	1240 1245
	Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys	
	1250	1255 1260
	His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu	
	1265	1270 1275
	Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys	
	1280	1285 1290
	Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr	
	1295	1300 1305
	Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu	
	1310	1315 1320
	Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr	
	1325	1330 1335
	Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr	
	1340	1345 1350

	Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser 1355 1360 1365
	Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala 1370 1375 1380
	Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser 1385 1390 1395
	Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser 1400 1405 1410
	Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val 1415 1420 1425
	Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys Asn Asn Leu 1430 1435 1440
	Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln Arg Glu 1445 1450 1455
	Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr Lys 1460 1465 1470
	Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr 1475 1480 1485
[0014]	Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys 1490 1495 1500
	Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu 1505 1510 1515
	Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile 1520 1525 1530
	Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg 1535 1540 1545
	Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp 1550 1555 1560
	Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu 1565 1570 1575
	Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys 1580 1585 1590
	Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His 1595 1600 1605
	Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu 1610 1615 1620
	Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln 1625 1630 1635

	Asn Pro	Pro Val	Leu Lys	Arg	His Gln	Arg Glu	Ile	Thr Arg	Thr
	1640			1645			1650		
	Thr Leu	Gln Ser	Asp Gln	Glu	Glu Ile	Asp Tyr	Asp	Asp Thr	Ile
	1655			1660			1665		
	Ser Val	Glu Met	Lys Lys	Glu	Asp Phe	Asp Ile	Tyr	Asp Glu	Asp
	1670			1675			1680		
	Glu Asn	Gln Ser	Pro Arg	Ser	Phe Gln	Lys Lys	Thr	Arg His	Tyr
	1685			1690			1695		
	Phe Ile	Ala Ala	Val Glu	Arg	Leu Trp	Asp Tyr	Gly	Met Ser	Ser
	1700			1705			1710		
	Ser Pro	His Val	Leu Arg	Asn	Arg Ala	Gln Ser	Gly	Ser Val	Pro
	1715			1720			1725		
	Gln Phe	Lys Lys	Val Val	Phe	Gln Glu	Phe Thr	Asp	Gly Ser	Phe
	1730			1735			1740		
	Thr Gln	Pro Leu	Tyr Arg	Gly	Glu Leu	Asn Glu	His	Leu Gly	Leu
	1745			1750			1755		
	Leu Gly	Pro Tyr	Ile Arg	Ala	Glu Val	Glu Asp	Asn	Ile Met	Val
	1760			1765			1770		
[0015]	Thr Phe	Arg Asn	Gln Ala	Ser	Arg Pro	Tyr Ser	Phe	Tyr Ser	Ser
	1775			1780			1785		
	Leu Ile	Ser Tyr	Glu Glu	Asp	Gln Arg	Gln Gly	Ala	Glu Pro	Arg
	1790			1795			1800		
	Lys Asn	Phe Val	Lys Pro	Asn	Glu Thr	Lys Thr	Tyr	Phe Trp	Lys
	1805			1810			1815		
	Val Gln	His His	Met Ala	Pro	Thr Lys	Asp Glu	Phe	Asp Cys	Lys
	1820			1825			1830		
	Ala Trp	Ala Tyr	Phe Ser	Asp	Val Asp	Leu Glu	Lys	Asp Val	His
	1835			1840			1845		
	Ser Gly	Leu Ile	Gly Pro	Leu	Leu Val	Cys His	Thr	Asn Thr	Leu
	1850			1855			1860		
	Asn Pro	Ala His	Gly Arg	Gln	Val Thr	Val Gln	Glu	Phe Ala	Leu
	1865			1870			1875		
	Phe Phe	Thr Ile	Phe Asp	Glu	Thr Lys	Ser Trp	Tyr	Phe Thr	Glu
	1880			1885			1890		
	Asn Met	Glu Arg	Asn Cys	Arg	Ala Pro	Cys Asn	Ile	Gln Met	Glu
	1895			1900			1905		
	Asp Pro	Thr Phe	Lys Glu	Asn	Tyr Arg	Phe His	Ala	Ile Asn	Gly
	1910			1915			1920		

	Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln 1925 1930 1935
	Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile 1940 1945 1950
	His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys 1955 1960 1965
	Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe 1970 1975 1980
	Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val 1985 1990 1995
	Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu 2000 2005 2010
	Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala 2015 2020 2025
	Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr 2030 2035 2040
	Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser 2045 2050 2055
[0016]	Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val 2060 2065 2070
	Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly 2075 2080 2085
	Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile 2090 2095 2100
	Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn 2105 2110 2115
	Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser 2120 2125 2130
	Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr 2135 2140 2145
	Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg 2150 2155 2160
	Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu 2165 2170 2175
	Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser 2180 2185 2190
	Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala 2195 2200 2205

[0017]

Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val
2210 2215 2220

Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met
2225 2230 2235

Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
2240 2245 2250

Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly
2255 2260 2265

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe
2270 2275 2280

Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp
2285 2290 2295

Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp
2300 2305 2310

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

Gln Asp Leu Tyr
2330

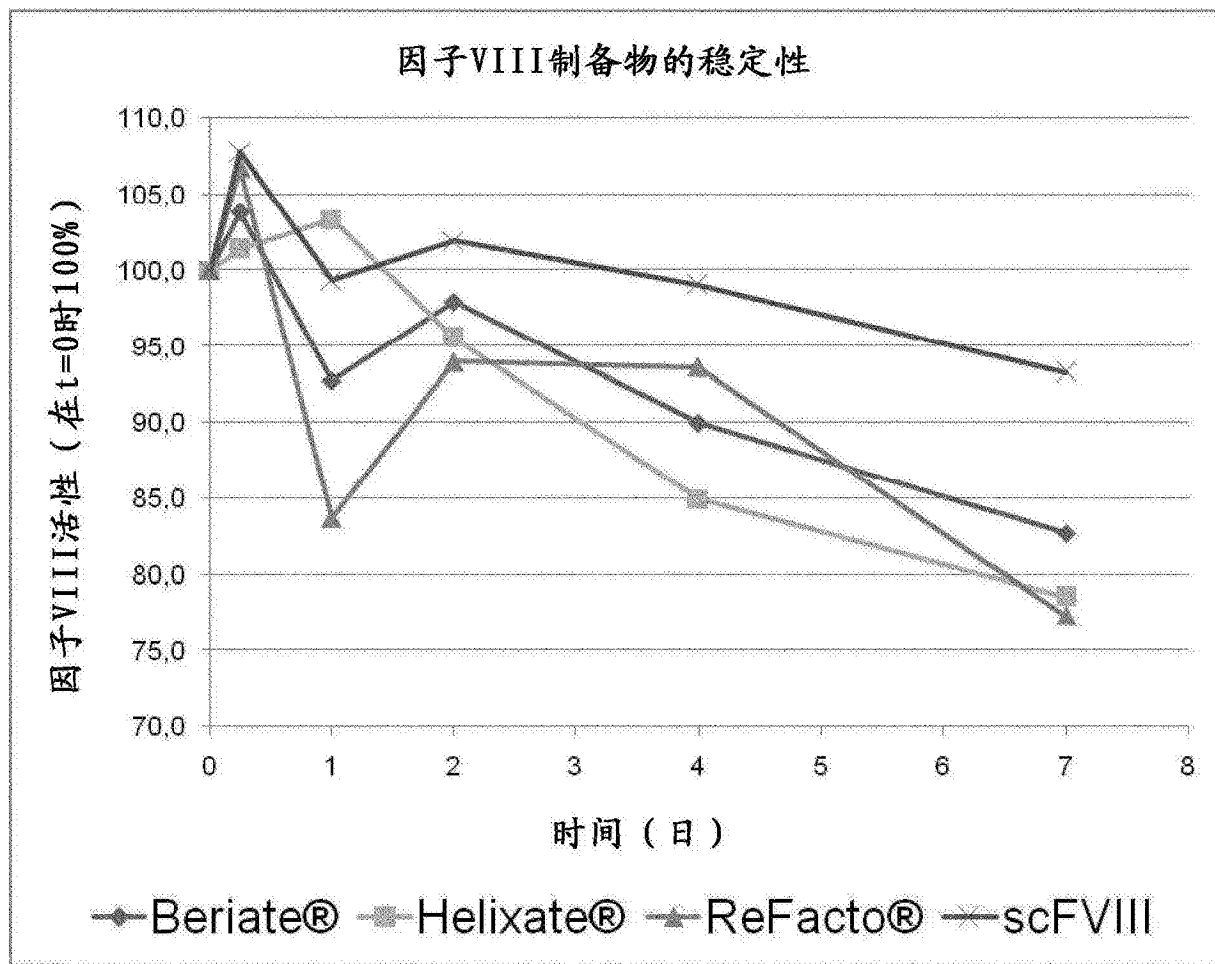


图1

重构的因子VIII在+25℃时的稳定性
通过生色底物测定法测定的活性

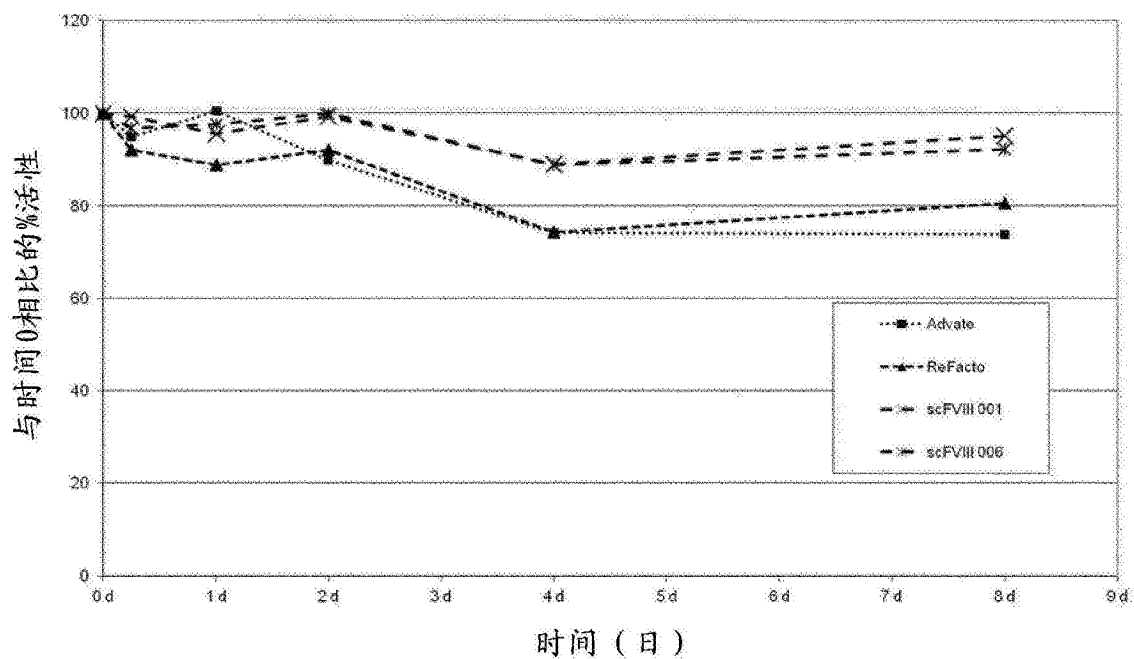


图2

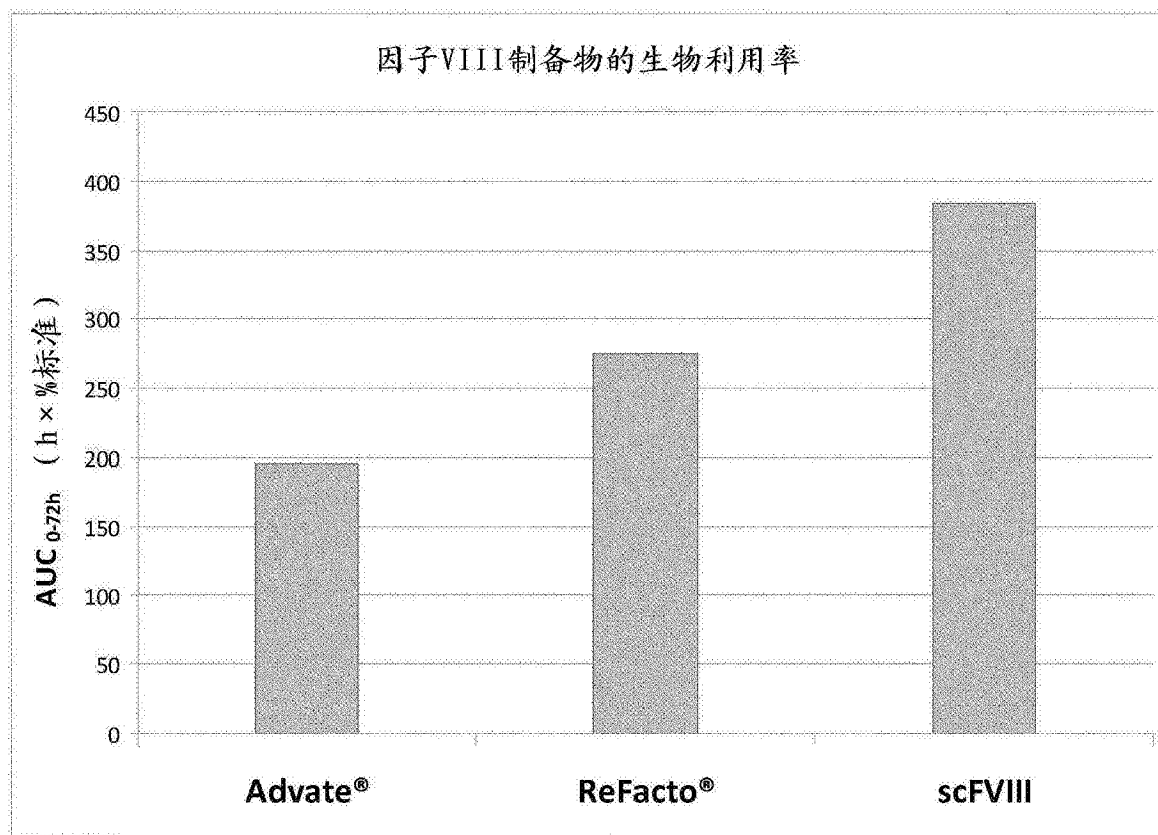


图3

FVIII分子在血浆中的（离体）稳定性

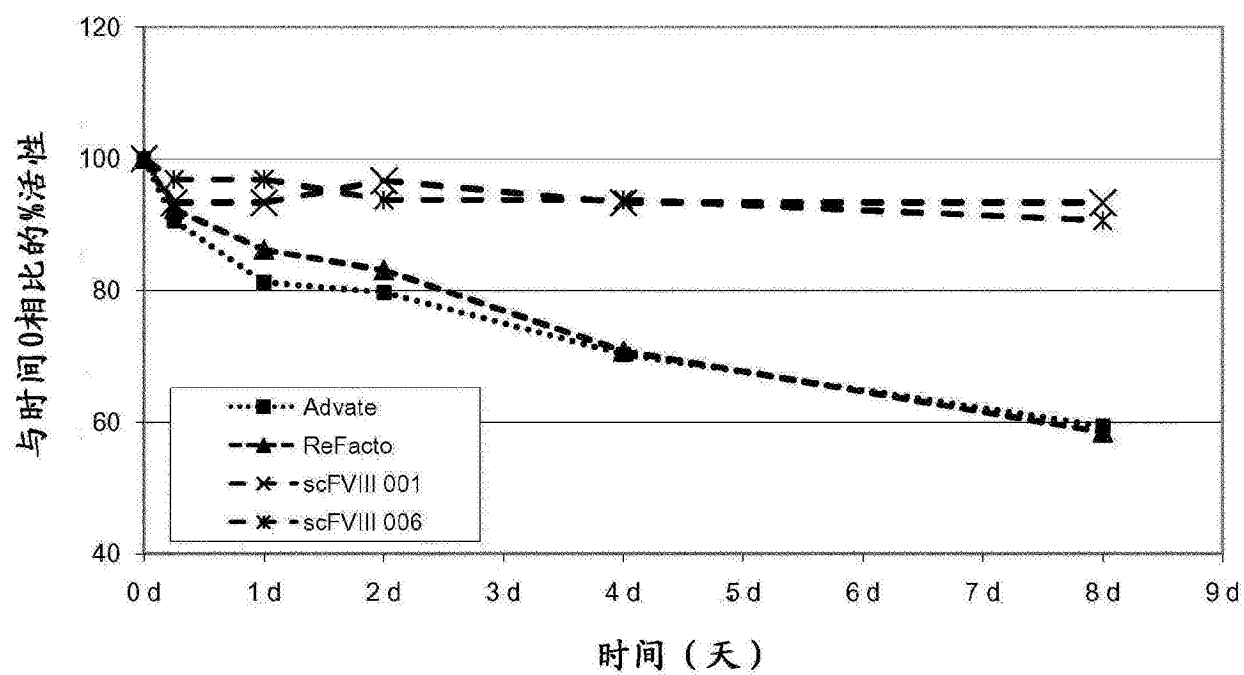


图4

FVIII分子在食蟹猴血浆中（体内）的稳定性
（以250IU/kg给药）

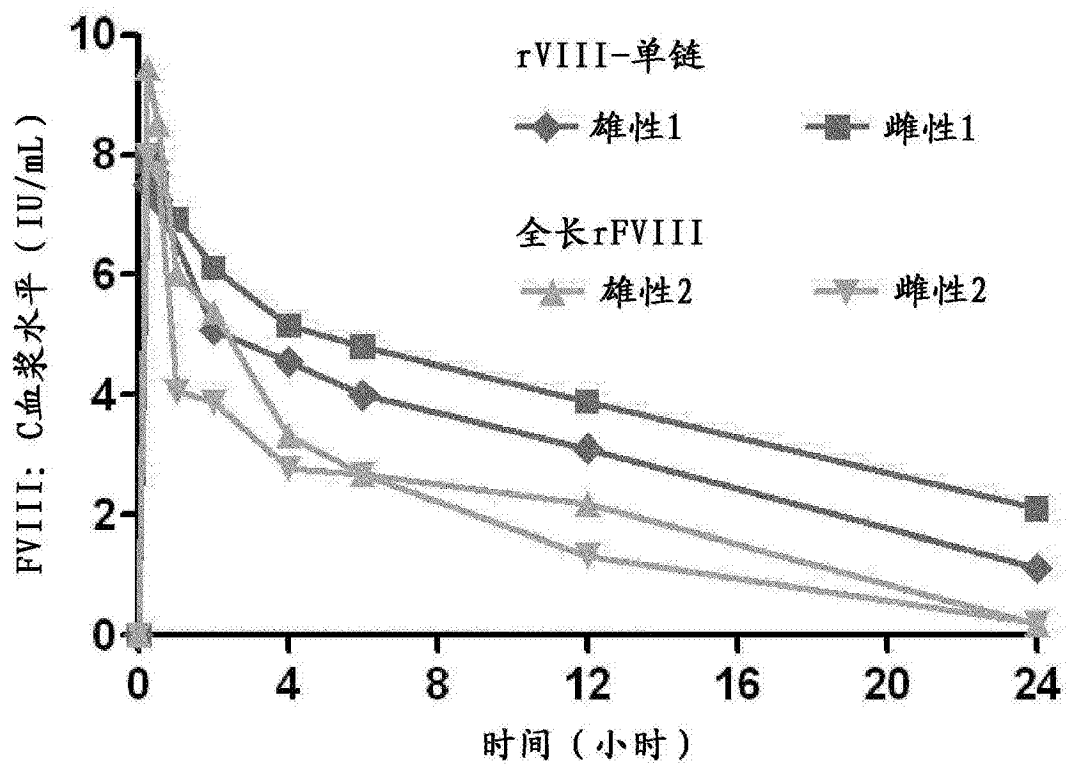


图5

FVIII分子在血友病A小鼠血浆中（体内）的稳定性
（以100IV/kg给药）

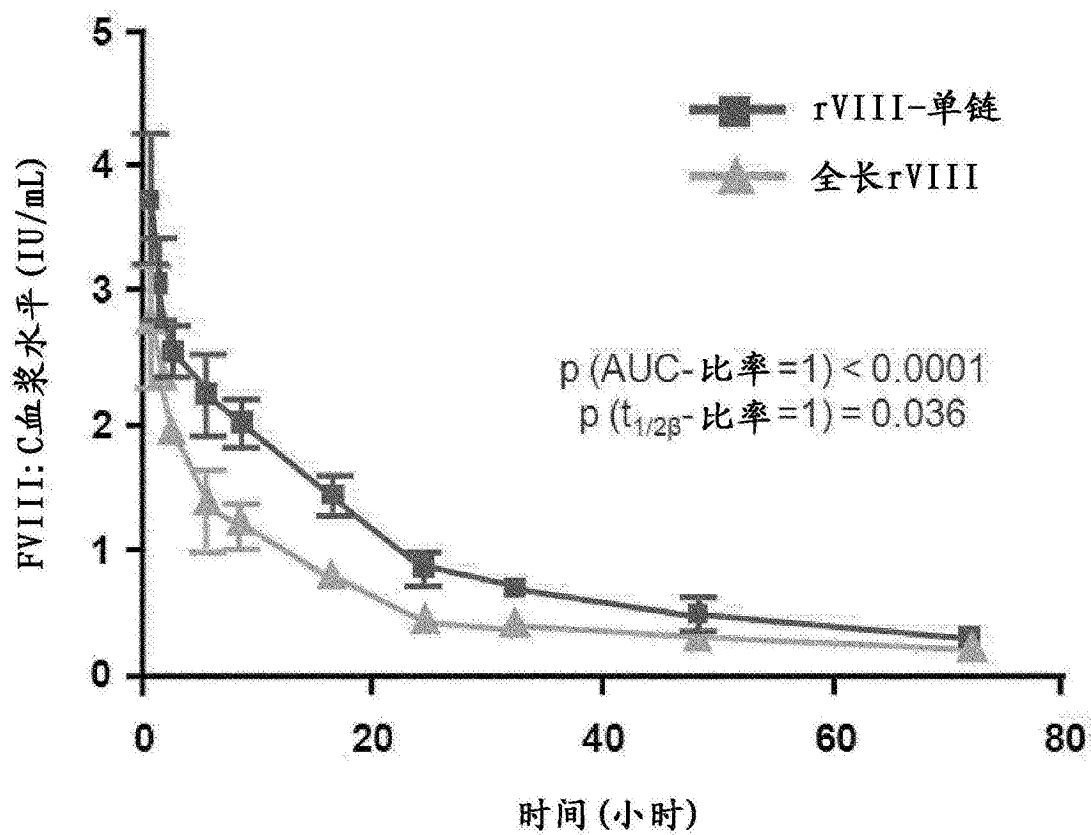


图6

血友病A小鼠中的凝血酶生成(离体)

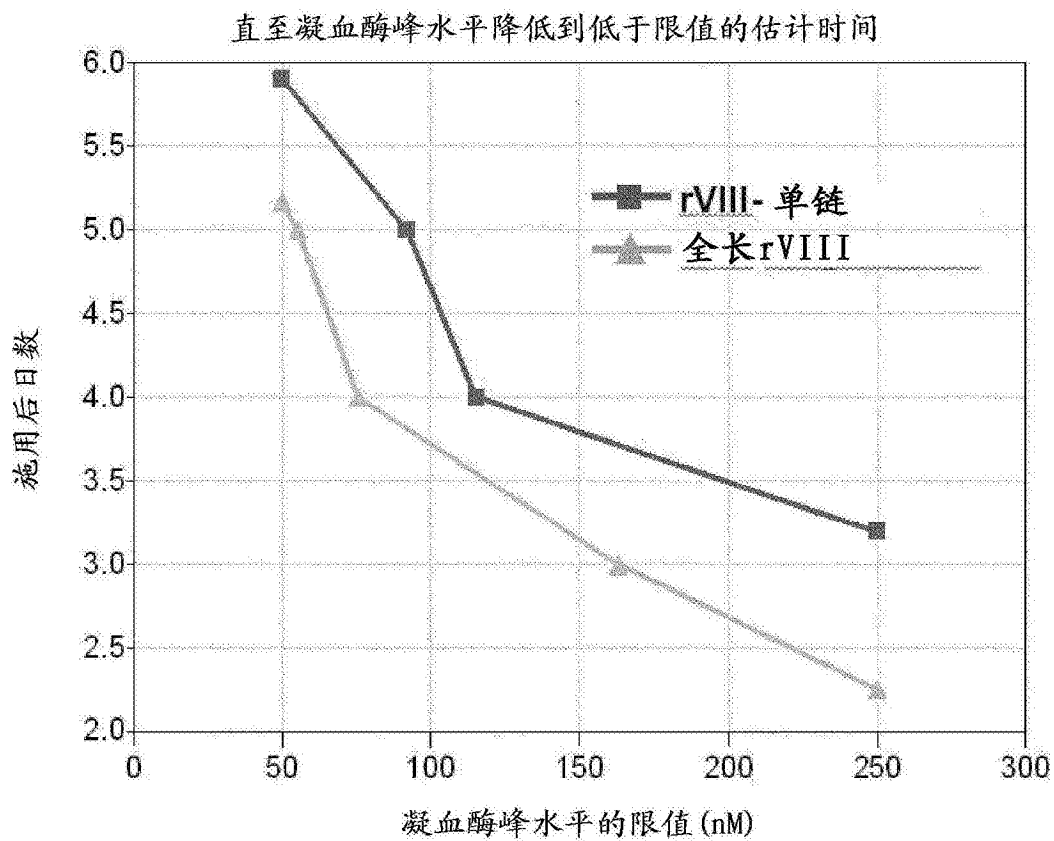


图7

FVIII分子在缺乏vWF的小鼠的血浆中(体内)的稳定性

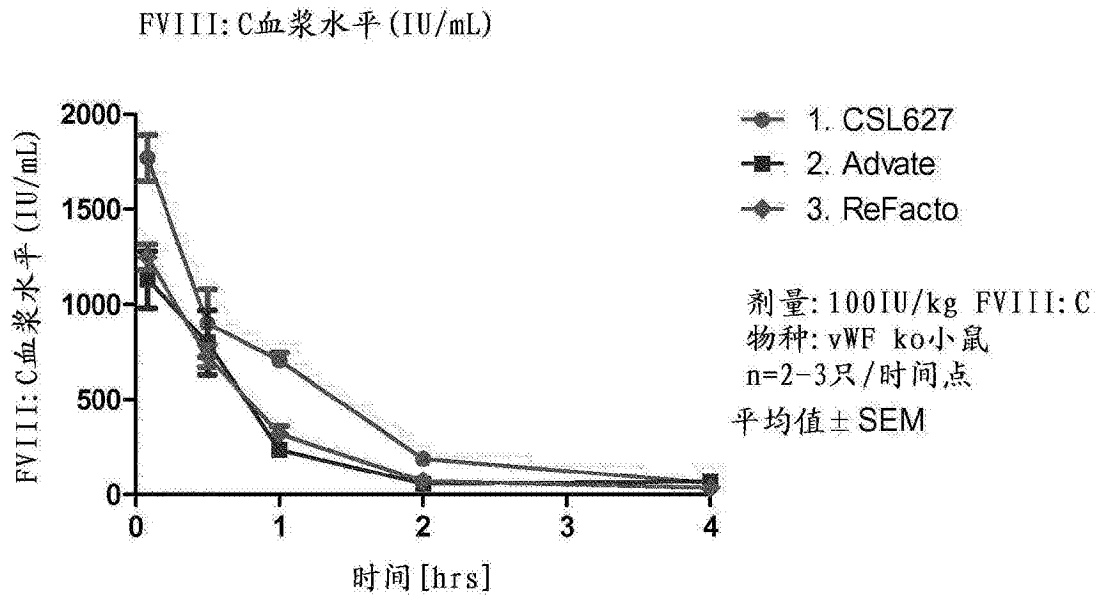


图8